ANTICUERPOS ANTI-CD38 Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 62/570.655, presentada el 10 de octubre de 2017; la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 62/570.660, presentada el 11 de octubre de 2017; la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 62/676.221, presentada el 24 de mayo de 2018; y la Solicitud EP Núm. EP18187186.4, presentada el 3 de agosto de 2018; todas las cuales se incorporan a la presente memoria por referencia en su totalidad.

PRESENTACIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO ASCII

El contenido de la siguiente presentación en archivo de texto ASCII se incorpora a la presente memoria por referencia en su totalidad: una forma legible por ordenador (CRF) de la Lista de Secuencias (nombre de archivo: 183952029941seqlist.TXT, fecha registrada: 8 de octubre, 2018, tamaño: 158 KB).

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La descripción se refiere a proteínas de unión que se unen a polipéptidos CD38 (p.ej., polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo), incluyendo proteínas de unión monoespecíficas, biespecíficas, o triespecíficas con al menos un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, así como polinucleótidos, células anfitrionas, métodos de producción, y métodos de uso relacionados.

ANTECEDENTES

Los agentes bioterapéuticos a base de anticuerpos monoclonales se han convertido en una posibilidad importante para el desarrollo de nuevos fármacos. La tecnología de anticuerpos monoclonales ofrece direccionamiento específico, entrega de

señalización precisa y/o carga útil a la población específica de células, y proporciona efecto biológico de larga duración a través de las funciones de sus Fc. Los esfuerzos en el diseño de anticuerpos han permitido el desarrollo de anticuerpos multiespecíficos que combinan las especificidades de anticuerpos monoclonales múltiples para diversas aplicaciones biológicas, ampliando el campo de aplicación del desarrollo de fármacos basados en anticuerpos.

CD38 es una diana farmacológica atractiva, puesto que se expresa sobre la superficie de la célula de una variedad de células tumorales linfoides (véase Stevenson, G.T. (2006) Mol. Med. 12:345-346). DARZALEX® (daratumumab) es un anticuerpo anti-CD38 aprobado para su uso en el tratamiento de mieloma múltiple. Sin embargo, existe una necesidad de agentes terapéuticos que se dirijan a CD38 con un modo de acción diferente y/o propiedades mejoradas, incluyendo pero sin limitarse a ellas, unión de alta afinidad a CD38, reactividad cruzada entre polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo, unión a células de linfoma (p.ej., líneas celulares de linfoma de células B grandes de mieloma múltiple), y la capacidad de inducir apoptosis y/o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y actividades antitumorales mediadas por células T.

BREVE COMPENDIO

En la presente memoria se proporcionan proteínas de unión que se unen a polipéptidos CD38 (p.ej., polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo), incluyendo proteínas de unión monoespecíficas, biespecíficas, o triespecíficas con al menos un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38. Ventajosamente, estas proteínas de unión tienen la capacidad de reclutar células T en las proximidades de las células cancerosas, de activar con posterioridad las células T y de estimular a las células T activadas a que destruyan las células cancerosas adyacentes a través de un mecanismo

Granzima/Perforina, proporcionando un modo diferente de acción en cuanto a actividad anti-tumoral a partir de anticuerpos anti-CD38 tales como DARZALEX® (daratumumab). Por otra parte, la capacidad para unirse a polipéptidos CD38 tanto humanos como de mono cinomolgo permite que las proteínas de unión sean fácilmente sometidas a ensayo en estudios toxicológicos preclínicos, p.ej., de cara a evaluar sus perfiles de seguridad para posterior uso clínico.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporcionan proteínas de unión monoespecíficas que se unen a un polipéptido CD38 humano. En algunas modalidades, las proteínas de unión reaccionan de manera cruzada con polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo. En algunas modalidades, las proteínas de unión se unen a polipéptidos CD38 de isoforma A e isoforma E humanas. En algunas modalidades, las proteínas de unión poseen una o más de las siguientes características (en cualquier combinación): se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada con una KD de 1,5 nM o menor, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, o menor, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada, según se

determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada con una KD de 3,5 nM o menor, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 7,5 nM o menor, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) como una proteína purificada, según se determina por ELISA; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; inducen apoptosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD38 en su superficie celular; y tiene una o más mutaciones (p.ej., en una región Fc) que dan como resultado una disminución de la unión a FcγRI y/o FcγRII, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones. Para ensayos ilustrativos, véanse los Ejemplos 1, 3, y 4. En algunas modalidades, la KD se mide a 4°C o 25°C.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporcionan proteínas de unión triespecíficas que se unen a un polipéptido CD38 humano. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas se unen (p.ej., simultáneamente) a un polipéptido CD38 (p.ej., expresado en la superficie de una célula) y uno o más antígenos diana diferentes expresados sobre la superficie de una segunda célula, reclutando de ese

modo la segunda célula en las proximidades de la célula que expresa el polipéptido CD38. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas se unen (p.ej., simultáneamente) a un polipéptido CD38 (p.ej., expresado en la superficie de una célula) y uno o dos antígenos diana expresados en la superficie de una célula T, reclutando de ese modo la célula T en las proximidades de la célula que expresa el polipéptido CD38. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas activan la célula T y/o proporcionan una señal co-estimuladora mediada por CD28 a la célula T. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas reaccionan de manera cruzada con polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas se unen a polipéptidos CD38 de isoforma A e isoforma E humanas. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas poseen una o más de las siguientes características (en cualquier combinación): se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada con una KD de 1,5 nM o menor, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, o menor, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de

un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada con una KD de 3,5 nM o menor, según se determina por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 7,5 nM o menor, según se determina por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) como una proteína purificada, según se determina por ELISA; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; inducen apoptosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD38 en su superficie celular; y tiene una o más mutaciones (p.ej., en una región Fc) que dan como resultado una disminución de la unión a FcγRI y/o FcγRII, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones; inducen la proliferación de células T (p.ej., proliferación de células T CD4+ y/o CD8+); inducen la expresión en células T (p.ej., células T CD4+ y/o CD8+) de Bcl-xL; inducen la apoptosis de células CD38+; se unen a CD38 expresado en la superficie de una célula y uno o más antígenos diana de células T expresados en la superficie de una célula T; se unen a CD38 expresado en la superficie de una célula, CD28 expresado en la superficie de una célula T, y CD3 expresado en la superficie de una célula T; estimulan la activación del receptor de células T; inducen la coestimulación de la señalización del receptor de células T (p.ej., mediada por CD28); y tiene una o más

mutaciones (p.ej., en una región Fc) que dan como resultado la disminución de la liberación de citocinas (p.ej., IFN-γ, IL-2, y/o TNF-α) por las PBMC, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones; inducen la liberación de citocinas (p.ej., IFN-γ y/o IL-6) por las PBMC en presencia de una célula diana CD38+. Para ensayos ilustrativos, véanse los Ejemplos 1, 3, y 4. En algunas modalidades, la KD se mide a 4°C o 25°C.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, en donde el sitio de unión a antígeno comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y/o (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y/o

(b) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende el secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y / o (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; en donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 87), o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); en donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); en donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 94); y en donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96). En algunas

modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:

33); y (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; en donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 87), o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); en donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); en donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 94); y en donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, en donde el sitio de unión a antígeno comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la

secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); y (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno reacciona de manera cruzada con un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (KD) de 2,1 nM o menor. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 de la isoforma E humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (KD) de 1,3 nM o menor.

En algunas modalidades de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la proteína de unión es un anticuerpo quimérico o humanizado. En algunas modalidades, la proteína de unión es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, la proteína de unión es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una o más cadenas pesadas de anticuerpo completas que comprenden una región Fc. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la función de unión y/o efectora del receptor Fc de la región Fc. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc de IgG1 humana comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y P329A. En algunas modalidades, la región Fc de IgG1 humana comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 298, 299, y 300 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y Y300S. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana. En algunas modalidades, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas modalidades, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A. En algunas modalidades, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que

corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236. En algunas modalidades, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-237 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde la secuencia EFLGG se reemplaza por PVAG. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un fragmento F(ab), F(ab')2, Fab'-SH, Fv, o scFv de anticuerpo. En algunas modalidades, la proteína de unión se conjuga con un agente citotóxico o marca. En algunas modalidades, la proteína de unión es una proteína de unión biespecífica que comprende el primer sitio de unión a antígeno que se une al polipéptido CD38 y un segundo sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, la proteína de unión es una proteína de unión triespecífica que comprende el primer sitio de unión a antígeno que se une al polipéptido CD38, un segundo sitio de unión a antígeno, y un tercer sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano, y en donde el segundo y tercer sitios de unión a antígeno se unen cada uno a una proteína de superficie de células T. En algunas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano, y en donde (a) el segundo sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 humano, y el tercer sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 humano, o (b) el segundo sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 humano, y el tercer sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 humano.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende tres sitios de unión a antígeno que se unen cada uno a una o más proteínas diana, en donde al menos uno de los tres sitios de unión a antígeno reacciona de manera cruzada con un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un

dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo. En algunas modalidades, la proteína de unión reacciona de manera cruzada con un polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 105. En algunas modalidades, la proteína de unión reacciona de manera cruzada con un polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que reacciona de manera cruzada con un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo y dos sitios de unión a antígeno que se unen cada uno a una proteína de superficie de células T. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que reacciona de manera cruzada con un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo, un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28 humano, y un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3 humano. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L2}-L_1-V_{L1}-L_2-C_L [I]

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

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [II]

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{H3}-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [III]

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L3}\text{-}C_L \qquad [IV]$$

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera, y

en donde: (a) el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

(b) el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o

(c) el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, la proteína de unión comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios

de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L2}-L_1-V_{L1}-L_2-C_L [I]

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

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [II]

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{H3}-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [III]

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L3}-C_L [IV]

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera, y

en donde: (a) el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) or GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), a CDR-H2 sequence que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36);

(b) el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36); o

(c) el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una

secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36). En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de

aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de

aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; o el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L2}-L_1-V_{L1}-L_2-C_L [I]

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

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [II]

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{H3}-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [III]

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L3}-C_L [IV]

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera, y

en donde (a) el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46);

(b) el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46); o

(c) el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; el

dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85; el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85; el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85; o el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85. En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, el dominio V_{H3} comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, al menos uno de L_1, L_2, L_3 o L_4 tiene independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 o L_4 tienen independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, (a) L_1, L_2, L_3 y L_4 tienen cada uno independientemente 0 aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59); o (b) L_1, L_2, L_3 y L_4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L_2 comprende la secuencia TKGPS (SEQ ID NO: 57), L_3 comprende la secuencia S, y L_4 comprende la secuencia RT; L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_2 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud, y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud; L_1 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_2 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud, y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud; o L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L_2 tiene 0 aminoácidos de longitud,

L_3 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A. En algunas modalidades, los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236. En algunas modalidades, los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas modalidades, los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG1 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y P329A. En algunas modalidades, los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG1 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 298, 299, y 300 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice

UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y Y300S. En algunas modalidades, el dominio bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V; y en donde el dominio bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la tercera cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W. En algunas modalidades, el dominio bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W; y en donde el dominio bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la tercera cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V. En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En

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

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende tres sitios de unión a antígeno que se unen cada uno a una o más proteínas diana, en donde la proteína de unión comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L2}\text{-}L_1\text{-}V_{L1}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

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

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-bisagra-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \quad [II]$$

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{H3}\text{-}C_{H1}\text{-bisagra-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \quad [III]$$

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L3}\text{-}C_L \quad [IV]$$

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera; y

en donde (a) los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG1 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 298, 299, y 300 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y Y300S; o (b) los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, y en donde los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236. En algunas modalidades, los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana comprenden sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-237 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde la secuencia EFLGG se reemplaza por PVAG. En algunas modalidades, al menos un par de V_{H1} y V_{L1}, V_{H2} y V_{L2}, y V_{H3} y V_{L3} forma un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38. En algunas modalidades, uno, dos, o tres pares de V_{H1} y V_{L1}, V_{H2} y V_{L2}, y V_{H3} y V_{L3} forman un sitio de unión a antígeno que se une a una diana antigénica seleccionada del grupo que consiste en A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR,

GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNα, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor plaquetario, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, quinasa Syk, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y XCR1. En algunas modalidades, un primer par de V_{H1} y V_{L1}, V_{H2} y V_{L2}, y V_{H3} y V_{L3} forma un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3 humano, un segundo par de V_{H1} y V_{L1}, V_{H2} y V_{L2}, y V_{H3} y V_{L3} forma un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28 humano, y un tercer par de V_{H1} y V_{L1}, V_{H2} y V_{L2}, y V_{H3} y V_{L3} forma un sitio de unión a antígeno que se une a una diana antigénica humana seleccionada del grupo que consiste en A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNα, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40,

OX40L, PD-1H, receptor plaquetario, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, quinasa Syk, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y XCR1.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona un kit de polinucleótidos, que comprende: (a) un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75; (b) un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 76, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75; (c) un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 79, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75; (d) un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81; (e) un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 76, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81; o (f) un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, un tercer polinucleótido que comprende

la secuencia de SEQ ID NO: 83, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona un polinucleótido que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las modalidades anteriores. En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona un vector que comprende un polinucleótido que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las modalidades anteriores.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona una célula anfitriona que comprende el kit de polinucleótidos, el polinucleótido, o el vector de una cualquiera de las modalidades anteriores. En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona un método de producción de una proteína de unión, comprendiendo el método cultivar la célula anfitriona de una cualquiera de las modalidades anteriores de manera que se produce la proteína de unión. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente recuperar la proteína de unión de la célula anfitriona.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las modalidades anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona un método para la prevención y/o el tratamiento del cáncer en un paciente que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína de unión de una cualquiera de las modalidades anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades anteriores. En algunas modalidades, la proteína de unión es una proteína de unión triespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a CD3, un segundo sitio de unión a antígeno que se une

a CD28, y un tercer sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano. En algunas modalidades, la al menos una proteína de unión se administra conjuntamente con un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), o linfoma de células B. En algunas modalidades, el paciente es un ser humano. En algunas modalidades, el paciente se selecciona para el tratamiento debido a que las células del cáncer expresan un polipéptido de la isoforma E de CD38 humano (p.ej., como se expone en SEQ ID NO: 105) sobre su superficie celular. En algunas modalidades, las células cancerosas expresan CD38 y CD28. En algunas modalidades, las células cancerosas expresan CD38 y no expresan CD28.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona al menos una proteína de unión de una cualquiera de las modalidades anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades anteriores para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer en un paciente (p.ej., un paciente que lo necesite, tal como un paciente con cáncer). En algunas modalidades, en la presente memoria se proporciona al menos una proteína de unión de una cualquiera de las modalidades anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades anteriores para su uso en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer en un paciente (p.ej., un paciente que lo necesite, tal como un paciente con cáncer). En algunas modalidades de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la proteína de unión es una proteína de unión triespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a CD3, un segundo sitio de unión a antígeno que se une a CD28, y un tercer sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano. En algunas modalidades, la al menos una proteína de unión se

debe administrar conjuntamente con un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), o linfoma de células B. En algunas modalidades, el paciente es un ser humano. En algunas modalidades, el paciente se selecciona para el tratamiento debido a que las células del cáncer expresan un polipéptido de la isoforma E de CD38 humano (p.ej., como se expone en SEQ ID NO: 105) sobre su superficie celular. En algunas modalidades, las células cancerosas expresan CD38 y CD28. En algunas modalidades, las células cancerosas expresan CD38 y no expresan CD28.

Se debe entender que una, algunas, o todas las propiedades de las diversas modalidades descritas en la presente memoria se pueden combinar para formar otras modalidades de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes para un experto en la técnica. Estas y otras modalidades de la invención se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina facilitará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color previa petición y pago de la tasa necesaria.

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

La **FIG. 1B** muestra los resultados de ensayos de unión de citometría de flujo que examinan la unión de anticuerpos mAb1 anti-CD38 o isatuximab (no se observó unión) a células que expresan CD38 de mono cinomolgo sobre su superficie.

Las **FIG. 2A-2I** muestran los resultados de ensayos que caracterizan la unión de anticuerpos anti-CD38 a polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo. La **FIG. 2A** muestra la unión de anticuerpo mAb2 anti-CD38 humanizado a CD38 humano soluble (parte superior, “hCD38::Cola de histidinas”) o CD38 de mono cinomolgo (parte superior, “cinoCD38::Cola de histidinas”) mediante ELISA, así como la unión de mAb2 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, según lo señalado) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior, según lo señalado) mediante citometría de flujo. La **FIG. 2B** muestra la unión de mAb2 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). La **FIG. 2C** muestra la unión de anticuerpo mAb3 anti-CD38 humanizado a CD38 humano soluble (parte superior, “hCD38::Cola de histidinas”) o CD38 de mono cinomolgo (parte superior, “cinoCD38::Cola de histidinas”) mediante ELISA, así como la unión de mAb3 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, según lo señalado) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior, según lo señalado) mediante citometría de flujo. La **FIG. 2D** muestra la unión de mAb3 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior) mediante SPR. La **FIG. 2E** muestra la unión de anticuerpo mAb5 anti-CD38 humanizado a CD38 humano soluble (parte superior, “hCD38::Cola de histidinas”) o CD38 de mono cinomolgo (parte superior, “cinoCD38::Cola de histidinas”) mediante ELISA, así como la unión de mAb5 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, según lo señalado) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior, según lo señalado) mediante citometría de flujo. La **FIG. 2F** muestra la unión de mAb5 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior) mediante SPR. La **FIG. 2G** muestra la unión de anticuerpo anti-CD38 humano hhy1370 a CD38 humano soluble (parte superior, “hCD38::Cola de histidinas”) o CD38 de mono cinomolgo (parte superior, “cinoCD38::Cola de histidinas”) mediante ELISA, así como la

unión de hhy1370 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, según lo señalado) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior, según lo señalado) mediante citometría de flujo. La **FIG. 2H** muestra la unión de hhy1370 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de mono cinomolgo (parte inferior) mediante SPR. La **FIG. 2I** resume los datos de unión de los experimentos ELISA, SPR, y FACS, así como el porcentaje de identidad de cada dominio VH ("H") o VL ("L") de anticuerpo con la secuencia de la región V humana desde la parte superior a la inferior que corresponde a la última línea de mAb2, mAb3, mAb 4, mAb 5, y mAb6 (1195 HHKK-3 no se ha descrito mediante su secuencia de aminoácidos de VL/VH en el texto siguiente).

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

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

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

Las **FIG. 2M-2Q** muestran los resultados de ensayos de inducción de apoptosis utilizando los anticuerpos anti-CD38 indicados contra células tumorales SU-DHL-8. La apoptosis se cuantificó midiendo la captación dual de Anexina V y Yoduro de propidio a través de citometría de flujo. La **FIG. 2M** muestra el porcentaje de células apoptóticas inducidas por cada anticuerpo. Las **FIG. 2N-2Q** muestran la inducción de apoptosis dependiente de la dosis en células SU-DHL-8 de linfoma por anticuerpos mAb2

anti-CD38 (**FIG. 2N**), mAb3 (**FIG. 2O**), mAb4 (**FIG. 2P**), y mAb5 (**FIG. 2Q**), así como la CI50 para cada anticuerpo.

La **FIG. 3A** proporciona una representación esquemática de una proteína de unión triespecífica que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se une a tres proteínas diana: CD28, CD3, y CD38. Un primer par de polipéptidos posee dominios variables duales que tienen una orientación de entrecruzamiento (VH1-VH2 y VL2-VL1) que forma dos sitios de unión a antígeno que reconocen CD3 y CD28, y un segundo par de polipéptidos posee un dominio variable sencillo (VH3 y VL3) que forma un solo sitio de unión a antígeno que reconoce CD38. La proteína de unión triespecífica que se muestra en la **FIG. 3A** utiliza una región constante de IgG4 con una mutación de “botón en ojal”, donde el botón está en el segundo par de polipéptidos con un dominio variable sencillo.

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

La **FIG. 3C** muestra los resultados de ensayos basados en SPR para examinar la unión de CD38 a proteínas de unión triespecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3. La unión de CD38 humano a proteínas de unión triespecíficas se examinó sola (parte superior izquierda), después de la unión previa a CD3 (parte superior centro), después de la unión previa a CD28 (parte superior derecha), después de la unión previa a CD3, después a CD28 (parte inferior izquierda), o después de la unión previa a CD28, después a CD3 (parte inferior derecha).

La **FIG. 4** muestra la unión secuencial de polipéptidos CD3, CD28, y CD38 humanos a proteínas de unión triespecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3, según se determina por SPR.

La **FIG. 5** resume las afinidades de unión de las proteínas de unión triespecíficas indicadas a sus antígenos cognados (CD3, CD28, y CD38 humanos) según se mide mediante SPR.

La **FIG. 6A** compara la afinidad aparente del dominio de unión a antígeno de isatuximab en un formato de IgG1 humana (2ª lámina) o en un formato de proteína de unión triespecífica con los dominios de unión a antígeno de isatuximab, anti-CD28, y anti-CD3 (formato de acuerdo con la **FIG. 3A**; 1ª lámina) para unirse a polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de mono cinomolgo (parte inferior), según se determina por citometría de flujo.

Las **FIG. 6B-6D** comparan las afinidades aparentes de la proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$, o del anticuerpo monoespecífico mAb2 anti-CD38 para unirse a células que expresan polipéptidos CD38 humanos o de mono cinomolgo, según se determina por citometría de flujo. La **FIG. 6B** muestra la unión de proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ a células que expresan polipéptidos CD38 humano (parte superior) o de mono cinomolgo (parte inferior). La **FIG. 6C** muestra la unión de la proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ a células que expresan polipéptidos CD38 humano (parte superior) o de mono cinomolgo (parte inferior). La **FIG. 6D** muestra la unión de anticuerpo monoespecífico mAb2 anti-CD38 a células que expresan polipéptidos CD38 humano (parte superior) o de mono cinomolgo (parte inferior).

La **FIG. 6E** compara las afinidades aparentes de la proteína de unión triespecífica $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ o del anticuerpo monoespecífico anti-CD38 mAb6 para unirse a células que expresan polipéptidos CD38 humano (parte superior) o de mono cinomolgo (parte inferior), según se determina por citometría de flujo.

La **FIG. 6F** resume la afinidad de unión de las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 indicadas para CD38 humano, según se mide mediante SPR o citometría de flujo (FACS).

La **FIG. 6G** muestra la afinidad aparente de la proteína de unión triespecífica $\Delta CD38V_{H1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que carece del dominio de unión a antígeno anti-CD38 para unirse a células que expresan polipéptidos CD38 humano (parte superior) o de mono cinomolgo (parte inferior), según se determina por citometría de flujo.

Las **FIG. 7A y 7B** muestran los resultados de un ensayo ELISA que determina las afinidades de unión de diversas proteínas de unión triespecíficas de IgG4 anti-CD38xCD28xCD3, o anticuerpos de control, contra polipéptidos CD3, CD28 y CD38 humanos y de mono rhesus.

Las **FIG. 8A-8D** muestran los resultados de la destrucción específica mediada por anticuerpos de células $CD38^+$ por las PBMC de tres donantes humanos diferentes utilizando las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xCD28xCD3 y anticuerpos de control indicados. Se muestran resultados representativos utilizando líneas celulares de mieloma múltiple RPMI8266 (**FIG. 8A**), NCI-H929 (**FIG. 8B**), KMS-26 (**FIG. 8C**), y KMS-11 (**FIG. 8D**), y los valores de CE50 proporcionan en la Tabla N. Los valores de CE50 obtenidos utilizando células NCI-H929, KMS-26, y KMS-11 se proporcionan en las Tablas O-Q.

Las **FIG. 8E y 8F** muestran los resultados de la destrucción específica mediada por anticuerpo de células $CD38^+$ por las PBMC de dos donantes diferentes utilizando las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xCD28xCD3 indicadas con regiones Fc variantes y anticuerpos de control. Se muestran resultados representativos utilizando líneas celulares KMS-11 (**FIG. 8D**) y U266 (**FIG. 8E**) $CD38^+$, y los valores de CE50 se proporcionan en Tablas Q2 y Q3.

Las **FIG. 9A, 9B, y 10** muestran la activación ($CD69^+$) de células T humanas tratadas con diversas proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xCD28xCD3 o anticuerpos de control durante 24 horas. La **FIG. 9A** muestra la activación ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ humanas. La **FIG. 9B** muestra la activación ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ $CD4^+$ humanas. La **FIG. 10** muestra la activación ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ $CD8^+$ humanas.

Las **FIG. 11A-11B** muestran los resultados de evaluaciones de liberación de citocina *in vitro* de PBMC humanas tratadas con las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xCD28xCD3 o anticuerpos de control indicados basándose en el método de la placa seca como describen Stebbings, R. *et al.* (2007) *J. Immunol.* 179:3325-3331. La **FIG. 11A** muestra los resultados utilizando 5µg/mL de los anticuerpos indicados. La **FIG. 11B** muestra los resultados utilizando 25ng/mL de los anticuerpos indicados.

Las **FIG. 12A-12E** muestran la actividad *in vivo* de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ en el modelo de ratón NSG humanizado de células de sangre de cordón umbilical CD34+ en el que se han implantado células de mieloma múltiple RPMI-8226. La **FIG. 12A** muestra el cambio en el volumen tumoral en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 12B** muestra el volumen tumoral medio el día 18 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 12C** muestra el peso tumoral terminal medio en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 12D** muestra la curva de crecimiento tumoral medio en el transcurso

del experimento en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 12E** muestra el cambio medio en el peso corporal en múltiples puntos temporales en el transcurso del experimento de ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38.

Las **FIG. 13A-13F** muestran la actividad *in vivo* de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ en el modelo de ratón NSG humanizado de PBMC en el que se han implantado células de mieloma múltiple RPMI-8226. La **FIG. 13A** muestra el cambio en el volumen tumoral en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 13B** muestra el volumen tumoral el día 4 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 13C** muestra el volumen tumoral el día 21 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 13D** muestra el volumen tumoral medio el día 21 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 13E** muestra el peso tumoral terminal medio en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **FIG. 13F** muestra el volumen tumoral medio en múltiples puntos

temporales en el transcurso del experimento en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ vs. ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38.

Las **FIG. 14A-14U** muestran los resultados de un estudio de aumento progresivo de dosis (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) utilizando las proteínas de unión triespecíficas anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$, anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$, anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$, y anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$ en primates no humanos. La **FIG. 14A** muestra la activación de células T ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ circulantes después de la administración de dosis diferentes de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14B** muestra la activación de células T ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ circulantes después de la administración de dosis diferentes de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14C** muestra la activación de células T ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ circulantes después de la administración de dosis diferentes de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14D** muestra la activación de células T ($CD69^+$) de células T $CD3^+$ circulantes después de la administración de dosis diferentes de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14E** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD4^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14F** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD8^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14G** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD4^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(V_{HI})}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14H** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD8^+$ circulantes después de la

administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(V_{HI})}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14I** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD4^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14J** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD8^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14K** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD4^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14L** muestra los cambios en el porcentaje de células T $CD8^+$ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$. La **FIG. 14M** muestra los cambios en las células T $CD4^+$ totales 6, 24, y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión triespecíficas indicadas. La **FIG. 14N** muestra los cambios en las células NK totales 6, 24, y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión triespecíficas indicadas. La **FIG. 14O** muestra los cambios en las células T $CD8^+$ totales 6, 24, y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión triespecíficas indicadas. La **FIG. 14P** muestra los cambios en las células B totales 6, 24, y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión triespecíficas indicadas. La **FIG. 14Q** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis crecientes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(V_{H1})}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ (resultados de diferentes animales de prueba marcados como “117065” y “117066”). La **FIG. 14R** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis crecientes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(V_{H1})}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$ (resultados de diferentes animales de

prueba marcados como “117067” y “117068”). **La FIG. 14S** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis crecientes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ (resultados de diferentes animales de prueba marcados como “117069” y “117070”). La **FIG. 14T** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis crecientes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión triespecífica anti-$CD38_{(hhy1370)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$ (resultados de diferentes animales de prueba marcados como “117071” y “117072”). La **FIG. 14U** muestra los cambios en los niveles de citocinas 24 horas después de la administración de las tres dosis crecientes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de las proteínas de unión triespecíficas indicadas (resultados mostrados a partir de todos los animales de prueba).

Las **FIG. 14V y 14W** muestran que la proteínas de unión triespecíficas anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ y anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$ indujeron empobrecimiento de células T *in vivo* en sangre de primate no humano a dosis más altas (6 horas post-dosis).

Las **FIG. 14X y 14Y** muestran que las proteínas de unión triespecíficas anti-$CD38_{(HHY1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ y anti-$CD38_{(HHY1370}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$ indujeron empobrecimiento de células T *in vivo* en sangre de primate no humano a dosis más altas (6 horas post-dosis).

Las **FIG. 14Z y 14AA** muestran la cantidad de células T sanguíneas en primates no humanos a lo largo del tiempo después de la administración de proteínas de unión triespecíficas anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ o anti-$CD38_{(VHI)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$.

Las **FIG. 14AB y 14AC** muestran la cantidad de células T sanguíneas en primates no humanos a lo largo del tiempo después de la administración de proteínas de

unión triespecíficas anti-$CD38_{(HHY1370)}xCD28_{(sup)}xCD3_{(mid)}$ o anti-$CD38_{(HHY1370)}xCD28_{(cvn)}xCD3_{(mid)}$.

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

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

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

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

La **FIG. 17** resume los parámetros PK de las proteínas de unión triespecíficas indicadas (IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG1 LALA P329A $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, e IgG4 FALA $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$) en ratones NSG.

Las **FIG. 18A-18C** muestran la liberación de IFN-γ (**FIG. 18A**), IL-2 (**FIG. 18B**), o TNF-α (**FIG. 18C**) mediada por la interacción Fc/FcR (no específica) por PBMC humanas incubadas con proteínas de unión triespecíficas que tienen regiones Fc de tipo salvaje o variante FALA.

La **FIG. 18D** muestra activación *in vitro* de PBMC humanas por proteínas de unión triespecíficas $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, así como variantes de Fc de IgG1 e IgG4 de las mismas.

Las **FIG. 19A y 19B** muestran que la inducción de Bcl-xL en células T CD4+ (**FIG. 19A**) o CD8+ (**FIG. 19B**) por la proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ requiere ambos dominios de unión a antígeno CD3 y CD28. Gráfico de barras = media y d.t. de 3 donantes de PBMC. *p=≤0,009.

Las **FIG. 19C y 19D** muestran que $CD38_{VH1}$xCD28xCD3 con variantes de Fc FALA de IgG4 regula positivamente Bcl-xL en células T CD4+ (**FIG. 19C**) o CD8+ (**FIG. 19D**) mejor que un anticuerpo biespecífico de referencia. Gráfico de barras = media y d.t. de 3 donantes de PBMC. *p=≤0,045

La **FIG. 19E** muestra que la activación de células T por proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3, según se determina por la expresión de IL-2 en una línea informadora de células T de Jurkat, dependen del dominio de unión a antígeno anti-CD3.

La **FIG. 19F** muestra la liberación de citocinas TNF, IFNg, IL-2, IL-6, e iL-10 por proteínas de unión triespecíficas $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, en comparación con proteínas de unión con anti-CD28, anti-CD38, o anti-CD28, anti-CD38, y anti-CD3 mutados, así como con la referencia.

La **FIG. 19G** muestra la proliferación de células T activadas por proteína de unión triespecífica anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 con la variante de Fc FALA de IgG4, anticuerpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referencia, o control de isotipo (proteína de unión triespecífica con la variante de Fc FALA de IgG4 que tiene dominios de unión mutados).

La **FIG. 20** muestra proliferación de células T activada por proteína de unión triespecífica anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 con la variante de Fc FALA de IgG4, proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 con la variante de Fc FALA de IgG4 y una mutación en el dominio de unión a antígeno CD38, CD28, o CD3, o

control de isotipo (proteína de unión triespecífica con la variante de Fc FALA de IgG4 que tiene tres dominios de unión mutados).

La **FIG. 21** muestra la actividad anti-tumoral *in vivo* de la proteína de unión triespecífica IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ administrada a las dosis indicadas en un modelo de tumor diseminado NCI-H929-Luc en ratones NSG con PBMC humanizadas.

La **FIG. 22** muestra la actividad anti-tumoral *in vivo* de la proteína de unión triespecífica IgG4 FALA $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ administrada a las dosis indicadas en un modelo de tumor diseminado NCI-H929-Luc en ratones NSG con PBMC humanizadas.

Las **FIG. 23A y 23B** muestran la potente actividad de destrucción del tumor *in vitro* de células NCI-929-Luc con proteínas de unión triespecíficas $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, y anticuerpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referencia utilizando las PBMC humanas utilizadas en el estudio in vivo. Las PBMC humanas de dos ratones NSG humanizados donantes se utilizaron después de 24 horas de incubación con una razón de efector:PBMC de 10:1.

La **FIG. 23C** muestra actividad anti-tumoral *in vivo* superior de proteínas de unión triespecíficas $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, en comparación con un anticuerpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referencia, administrado a las dosis indicadas en un modelo de tumor diseminado NCI-H929-Luc en ratones NSG con PBMC humanizadas. Las proteínas de unión se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) semanal a 30µg/kg.

La **FIG. 24A** muestra los resultados de un ensayo indicador de luciferasa utilizando Células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ (Promega) después de la estimulación mediante $CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$ y sus mutantes KO de sitio de unión único y KO triple a concentración 10 nM.

La FIG. 24B muestra la optimización del anticuerpo anti-CD3xCD28 CODV-Fab. La configuración óptima de α-CD3 y α-CD28 en posiciones alternativas del Fab biespecífico de CODV se evaluó mediante ensayos de liberación de citocinas utilizando PBMC humanas in vitro. IstalDistal-CD28 x CD3 proximal se identificó como posicionamiento óptimo basado en la secreción de IFN-γ e IL-2 en el sobrenadante después de 24 horas.

La **FIG. 25** muestra que la regulación positiva inducida por $CD38_{V_{H1}}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$ del miembro Bcl-xL de la familia Bcl-2 en células T primarias depende de CD28.

La **FIG. 26** muestra que anti-CD28 en el Ab triespecífico proporciona señalización secundaria esencial para apoyar la proliferación de células T primarias in vitro.

La **FIG. 27** muestra la configuración del anticuerpo triespecífico, con código de color por el anticuerpo parental (izquierda). El sombreado oscuro (color púrpura o verde) indica péptidos de cadena pesada; el sombreado claro indica péptidos de cadena ligera. también se muestra un modelo de estructura del Ab triespecífico $CD38V_{H1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}$ basándose en las estructuras cristalinas de Fab V_{H1} anti-CD38 y Fab CODV $CD28_{sup}/CD3_{mid}$ (derecha).

Las **FIG. 28A** y **28B** muestran que las células de mieloma múltiple (MM) con alta (RPMI-8226; **FIG. 28A**) y baja (KMS-11; **FIG. 28B**) expresión en la superficie de CD38 fueron lisadas eficazmente por las PBMC humanas (E:T=10:1) incubadas con diversas concentraciones del Ab triespecífico. La contribución a la actividad destructora de cada sitio de unión se demostró mediante mutaciones KO del sitio de unión, según lo señalado.

Las **FIG. 29A-29C** muestran que el mutante anti-$CD28_{sup}KO$ del Ab triespecífico exhibió una marcada reducción de la actividad anti-tumoral contra células MM $CD38_{high}$, $CD38_{mid}$ y $CD38_{low}$ in vitro. Se muestran ensayos utilizando células RPMI-8226 (**FIG. 29A**), U266 (**FIG. 29B**), o KMS-11 (**FIG. 29C**).

La **FIG. 30** muestra que la reducción de la carga tumoral en grupos de tratamiento con anticuerpo triespecífico FALA $CD38V_{H1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$_ fue dependiente de la dosis y estadísticamente diferente en un modelo de línea celular de mieloma múltiple humano diseminado utilizando un ratón NSG reconstituido con células T primerias humanas amplificadas in vitro.

Las **FIG. 31A** y **31B** muestran elanálisis de microscopía vital de la citólisis de células de mieloma por el Ab Trispecífico CD38 in vitro en presencia de células T humanas primarias La fotografía de lapso de tiempo de imágenes microscópicas se realizó usando un control negativo (triple KO triespecífico; FIG. 31A) o el Ab triespecífico CD38/CD28xCD3 (FIG. 31B) usando PBMC humanos incubados con línea celular de mieloma RPMI-8226 marcada con tinte rojo intenso CellTrackerTM. Las imágenes presentadas se recogieron después de 24 horas de incubación.Barra de escala: 50µm.

La FIG. 32 muestra mutaciones alternativas en la región Fc de IgG4 preparadas para el análisis en ensayos de unión al receptor de Fc. Se muestran las SEQ ID NO: 111-116 (de arriba a abajo, respectivamente).

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

La FIG. 34 muestra que una proteína de unión triespecífica CD38 con una unión mínima de FcR redujo la liberación no específica de citocinas por las PBMC humanas in vitro. Se analizaron diferentes mutaciones inactivadoras de FcR (como se

indica) para determinar sus efectos proinflamatorios en el isotipo IgG4 humano. Los PBMC humanos se incubaron en medios (no estimulados) o en presencia de células de mieloma, RPMI-8226 (estimuladas), y las barras indican niveles de IFN-super sobrenadante medidos por ELISA.

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

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

Las FIGS. 37A-37D muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T in vitro en respuesta a CD38/CD3xCD28. La evaluación de la expansión del subconjunto de células T se realizó recubriendo los pocillos con 350 ng/pocillo del Ab triespecífico CD38 en ausencia de citocinas exógenas. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. El ab trispecífico triple mutante se utilizó como control negativo. Se usó citometría de flujo para determinar las células T CD4 de memoria central y efectora (FIG: 37A), las células T auxiliares (FIG. 37B), las células T CD8 de memoria central y efectora (FIG. 37C) y las células CD8 específicas de CMV pp65 (FIG. 3). 37D) como se describe en el Ejemplo 12. El análisis de las células efectoras pp65 específicas de CMV se realizó por tinción con pentámero de PBMC de donantes HLA-A2 CMV+ tratados con el Ab CD38 triespecífico o el control triple negativo.

La FIG. 38 muestra la contribución de la expresión de CD28 en las células diana a la susceptibilidad a la citólisis por CD38/CD3xCD28. El CD28 se eliminó en células KMS-11 usando el direccionamiento del gen CRISPR/Cas 9 y se usó como dianas citolíticas in vitro. En comparación con el KMS-11 parental, la expresión de CD38 se conservó mientras que se eliminó el CD28, como lo demuestra la citometría de flujo (panel superior, KMS-11 frente a KMS-11 (CD28KO). La citólisis de las células CD28 KO se examinó con el WT o CD28 nulo triespecífico (panel inferior; triespecífico versus triespecífico (CD28KO)).

La FIG. 39 muestra la actividad citolítica del Ab mutante FALA triespecífico CD38/CD28xCD3 contra las líneas $CD38^{+}CD28^{-}$ indicadas, incluida la leucemia mielocítica aguda (AML (KG-1)), un linfoma de células B (OCI-Ly19), leucemia linfocítica T aguda (ALL (KOPN8)) y linfoma linfocítico crónico (CLL (Z-138)).

La FIG. 40 muestra que la activación in vitro de PBMC humanas por el superagonista α--CD28 requiere la bivalencia del anticuerpo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

I. Definiciones Generales

Según se utilizan de acuerdo con la presente descripción, se deberá entender que los siguientes términos, a no ser que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados. A menos que sea requerido de otro modo por contexto, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Según se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular “un”, “uno”, "una" "el" y “la” incluyen los referentes plurales a no ser que el contexto dicte

claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una molécula” incluye opcionalmente una combinación de dos o más de tales moléculas, y similares.

Se entiende que los aspectos y modalidades de la presente descripción descritos en la presente memoria incluyen “que comprende”, “que consiste,” y “que consiste esencialmente en” aspectos y modalidades.

El término "polinucleótido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a polímeros de ácido nucleico de hebra sencilla o de doble hebra de al menos 10 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxiribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Tales modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromouridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxiribosa, e modificaciones de conexiones internucleotídicas tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas de ADN de hebra sencilla y de doble hebra.

Un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna de sus combinaciones, que: (1) no se asocia con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) se conecta a un polinucleótido al que no se conecta en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Un "polipéptido aislado" es uno que: (1) carece de al menos algunos otros polipéptidos con los que normalmente se podría encontrar, (2) carece esencialmente de otros polipéptidos de la misma fuente, p.ej., de la misma especie, (3) es expresado por una célula de diferente especie, (4) ha sido separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, u otras sustancias que las que

se asocia en la naturaleza, (5) no se asocia (mediante interacción covalente o no covalente) con porciones de un polipéptido con las que el "polipéptido aislado" se asocia en la naturaleza, (6) se asocia operablemente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no se asocia en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Tal polipéptido aislado puede ser codificado por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el polipéptido aislado carece sustancialmente de polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que podrían interferir en su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, investigación o de otra índole).

Los anticuerpos de origen natural típicamente comprenden un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Los términos "cadena pesada" y "cadena ligera" según se utilizas en la presente memoria se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene suficiente secuencia de dominio variable para conferir especificidad por un antígeno diana. La porción amino-terminal de cada cadena ligera y pesada incluye típicamente un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es responsable típicamente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define típicamente un dominio constante responsable de la función efectora. De este modo, en un anticuerpo de origen natural, un polipéptido de inmunoglobulina cadena pesada completo incluye un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}), en donde el dominio VH está en el extremo amino-terminal del polipéptido y el dominio C_{H3} está en el extremo carboxilo-terminal, y una polipéptido de inmunoglobulina de cadena ligera completo incluye un dominio variable

(V_L) y un dominio constante (C_L), en donde el dominio VL está en el extremo amino-terminal del polipéptido y el dominio C_L está en el extremo carboxilo-terminal.

Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda, y las cadenas pesadas humanas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de un modo similar en subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas completas, los dominios variable y constante son conectados típicamente por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, p.ej., FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2ª ed., 1989), que se incorpora como referencia en su totalidad a todos los propósitos. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada típicamente forman un sitio de unión a antígeno. Los dominios variables de los anticuerpos de origen natural exhiben típicamente la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas conectadas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par son alineadas típicamente por las regiones marco, lo que puede posibilitar la unión a un epítopo específico. Desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal, ambos dominios variables de cadena ligera y pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4.

El término "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDR que aparecen en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema

descrito por Kabat (Kabat *et al*., SEQUENCES DE PROTEINS DE IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de restos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que proporciona límites para los restos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden ser referidas como CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol*. 196: 901-17; Chothia *et al*., 1989, *Nature* 342: 877-83) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se designaron L1, L2, y L3 o H1, H2, y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como CDR de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDR de Kabat. Otros límites que definen las CDR que se solapan con la CDR de Kabat han sido definidos por Padlan, 1995, *FASEB J*. 9: 133-39; MacCallum, 1996, *J. Mol. Biol*. 262(5): 732-45; y Lefranc, 2003, *Dev. Comp. Immunol*. 27: 55-77. Otras definiciones más de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas de la presente memoria, pero no obstante se solaparán con la CDR de Kabat, aunque se pueden acortar o alargar a la luz de la predicción o descubrimientos experimentales de que restos o grupos de restos concretos o incluso las CDR completas no repercuten significativamente en la unión del antígeno. Los métodos utilizados en la presente memoria pueden usar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en ciertas modalidades se utilizan las CDR definidas por Kabat o Chothia. La identificación de CDR pronosticadas utilizando la secuencia de aminoácidos es bien conocida en el sector, tal como en Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains", *In Antibody Engineering*, Vol. 2. Kontermann R., Dübel S., eds. Springer-Verlag, Berlín, pág. 33–51 (2010).

También se puede inspeccionar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o ligera para identificar las secuencias de las CDR por medio de otros métodos convencionales, p.ej., mediante comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Las secuencias numeradas se pueden alinear mediante examen visual, o empleando un programa de alineamiento tal como uno del paquete de programas CLUSTAL, como describe Thompson, 1994, *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-80. Convencionalmente se utilizan modelos moleculares para delinear correctamente las regiones marco y CDR y así corregir las asignaciones basadas en la secuencia.

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

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

según se utiliza en la presente memoria es genérico de las formar monomérica, dimérica, y multimérica.

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

Un fragmento F(ab') incluye típicamente una cadena ligera y a porción de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios C_{H1} y C_{H2}), de manera que se puede formar el enlace disulfuro intracatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula $F(ab')_2$.

El término "proteína de unión" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de origen no natural (o recombinante o modificado genéticamente) que se une específicamente a al menos un antígeno diana, p.ej., un polipéptido CD38 de la presente descripción

Una molécula "recombinante" es una que ha sido preparada, expresada, creada, o aislada por medios recombinantes.

Una modalidad de la descripción proporciona proteínas de unión que tienen especificidad biológica e inmunológica para entre uno y tres antígenos diana. Otra modalidad de la descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas que forman tales proteínas de unión. Otra modalidad de la descripción proporciona vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos

que codifican cadenas polipeptídicas que forman tales proteínas de unión. Otra modalidad más de la descripción proporciona células anfitrionas que expresan tales proteínas de unión (es decir, que comprenden moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican cadenas polipeptídicas que forman tales proteínas de unión).

El término "permutabilidad" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la intercambiabilidad de dominios variables dentro del formato de la proteína de unión y con retención del plegamiento y de la mayor afinidad de unión. "Permutabilidad completa" se refiere a la capacidad de intercambiar el orden de ambos dominios V_{H1} y V_{H2}, y por lo tanto el orden de los dominios V_{L1} y V_{L2}, en el cadena de polipéptido de formula I o la cadena de polipéptido de formula II (es decir, invertir el orden) a la vez que se mantiene la funcionalidad completa de la proteína de unión como se pone de manifiesto por la retención de la afinidad de unión. Además, se debe observar que las designaciones V_H y V_L se refieren únicamente a la localización del dominio en una cadena de proteína concreta en el formato final. Por ejemplo, V_{H1} y V_{H2} podrían obtenerse a partir de los dominios V_{L1} y V_{L2} en anticuerpos parentales y colocarse en las posiciones V_{H1} y V_{H2} en la proteína de unión. Asimismo, V_{L1} y V_{L2} podrían obtenerse a partir de los dominios V_{H1} y V_{H2} en los anticuerpos parentales y colocarse en las posiciones V_{H1} y V_{H2} en la proteína de unión. Así, las designaciones V_H y V_L se refieren a la presente localización y no a la localización original en un anticuerpo parental. Los dominios V_H y V_L son por lo tanto "permutables".

El término "antígeno" o "antígeno diana" o "diana antigénica" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula o una porción de una molécula que son susceptibles de unirse a una proteína de unión, y adicionalmente son susceptibles de utilizarse en un animal para producir anticuerpos susceptibles de unión a un epítopo de ese antígeno. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos. Con respecto a cada

antígeno diana reconocido por una proteína de unión, la proteína de unión es susceptible de competir con un anticuerpo intacto que reconoce el antígeno diana.

"CD38" es un grupo de polipéptidos de diferenciación 38 y es una glicoproteína encontrada en la superficie de muchas células inmunitarias. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une al dominio extracelular de uno o más polipéptidos CD38. Las secuencias de polipéptidos del dominio extracelular CD38 ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, el dominio extracelular de CD38 humano (p.ej., según se representa mediante SEQ ID NO: 1) y el dominio extracelular de CD38 de mono cinomolgo (p.ej., según se representa mediante SEQ ID NO: 30).

El término "acoplador de células T" se refiere a proteínas de unión dirigidas al sistema inmunitario de un anfitrión, más específicamente a la actividad citotóxica de las células T, así como a las dirigidas a una proteína diana tumoral.

El término "proteína de unión monoespecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a una diana antigénica.

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

El término "proteína de unión biespecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a dos dianas antigénicas diferentes. En algunas modalidades, una proteína de unión biespecífica se une a dos antígenos diferentes. En algunas modalidades, una proteína de unión biespecífica se une a dos epítopos diferentes sobre el mismo antígeno.

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

El término "proteína de unión triespecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a tres dianas antigénicas diferentes. En algunas

modalidades, una proteína de unión triespecífica se une a tres antígenos diferentes. En algunas modalidades, una proteína de unión triespecífica se une a uno, dos, o tres epítopos diferentes sobre el mismo antígeno.

El término " proteína de unión trivalente" se refiere a una proteína de unión que tiene tres sitios de unión. En modalidades concretas la proteína de unión trivalente se puede unir a una diana antigénica. En otras modalidades, la proteína de unión trivalente se puede unir a dos dianas antigénicas. En otras modalidades, la proteína de unión trivalente se puede unir a tres dianas antigénicas.

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

Los términos "sustancialmente puro" o "sustancialmente purificado" según se utiliza en la presente memoria se refieren a un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunas modalidades, una fracción

sustancialmente purificada es una composición en donde la especie comprende al menos aproximadamente 50% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras modalidades, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de todas las especies macromolares presentes en la composición. En otras modalidades más, la especies se purifica hasta la homogeneidad esencial (no se detectan especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consistes esencialmente de una sola especie macromolecular.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un polipéptido determinante, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas modalidades, los determinantes de epítopo incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo, y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo o proteína de unión. En ciertas modalidades, se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando esta reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En algunas modalidades, se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-8}$ M, más preferiblemente cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-9}$ M, y lo más preferiblemente cuando la constante de disociación es $\leq 10^{-10}$ M.

La constante de disociación (K_D) de una proteína de unión se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial. Generalmente, el análisis de resonancia de plasmón superficial mide las interacciones de unión en tiempo real entre el

ligando (un antígeno diana en una matriz biosensora) y el analito (una proteína de unión en solución) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). El análisis de plasmón superficial también se puede realizar inmovilizando el analito (proteína de unión sobre una matriz biosensora) y presentando el ligando (antígeno diana). El término "K_D," según se utiliza en la presente memoria se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión y un antígeno diana concretos.

El término "se une a" según se utiliza en la presente memoria en referencia a una proteína de unión se refiere a la capacidad de una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma para unirse a un antígeno que contiene un epítopo con una Kd de al menos aproximadamente $1x10^{-6}$ M, $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-8}$ M, $1x10^{-9}$ M, $1x10^{-10}$ M, $1x10^{-11}$ M, $1x10^{-12}$ M, o más, y/o para unirse a un epítopo con una afinidad que es al menos dos veces mayor que son afinidad por un antígeno no específico. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a dos o más antígenos, p.ej., un polipéptido CD38 humano y uno de mono cinomolgo.

En algunas modalidades, un dominio de unión a antígeno y/o proteína de unión de la presente descripción “reacciona de manera cruzada” con polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo, p.ej., dominios extracelulares CD38, tales como SEQ ID NO: 1 (isoforma A humana de CD38), SEQ ID NO: 105 (isoforma E humana de CD38) y SEQ ID NO: 30 (CD38 de mono cinomolgo). Una proteína de unión que se une al antígeno 1 (Ag1) “reacciona de manera cruzada” con el antígeno 2 (Ag2) cuando las CE50 se encuentran en un rango similar para ambos antígenos. En la presente solicitud, una proteína de unión que se une a Ag1 reacciona de manera cruzada con Ag2 cuando la razón de afinidad de Ag2 con respecto a la razón de afinidad de Ag1 es igual o menor que 10 (por ejemplo 5, 2, 1 o 0,5), midiéndose las afinidades con el mismo método para ambos antígenos.

Una proteína de unión que se une a Ag1 “no reacciona de manera cruzada significativamente” con Ag2 cuando las afinidades son muy diferentes para los dos antígenos. La afinidad por Ag2 puede no ser medible si la respuesta de unión es demasiado baja. En la presente solicitud, una proteína de unión que se une a Ag1 no reacciona de manera cruzada significativamente con Ag2, cuando la respuesta de unión de la proteína de unión a Ag2 es menor que 5% de la respuesta de unión de la misma proteína de unión a Ag1 en el mismo entorno experimental y a la misma concentración de anticuerpo. En la práctica, la concentración la proteína de unión utilizada puede ser la CE50 o la concentración requerida para alcanzar la meseta de saturación obtenida con Ag1.

El término "conector" según se utiliza en la presente memoria se refiere a uno o más restos de aminoácido insertados entre los dominios de inmunoglobulina para proporcionar suficiente movilidad a los dominios de las cadenas ligera y pesada para que se plieguen a inmunoglobulinas de región variable dual entrecruzada. Se inserta un conector en la transición entre dominios variables o entre dominios variables y constantes, respectivamente, a nivel de secuencia. La transición entre dominios se puede identificar debido a que el tamaño aproximado de los dominios inmunoglobulina es bien conocido. la localización precisa de una transición de dominio se puede determinar localizando tramos de péptidos que no forman elementos estructurales secundarios tales como láminas beta o hélices alfa como se demuestra mediante datos experimentales o como se puede suponer mediante técnicas de modelado o predicción de la estructura secundaria. Los conectores descritos en la presente memoria son referidos como L_1, que está localizado en la cadena ligera entre el extremo C-terminal del dominio V_{L2} y el extremo N-terminal del dominio V_{L1}; y L_2, que está localizado en la cadena ligera entre el extremo C-terminal del dominio V_{L1} y el extremo N-terminal del dominio C_L. Los conectores de la cadena pesada

son conocidos como L_3, que está localizado entre el extremo C-terminal del dominio V_{H1} y el extremo N-terminal del dominio V_{H2}; y L_4, que está localizado entre el extremo C-terminal del dominio V_{H2} y el extremo N-terminal del dominio C_{H1}.

El término "vector" según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier molécula (p.ej., ácido nucleico, plásmido, o virus) que se utiliza para transferir información codificante a una célula anfitriona. El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido conectado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula ADN circular de doble hebra en la que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden insertar en el genoma viral segmentos de ADN adicionales. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (p.ej., vectores de mamíferos no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona después de la introducción en la célula anfitriona y por lo tanto se replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son susceptibles de dirigir la expresión de genes a los que se conectan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente memoria como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinantes están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria, puesto que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, se pretende que la descripción incluya otra forma de vectores de expresión, tales como vectores virales (p.ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus, y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

La frase "célula anfitriona recombinante" (o "célula anfitriona") según se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se pretende que una célula anfitriona recombinante o una célula anfitriona se refieran no solo a la célula sujeto concreta, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias medioambientales, tal progenie puede no ser idéntica, de hecho, a la célula parental, pero tales células todavía están incluidas dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria. Se puede utilizar una amplia variedad de sistemas de expresión de células anfitrionas para expresar las proteínas de unión, incluyendo sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, baculovirales, y de mamífero (así como sistemas de expresión de presentación en fagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar una proteína de unión recombinantamente, una célula anfitriona es transformada o transfectada con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas polipeptídicas de la proteína de unión de manera que las cadenas polipeptídicas son expresadas en la célula anfitriona y, preferiblemente, secretadas al medio en el que se cultivan las células anfitrionas, de cuyo medio se puede recuperar la proteína de unión.

El término "transformación" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula ha sido transformada cuando ha sido modificada para que contenga un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula es transformada cuando es modificada genéticamente a partir de su estado nativo. Después de la transformación, el ADN transformante se puede recombinar con el de la célula integrándolo físicamente en un cromosoma de la célula, o se pueden mantener transitoriamente como un elemento episómico sin ser replicado, o se puede replicar

independientemente como un plásmido. Se considera que una célula ha sido transformada establemente cuando el ADN es replicado con la división de la célula. El término "transfección" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. Son bien conocidas en la técnica varias técnicas de transfección. Tales técnicas se pueden utilizar para introducir una o más moléculas de ADN exógenas en células anfitrionas adecuadas.

El término "de origen natural" según se utiliza en la presente memoria y aplicado a un objeto se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza y no ha sido manipulado por el hombre. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente es de origen natural. De un modo **s**imilar, "de origen no natural" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un objeto que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

Según se utiliza en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Los estereoisómeros (p.ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales y análogos tales como aminoácidos α,α-disustituidos, N-alquilados, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetil-lisina, ε-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p.ej., 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptido utilizada en la presente memoria, la dirección hacia la derecha es

la dirección amino-terminal y la dirección hacia la izquierda es la dirección carboxilo-terminal, de acuerdo con el uso y la convención establecidos.

Los restos de origen natural se pueden dividir en clases basándose en las propiedades de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;

(2) hidrófilos polares: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;

(3) alifáticos: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;

(4) hidrófobos alifáticos: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;

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

(6) ácidos: Asp, Glu;

(7) básicos: His, Lys, Arg;

(8) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y

(10) aromáticos hidrófobos: Phe, Trp, Tyr.

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

Un experto en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de una cadena de polipéptido que se pueden cambiar sin destruir la actividad localizando regiones que no se consideran importantes para la actividad. Alternativamente, un experto en la técnica puede identificar restos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Además, zonas homogéneas que pueden ser importantes para la actividad

biológica o para la estructura pueden ser sujeto de sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

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

Los términos "tratamiento" o "tratar" según se utiliza en la presente memoria se refieren tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Los que tienen necesidad de tratamiento incluyen aquellos que tienen un trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. En modalidades concretas, se pueden utilizar proteínas de unión para tratar seres humanos con cáncer, o seres humanos susceptibles de padecer cáncer, o para mejorar el cáncer en un sujeto humano. Las proteínas de unión también se pueden utilizar para prevenir el cáncer en un paciente humano. En modalidades concretas, el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de mama tal como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, linfoma centro germinal de células B o leucemia linfoblástica aguda de células B.

Los términos "composición farmacéutica" o "composición terapéutica" según se utilizan en la presente memoria se refieren a un compuesto o composición capaces de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administran apropiadamente a un paciente.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador fisiológicamente aceptable" según se utiliza en la presente memoria se refiere a uno o más materiales de formulación adecuados para completar o potenciar el suministro de una proteína de unión.

Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" cuando se utilizan en referencia a una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de unión se refieren a una cantidad o dosificación suficiente para producir un resultado terapéutico deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de una proteína de unión suficiente para inhibir, durante cierto período de tiempo, uno o más de los procesos patológicos definidos clínicamente asociados con la afección que se esté tratando. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de la proteína de unión específica que se esté utilizando, y también depende de una variedad de factores y condiciones relacionadas con el paciente que se esté tratando y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si la proteína de unión se debe administrar *in vivo*, factores tales como la edad, el peso, y la salud del paciente así como datos de curvas de respuesta a la dosis y toxicidad obtenidos en el trabajo preclínico con animales podrían estar entre esos factores considerados. La determinación de una cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica determinada es perfectamente asumible por los expertos en la técnica.

Una modalidad de la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión.

II. Proteínas de Unión Anti-CD38

Ciertos aspectos de la presente descripción se refiere a proteínas de unión que comprenden un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38 (p.ej., polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo). En algunas modalidades, las proteínas de unión son monoespecíficas y/o monovalentes, biespecíficas y/o bivalentes, triespecíficas y/o trivalentes, o multiespecíficas y/o multivalentes.

Una variedad de características de proteínas de unión monoespecíficas, biespecíficas, o triespecíficas ilustrativas se describen en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas modalidades, una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma reacciona de manera cruzada con CD38 humano (p.ej., un polipéptido de la isoforma A y/o la isoforma E de CD38 humano) y CD38 de mono cinomolgo. En algunas modalidades, una proteína de unión induce apoptosis de una célula CD38+. En algunas modalidades, una proteína de unión recluta una célula T a una célula CD38+ y opcionalmente activa la célula T (p.ej., a través de estimulación y/o coestimulación de TCR).

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

IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDR de una secuencia del dominio VH y/o VL de anticuerpo de mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5, mAb6, IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid, IgG1 LALA P329A mAb2xCD28supxCD3mid, IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid, IgG4 FALA mAb6xCD28supxCD3mid, IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid, o IgG1 NNSA mAb6xCD28supxCD3mid, como se muestra en la Tabla G, H, o I.

En algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En otras modalidades, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la

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

En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 87), o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 94); y donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96). En algunas modalidades, el

dominio VL comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3-CDR-L3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 97); donde FR2 comprende la secuencia MHWYQQKPGQPPRLLIY (SEQ ID NO: 99); donde FR3 comprende la secuencia SRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 101); y donde FR4 comprende la secuencia FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 103).

En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos

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

En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al

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

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

NO: 18. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que

comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 89); donde FR2 comprende la secuencia MHWVRQAPGKGLEWVAV (SEQ ID NO: 92); donde FR3 comprende la secuencia YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC (SEQ ID NO: 95); y donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO: 98); donde FR2 comprende la secuencia GWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 100); donde FR3 comprende la secuencia SLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISGLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 102); y donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 104).

En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%,

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

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

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

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 secuencias CDR de una secuencia de anticuerpo mostrada en la Tabla G. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 secuencias CDR, una secuencia de dominio VH, y/o una secuencia de dominio VL de una secuencia de anticuerpo mostrada en la Tabla H. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 secuencias CDR, una secuencia de dominio VH, y/o una secuencia de dominio VL de una secuencia de anticuerpo mostrada en la Tabla I. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende 1, 2, 3, o 4 secuencias de polipéptido mostradas en la Tabla I.

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

Ab	**CDR_H1**	**CDR_H2**	**CDR_H3**	**CDR_L1**	**CDR_L2**	**CDR_L3**
mAb1	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb2	GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37)	IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39)	GAS (SEQ ID NO: 40)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb3	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb4	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb5	GYTFTSFN	IYPGNGGT	ARTGGLRRAYFTY	ESVDSYGNGF	LAS	QQNKEDPWT

	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 36)
mAb6	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42)	ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43)	QGIRND (SEQ ID NO: 44)	AAS (SEQ ID NO: 45)	LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46)

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

Ab	**VH (proteína)**	**VL (proteína)**
mAb1	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKAS **GYTFTSFN**MHWVKETPGQGLEWIGY**I YPGNGGT**NYNQKFKGKATLTADTSS STAYMQISSLTSEDSAVYFC**ARTGGL RRAYFTY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 5)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRA S**ESVDSYGNGF**MHWYQQKPGQP PKLLIY**LAS**NLESGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEADDAATYYC**QQN KEDPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 6
mAb2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS **GYTFTSYA**MHWVKEAPGQRLEWIGY **IYPGQGGT**NYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFC**ARTGGL RRAYFTY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRA S**QSVSSYGQGF**MHWYQQKPGQP PRLLIY**GAS**SRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPE DFAVYYC**QQNKEDPWT**FGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 14)
mAb3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS **GYTFTSFN**MHWVKEAPGQRLEWIGY**I YPGNGGT**NYNQKFQGRATLTADTSA	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRA S**ESVDSYGNGF**MHWYQQKPGQP PRLLIY**LAS**SRAT

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
	STAYMELSSLRSEDTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17)	GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYC**QQNKEDPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
mAb4	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS**GYTFTSFN**MHWVKEAPGQGLEWIGY**IYPGNGGT**NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRAS**ESVDSYGNGF**MHWYQQKPGQPPRLLIY**LAS**SRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYC**QQNKEDPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
mAb5	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS**GYTFTSFN**MHWVKEAPGQRLEWIGY**IYPGNGGT**NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRAS**ESVDSYGNGF**MHWYQQKPGQPPRLLIY**LAS**SRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYC**QQNKEDPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
mAb6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAV**IWYDGSNK**YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARMFRGAFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QGIRND**LGWYQQKPGKAPKLLIY**AAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYC**LQDYIYYPT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)
mAb7	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKS	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGAGTD

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
	SKTVYMHLSSLASEDSAVYYCARGD YYGSNSLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:47)	FTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSP PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 48)
Anti-CD28$_{sup}$	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS **GYTFTSYY**IHWVRQAPGQGLEWIGS**I YPGNVNT**NYAQKFQGRATLTVDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYC**TRSHYGL DWNFDV**WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQ AS**QNIYVW**LNWYQQKPGKAPKLLI Y**KAS**NLHTGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDIATYYC**QQGQTYP YT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:50)
Anti-CD28$_{cvn}$	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**G FSLSDYG**VHWVRQPPGKGLEWLGV**I WAGGGT**NYNPSLKSRKTISKDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARDKGYS YYYSMDY**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 51)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCR AS**ESVEYYVTSL**MQWYQQKPGQ PPKLLIF**AAS**NVESGVPARFSGSG SGTDFTLTINPVEANDVANYYC**QQ SRKVPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 52)
Anti-CD3$_{mid}$	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS **GFTFTKAW**MHWVRQAPGKQLEWVA Q**IKDKSNSYAT**YYADSVKGRFTISRD DSKNTAMENTELQMNSLRAEDTAVY YC**RGVYYALSPFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 53)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK SS**QSLVHNNANTY**LSWYLQKPGQ SPQSLIY**KVS**NRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**G QGTQYPFT**FGSGTKVEIK (SEQ ID NO: 54)
Anti-CD3$_{low}$	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS **GFTFTKAW**MHWVRQAPGKGLEWVA Q**IKDKSNSYAT**YYADSVKGRFTISRD	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK SS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPG QSPQLLIY**KVS**NRFSGVPDRFSGS

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
	NSKNTAMENTELQMNSLRAEDTAVY YCR**GVYYALSPFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 84)	GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**G QGTQYPFT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85)

Nota: las secuencias de CDR están en negrita y subrayadas en las secuencias de aminoácidos anteriores.

Tabla I. Secuencias completas de proteínas de unión.

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (p.ej., una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVTV SSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAMEN TELQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFD YWGQGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLG	**SEQ ID NO: 60**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVH NNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYVW LNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGQ TYPYTFGQGTKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	**SEQ ID NO: 61**
Cadena Pesada 2 mAb2 IgG4(botón) FALA	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT	**SEQ ID NO: 62**

(p.ej., una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC QEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLG	
Cadena Ligera 2 mAb2 (p.ej., una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSS YGQGFMHWYQQKPGQPPRLLIYGASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	**SEQ ID NO: 63**
IgG1 LALA P329A mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG1(ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (p.ej., una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVTV SSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAMEN TELQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFD YWGQGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 64**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 61**
Cadena Pesada 2 mAb2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF	**SEQ ID**

IgG1(botón) LALA P329A (p.ej., una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	**NO: 65**
Cadena Ligera 2 mAb2 (p.ej., una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 63**
IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 CD28supxCD3mid IgG1(ojal) NNSA (p.ej., una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVTV SSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAMEN TELQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFD YWGQGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNNASRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 66**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 61**
Cadena Pesada 2 mAb2 IgG1(botón) NNSA (p.ej., una tercera cadena	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS	**SEQ ID NO: 67**

polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	
Cadena Ligera 2 CD38V_{H1} (p.ej., una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 63**
IgG4 FALA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (p.ej., una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 60**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 61**
Cadena Pesada 2 mAb6 IgG4(botón) FALA (p.ej., una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTAMENTELQ MNSLRAEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLG	**SEQ ID NO: 68**
Ligera 2 mAb6 (p.ej., una cuarta cadena	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIR NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP	**SEQ ID NO: 69**

polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	SRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCL QDYIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	
IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG1(ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (p.ej., una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 64**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 61**
Cadena Pesada 2 mAb6 IgG1(botón) LALA P329A (p.ej., una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTAMENTELQ MNSLRAEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 70**
Ligera 2 mAb6 (p.ej., una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 69**
IgG1 NNSA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 CD28supxCD3mid IgG1(ojal) NNSA (p.ej., una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 66**

Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 61**
Cadena Pesada 2 mAb6 IgG1(botón) NNSA (p.ej., una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTAMENTELQ MNSLRAEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 71**
Ligera 2 mAb6 (p.ej., una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 69**
Anticuerpo monovalente mAb1		
Cadena Pesada mAb1	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTF TSFNMHWVKETPGQGLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTS EDSAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	**SEQ ID NO: 7**
Cadena Ligera mAb1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YGNGFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTY	**SEQ ID NO: 8**

	SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
Anticuerpo monovalente mAb2		
Cadena Pesada mAb2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	**SEQ ID NO: 15**
Cadena Ligera mAb2	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSS YGQGFMHWYQQKPGQPPRLLIYGASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 16**
Anticuerpo monovalente mAb3		
Cadena Pesada mAb3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	**SEQ ID NO: 19**
Cadena Ligera mAb3	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDS YGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV	**SEQ ID NO: 20**

	QWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
Anticuerpo monovalente mAb4		
Cadena Pesada mAb4	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQGLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	**SEQ ID NO: 22**
Cadena Ligera mAb4	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDS YGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 20**
Anticuerpo monovalente mAb5		
Cadena Pesada mAb5	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	**SEQ ID NO: 24**
Cadena Ligera mAb5	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDS YGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF	**SEQ ID NO: 20**

	IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
Anticuerpo monovalente mAb6		
Cadena Pesada mAb6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL AGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG	**SEQ ID NO: 11**
Cadena Ligera mAb6	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIR NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP S RFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQ DYIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	**SEQ ID NO: 12**
Anticuerpo monovalente mAb7		
Cadena Pesada mAb7	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTF TDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGD TGYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSSLA SEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	**SEQ ID NO: 107**
Cadena Ligera mAb7	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVS TVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPD	**SEQ ID NO: 106**

	RFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQ HYSPPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	

Tabla J. Secuencias de polinucleótidos completas de proteínas de unión.

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAG GTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCA GCTACTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCC CTGGACAGGGACTGGAATGGATCGGCAGCA TCTACCCCGGCAACGTGAACACCAACTACGC CCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGAC CGTGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACAT GGAACTGAGCCGGCTGAGAAGCGACGACAC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCCCACTAC GGCCTGGATTGGAACTTCGACGTGTGGGGC AAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTAGCAGC CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTG AGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACC AAGGCCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAG ATCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCACCT ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTCGGGGCG TGTACTATGCCCTGAGCCCCTTCGATTACTG GGGCCAGGGAACCCTCGTGACCGTGTCTAG TCGGACCGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGT GTTCCCTCTGGCCCCTTGCAGCAGAAGCAC CAGCGAATCTACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGAC CGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAG CGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTCCA GAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGT CGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCAC CAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCTT GCCCAGCCCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCT CCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGA	**SEQ ID NO: 72**

	AGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTG GACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCT ACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCA GCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAAGTGTGTAC CCTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAA AGGCTTCTACCCCAGCGACATTGCCGTGGAA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGA CCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCA ACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCT GTCTCTGTCCCTGGGC	
	Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGC CTGAGCGTGACACCTGGACAGCCTGCCAGC ATCAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGGTG CACAACAACGCCAACACCTACCTGAGCTGGT ATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGT CCCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTCAG CGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCAGCGG CTCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGC CGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTAC TATTGTGGCCAGGGCACCCAGTACCCCTTCA CCTTTGGCAGCGGCACCAAGGTGGAAATCA AGGGCCAGCCCAAGGCCGCCCCCGACATCC AGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTG CCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT GTCAGGCCAGCCAGAACATCTACGTGTGGC TGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGG CCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAA CCTGCACACCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCT GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTG ACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACATTG CCACCTACTACTGCCAGCAGGGCCAGACCT ACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCT GGAAATCAAGACCAAGGGCCCCAGCCGTAC GGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCA CCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACA GCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCT ACCCCCGCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGG TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGG ACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC ACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA GGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGG	**SEQ ID NO: 73**

	CCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAGTGT	
Cadena Pesada 2 mAb2 IgG4(botón) FALA (p.ej., que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCA GCTACGCCATGCACTGGGTCAAAGAGGCCC CTGGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCTACA TCTACCCCGGCCAGGGCGGCACCAACTACA ACCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGA CCGCCGATACAAGCGCCAGCACCGCCTACA TGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAACAGGCG GCCTGAGGCGGGCCTACTTTACCTATTGGG GCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCG CTAGCACAAAGGGCCCATCGGTGTTCCCTCT GGCCCCTTGCAGCAGAAGCACCAGCGAATC TACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCAC ACCTTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGC CTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACA CCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAATCTAAGT ACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGCCC CTGAAGCTGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCC TGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGT GGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGA GGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCTCCAT CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCCCGCGAGCCTCAAGTGTATACCCTGCC CCCTTGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGTGGTGTCTCGTGAAAGGCTTC TACCCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAG AGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAG ACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGC TCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGG ACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGT TCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCT GTCCCTGGGC	**SEQ ID NO: 74**
Cadena Ligera 2 mAb2 (p.ej., que codifica una cuarta cadena polipeptídica	GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCACC CTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC ATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTCC	**SEQ ID NO: 75**

de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	AGCTACGGCCAGGGCTTCATGCACTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCCAGACTGC TGATCTATGGCGCCAGCAGCAGAGCCACAG GCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCTCTGGCAG CGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCCC CCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGAACAAAGAGGACCCCTGGAC CTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA GCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCAT CTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAG CACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGATTACGA GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGAC CCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	
IgG1 LALA P329A mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG1(ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAG GTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCA GCTACTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCC CTGGACAGGGACTGGAATGGATCGGCAGCA TCTACCCCGGCAACGTGAACACCAACTACGC CCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGAC CGTGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACAT GGAACTGAGCCGGCTGAGAAGCGACGACAC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCCCACTAC GGCCTGGATTGGAACTTCGACGTGTGGGGC AAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTAGCAGC CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTG AGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACC AAGGCCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAG ATCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCACCT ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTCGGGGCG TGTACTATGCCCTGAGCCCCTTCGATTACTG GGGCCAGGGAACCCTCGTGACCGTGTCTAG TCGGACCGCCAGCACAAAGGGCCCCAGCGT GTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCAC ATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGAC CGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCA	**SEQ ID NO: 76**

	GTCCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGT CGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG GAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAAGCCGCC GGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAA AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA CCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATG TGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAACAGTA CAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGG CAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG GCCCTGGCCGCCCCCATCGAGAAAACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCC CAGGTGTGCACACTGCCCCCAAGCAGGGAC GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGC TGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATA TCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGGT GTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 73**

Cadena Pesada 2 mAb2 IgG1(botón) LALA P329A (p.ej., que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCA GCTACGCCATGCACTGGGTCAAAGAGGCCC CTGGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCTACA TCTACCCCGGCCAGGGCGGCACCAACTACA ACCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGA CCGCCGATACAAGCGCCAGCACCGCCTACA TGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAACAGGCG GCCTGAGGCGGGCCTACTTTACCTATTGGG GCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCG CTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCT GGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGG AACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AATTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTT GTCCTGCCCCCGAAGCCGCCGGAGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGA GGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG GACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCAAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCT ACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCG CCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACAC ACTGCCCCCATGCAGGGACGAGCTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAA GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAAT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACT ACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCG ACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGAC AGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGC	**SEQ ID NO: 77**
Cadena Ligera 2 mAb2 (p.ej., que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 75**

descripción)		
IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 CD28supxCD3mid IgG1(ojal) NNSA (p.ej., que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAG GTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCA GCTACTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCC CTGGACAGGGACTGGAATGGATCGGCAGCA TCTACCCCGGCAACGTGAACACCAACTACGC CCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGAC CGTGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACAT GGAACTGAGCCGGCTGAGAAGCGACGACAC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCCCACTAC GGCCTGGATTGGAACTTCGACGTGTGGGGC AAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTAGCAGC CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTG AGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACC AAGGCCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAG ATCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCACCT ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTCGGGGCG TGTACTATGCCCTGAGCCCCTTCGATTACTG GGGCCAGGGAACCCTCGTGACCGTGTCTAG TCGGACCGCCAGCACAAAGGGCCCCAGCGT GTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCAC ATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGAC CGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCA GTCCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGT CGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG GAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGG GAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGAC CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGT GTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAACAGTAC AACAATGCCTCCCGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGG CCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCA GGTGTGCACACTGCCCCCAAGCAGGGACGA	**SEQ ID NO: 78**

	GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTG TGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTC CAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 73**
Cadena Pesada 2 mAb2 IgG1(botón) NNSA (p.ej., que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCA GCTACGCCATGCACTGGGTCAAAGAGGCCC CTGGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCTACA TCTACCCCGGCCAGGGCGGCACCAACTACA ACCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGA CCGCCGATACAAGCGCCAGCACCGCCTACA TGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAACAGGCG GCCTGAGGCGGGCCTACTTTACCTATTGGG GCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCG CTAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTTGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAATGCCTCC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC	**SEQ ID NO: 79**

	CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAA TCAAGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTAAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACTCAAAACTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGT	
Cadena Ligera 2 mAb2 (p.ej., que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 75**
IgG4 FALA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 72**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 73**
Cadena Pesada 2 mAb6 IgG4(botón) FALA (p.ej., que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGG CGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGACT GAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCCGT GATTTGGTACGACGGCAGCAACAAGTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATC AGCGGCGACAACAGCAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATGTTCA GAGGCGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA CACTCGTGACCGTGTCTAGTGCGTCGACCAA GGGCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCTTG CAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGC CCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCC	**SEQ ID NO: 80**

	GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGC GCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCA GCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCCTGTACTCT CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGC AGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAAC GTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGCGGGTGGAATCTAAGTACGGCCCT CCCTGCCCTCCTTGCCCAGCCCCTGAAGCT GCCGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCC CCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC CGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAG TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA CAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCG AGCCTCAAGTGTATACCCTGCCCCCTTGCCA GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GTGGTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCAGC GACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGC CAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCC GGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCAGCTGCT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGG C	
Ligera 2 mAb6 (p.ej., que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCCGG AACGACCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCT GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCC GCTAGCTCTCTGCAGTCCGGCGTGCCCAGC AGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGAC TTCACCCTGACAATCTCTGGCCTGCAGCCCG AGGACAGCGCCACCTACTACTGTCTGCAAGA CTACATCTACTACCCCACCTTCGGCCAGGGC ACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCTAGCG ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCG CGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAA CGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAG CGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTC	**SEQ ID NO: 81**

	TAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG CGAGTGT	
IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 IgG1(ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 76**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 73**
Cadena Pesada 2 mAb6 IgG1(botón) LALA P329A (p.ej., que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGG CGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGACT GAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCCGT GATTTGGTACGACGGCAGCAACAAGTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATC AGCGGCGACAACAGCAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATGTTCA GAGGCGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA CACTCGTGACCGTGTCTAGTGCGTCGACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAG CAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGC CCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCA GCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGC TCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCC CGAAGCCGCCGGAGGCCCTTCCGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGT GGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGA AGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGA GAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTG	**SEQ ID NO: 82**

	GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCCCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCC CCATGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCT ACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGA CCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCT CATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGA CAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGC	
Ligera 2 mAb6 (p.ej., que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 81**
IgG1 NNSA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 CD28supxCD3mid IgG1(ojal) NNSA (p.ej., que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 78**
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p.ej., que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 73**
Cadena Pesada 2 mAb6 IgG1(botón) NNSA (p.ej., que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGG CGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGACT GAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCCGT GATTTGGTACGACGGCAGCAACAAGTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATC AGCGGCGACAACAGCAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATGTTCA GAGGCGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA	**SEQ ID NO: 83**

	CACTCGTGACCGTGTCTAGTGCGTCGACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGG CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTATGTTGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAATGCCTCCCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGC CGGGATGAGCTGACCAAGAATCAAGTCAGC CTGTGGTGCCTGGTAAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACTCAAAACTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GT	
Ligera 2 mAb6 (p.ej., que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente descripción)	Véase más arriba.	**SEQ ID NO: 81**

Polipéptidos CD38

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono

cinomolgo. Los ensayos ilustrativos para determinar si un sitio de unión a antígeno se une a un antígeno se describen en la presente memoria y son conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la unión se determina mediante ensayo ELISA, p.ej., como se describe más abajo. En algunas modalidades, la unión se determina mediante ensayo SPR, p.ej., como se describe más abajo. En algunas modalidades, la unión se determina mediante ensayo de citometría de flujo utilizando células que expresan un polipéptido CD38 sobre su superficie celular, p.ej., como se describe más abajo. Véanse, p.ej., los Ejemplos 1, 3, y 4.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido purificado o fragmento del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 30 (p.ej., según se mide mediante ELISA o SPR). En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 30 cuando se expresa en la superficie de una célula (p.ej., según se mide mediante citometría de flujo).

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido de la isoforma A de CD38 (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1). En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido de la isoforma E de CD38 (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y no comprende la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105). En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido de la isoforma A de CD38 (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y un polipéptido de la

isoforma E de CD38 (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y no comprende la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105). Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la unión a un polipéptido de la isoforma E de CD38 puede ser ventajosa, p.ej., en el direccionamiento de una proteína de unión de la presente descripción a una o varias célula que expresan un polipéptido de la isoforma E de CD38.

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

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKH PCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLT WCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIF DKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNI YRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de polipéptido de la isoforma E de CD38 humano

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKH PCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLT WCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRHFWECGSP (SEQ ID NO: 105)

En algunas modalidades, el dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

Secuencia de polipéptido CD38 de mono Cynomolgus

RWRQQWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKY PCNITEEDYQPLVKLGTQTVPCNKTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDL

TWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKI
FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCK
NIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI (SEQ ID NO: 30)

Proteínas de unión multiespecíficas (p.ej., biespecíficas, triespecíficas, o multiespecíficas) que se unen polipéptidos CD38

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

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción es una proteína de unión triespecífica que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a uno o más polipéptidos CD38, un segundo sitio de unión a antígeno, y un tercer sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, en algunas modalidades, uno de los sitios de unión a antígeno se une a uno o más polipéptidos CD38 (p.ej., el dominio extracelular de un ser humano y/o polipéptido CD38 de mono cinomolgo), y uno o dos de los sitios de unión a antígeno se unen a una proteína de superficie de células T. En algunas modalidades, uno de los sitios de unión a antígeno se une a uno o más polipéptidos CD38 (p.ej., el dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y/o de mono cinomolgo), uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 humano, y uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 humano. Los polipéptidos CD3 y CD28 humanos son conocidos en la técnica. La secuencia de aminoácidos de dominios variables de

anticuerpo ilustrativos y no limitantes que se unen polipéptidos CD3 y CD28 humano se proporcionan en la presente memoria.

En algunas modalidades, en la presente memoria se proporcionan proteínas de unión que comprenden tres sitios de unión a antígeno que se unen cada uno a una o más proteínas diana. En algunas modalidades, al menos uno de los tres sitios de unión a antígeno se une a un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo. En algunas modalidades, el polipéptido CD38 humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o el polipéptido CD38 de mono cinomolgo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo y dos sitios de unión a antígeno que se unen cada uno a una proteína de superficie de células T (p.ej., un polipéptido CD28 humano y/o un polipéptido CD3 humano).

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a una o más proteínas diana tumorales (p.ej., una o más polipéptidos CD38) y una o más proteínas diana de células T. En algunas modalidades, la proteína de unión es capaz de unirse a una proteína diana tumoral (p.ej., uno o más polipéptidos CD38) y dos epítopos diferentes en una sola proteína diana de células T. En algunas modalidades, la proteína de unión es capaz de unirse a una proteína diana tumoral (p.ej., uno o más polipéptidos CD38) y dos proteínas diana de células T diferentes (p.ej., CD28 y CD3). En algunas modalidades, la proteína de unión es capaz de unirse a una proteína diana de células T y dos epítopos diferentes en una sola proteína diana tumoral (p.ej., uno o más polipéptidos CD38). En algunas modalidades, la proteína de unión es capaz de unirse a una proteína diana de células T y dos proteínas diana tumorales diferentes (p.ej., uno o

más polipéptidos CD38 y otra proteína diana tumoral). En algunas modalidades, la primera y segunda cadenas polipeptídicas de la proteína de unión forman dos sitios de unión a antígeno que eligen como diana dos proteínas diana de células T, y la tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión forman un sitio de unión a antígeno que se une a uno o más polipéptidos CD38. En algunas modalidades, la primera y segunda cadenas polipeptídicas de la proteína de unión forman dos sitios de unión a antígeno que eligen como diana dos proteínas diana tumorales (p.ej., uno o más polipéptidos CD38 y otra proteína diana tumoral), y la tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión forman un sitio de unión a antígeno que se une a una proteína diana de células T. En algunas modalidades, las una o más proteínas diana de células T son uno o más de CD3 y CD28.

En algunas modalidades, las proteínas de unión se unen específicamente a uno o más polipéptidos CD38 y una o más proteínas diana en una T-célula incluyendo un complejo receptor de células T. Estas proteínas de unión acopladoras de células T son susceptibles de reclutar células T transitoriamente a células diana y, al mismo tiempo, activar, la actividad citolítica de las células T. Los ejemplos de proteínas diana sobre células T incluyen pero no se limitan a CD3 y CD28, entre otras. Ejemplos adicionales de tales dianas antigénicas o proteínas diana se proporcionan más arriba. En algunas modalidades, las proteínas de unión triespecíficas se pueden generar combinando los dominios de unión a antígeno de dos o más anticuerpos monoespecíficos (anticuerpos parentales) en un anticuerpo.

Formatos de proteína de unión biespecífica

En algunas modalidades, la proteína de unión de la descripción es una proteína de unión biespecífica y/o bivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (p.ej., dos) dianas

antigénicas o proteínas diana diferentes (p.ej., que tienen una estructura descrita en la Publicación Internacional Núm. WO2012/135345). En algunas modalidades, la proteína de unión es bivalente y/o biespecífica. En algunas modalidades, la proteína de unión es tetravalente y/o tetraespecífica. En algunas modalidades, la proteína de unión es tetravalente y/o biespecífica. En algunas modalidades, al menos uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (p.ej., el dominio extracelular de polipéptidos CD38 humanos y/o de mono cinomolgo).

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

$$V_{L1}\text{-}L_1\text{-}V_{L2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

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

$$V_{H2}\text{-}L_3\text{-}V_{H1}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}Fc \quad [II]$$

en donde:

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

L_1, L_2, L_3, y L_4 son conectores aminoacídicos;

y en donde los polipéptidos de formula I y los polipéptidos de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera. En algunas modalidades, V_{H1} y

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

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

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

y una segunda cadena polipeptídica comprende

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

en donde:

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

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

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

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

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3, y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera. En algunas modalidades, V_{H1} y V_{L1} forman un dominio

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

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

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

una segunda cadena polipeptídica comprende

$$V_{H2}\text{-}L_3\text{-}V_{HI}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}Fc$$

una tercera cadena polipeptídica comprende un anticuerpo región Fc

en donde:

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

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

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

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

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3, y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera. En algunas modalidades, V_{H1} y V_{L1} forman un dominio

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

En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una primera cadena polipeptídica que comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L1}\text{-}L_1\text{-}V_{L2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

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

$$V_{H2}\text{-}L_3\text{-}V_{H1}\text{-}L_4\text{-}C_{H1} \qquad [II]$$

en donde:

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

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

En cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas descritas más arriba, el antígeno diana distinto de CD38 puede ser cualquiera de las siguientes dianas antigénicas ilustrativas: A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, un receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido como PDL2), CD274 (también conocido como PDL1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNα, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4,

IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (también conocido como un receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como integrina b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor plaquetario, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como un receptor para IL33), STEAP2, quinasa Syk, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un co-receptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1). En algunas modalidades, una o más de la dianas antigénicas anteriores son dianas antigénicas humanas.

En cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas descritas más arriba, se puede utilizar cualquier conector o combinación de conectores descrita en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas modalidades, al menos uno de L_1, L_2, L_3 o L_4 tiene independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 o L_4 tienen independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 tienen cada uno independientemente 0 aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L_2 comprende la secuencia TKGPS (SEQ ID NO: 57), L_3 comprende la secuencia S, y L_4 comprende la secuencia RT. En algunas modalidades, L_1

comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_2 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud, y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_2 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud, y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L_2 tiene 0 aminoácidos de longitud, L_3 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud.

Proteínas de unión triespecíficas que se unen a polipéptidos CD38

En algunas modalidades, la proteína de unión de la descripción es una proteína de unión triespecífica y/o trivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (p.ej., tres) dianas antigénicas o proteínas diana diferentes. En algunas modalidades, al menos uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (p.ej., el dominio extracelular de polipéptidos CD38 humanos y/o de mono cinomolgo). En algunas modalidades, una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L2}\text{-}L_1\text{-}V_{L1}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

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

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-bisagra-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \qquad [II]$$

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{H3}\text{-}C_{H1}\text{-bisagra-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \qquad [III]$$

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L3}\text{-}C_L \qquad [IV]$$

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera.

En algunas modalidades, la proteína de unión de la descripción es proteína de unión triespecífica y/o trivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (p.ej., tres) dianas antigénicas o proteínas diana diferentes. En algunas modalidades, al menos uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (p.ej., el dominio extracelular de polipéptidos

CD38 humanos y/o de mono cinomolgo). En algunas modalidades, una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L2}\text{-}L_1\text{-}V_{L1}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

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

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1} \qquad [II]$$

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{H3}\text{-}C_{H1} \qquad [III]$$

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

$$V_{L3}\text{-}C_L \qquad [IV]$$

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

y en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera. En algunas modalidades, la segunda y la tercera cadena polipeptídicas comprenden adicionalmente una región Fc

conectada a C_{H1}, comprendiendo las regiones Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica tienen una orientación de entrecruzamiento que forma dos sitios de unión a antígeno distintos. En algunas modalidades, V_{H1} y V_{L1} forman un par de unión y forman el primer sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, V_{H2} y V_{L2} forman un par de unión y forman el segundo sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 (p.ej., CD3 humano), y el segundo sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 (p.ej., CD28 humano). En algunas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 (p.ej., CD3 humano), y el primer sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 (p.ej., CD28 humano). En algunas modalidades, el tercer polipéptido y el cuarto polipéptido forman un tercer sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, V_{H3} y V_{L3} forman un par de unión y forman el tercer sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, el tercer sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (p.ej., CD38 humano y opcionalmente de mono cinomolgo). Los formatos de proteína de unión ilustrativos con orientaciones de entrecruzamiento contemplados para su uso en la presente memoria también se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con Núm. de Serie 15/487.243 y la Solicitud internacional Núm. PCT/US2017/027488.

En algunas modalidades en cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas, triespecíficas, o multiespecíficas descritas en la presente memoria, un sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (p.ej., CD38 humano y opcionalmente de mono cinomolgo). En algunas modalidades, otro u otros sitios de unión a antígeno (p.ej., que no se unen a CD38) de cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas, triespecíficas, o multiespecíficas descritas en la presente memoria se unen a CD28 o CD3. En algunas

modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio VL1 comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35) o GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132),una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia CDR-H2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36).

En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y/o el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y/o el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que

comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y/o el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia

CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio VL1 comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos

ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-

L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1

que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio VH3 comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio VL3 comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una

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

En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LAS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y/o el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO: 40), y una secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y/o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende una secuencia CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), una secuencia CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), y una secuencia CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), y/o el dominio V_{L3} comprende una secuencia CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QGIRND (SEQ ID NO: 44), una secuencia CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO: 45), y una

secuencia CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

En algunas modalidades, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y/o el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En algunas modalidades de cualquiera de las proteínas de unión triespecíficas de la presente descripción, un dominio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 (p.ej., CD3 humano) y un dominio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 (p.ej., CD28 humano). En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 49 o 51 como se muestra en la Tabla H, y el dominio V_{L1} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 50 o 52 como se muestra en la Tabla H. En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 49 o 51 como se muestra en la Tabla H, y el dominio V_{L2} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 50 o 52 como se muestra en la Tabla H. En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 53 o 84 como se muestra en la Tabla H, y el dominio V_{L1} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 54 o 85 como se muestra en la Tabla H. En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 53 o 84 como se muestra en la Tabla H, y el dominio V_{L2} comprende tres CDR de SEQ ID NO: 54 o 85 como se muestra en la Tabla H.

En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L1}

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En ciertas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, la

tercera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y la cuarta cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En ciertas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, la tercera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y la cuarta cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En ciertas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, la tercera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, y la cuarta cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En ciertas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, la tercera cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, y la cuarta cadena polipeptídica comprende un polipéptido secuencia que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de

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

En ciertas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En ciertas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En ciertas modalidades, la

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

En cualquiera de las proteínas de unión triespecíficas descritas más arriba, el antígeno diana distinto de CD38 puede ser cualquiera de las siguientes dianas antigénicas ilustrativas: A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como

RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, un receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido como PDL2), CD274 (también conocido como PDL1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, lFNα, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (también conocido como un receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como integrina b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor plaquetario, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como un receptor para IL33), STEAP2, quinasa Syk, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR,

TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un co-receptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1). En algunas modalidades, una o más de las dianas antigénicas anteriores son dianas antigénicas humanas.

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

Las proteínas de unión de la descripción se pueden preparar utilizando dominios o secuencias obtenidos o derivados de cualquier anticuerpo humano o no humano, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos humanos, murinos, o humanizados.

Conectores

En algunas modalidades, los conectores L_1, L_2, L_3 y L_4 oscilan de la ausencia de aminoácidos (longitud=0) a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o menos de 100, 50, 40, 30, 20, o 15 aminoácidos o menor. Los conectores pueden tener también 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de longitud. L_1, L_2, L_3 y L_4 en una proteína de unión pueden tener todos la misma secuencia de aminoácidos o pueden tener todos diferente secuencia de aminoácidos.

Los ejemplos de conectores adecuados incluyen un solo resto de glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro restos de glicina; un péptido con cinco restos de glicina; un péptido con seis restos de glicina; un péptido con siete restos de glicina; y un péptido con ocho restos de glicina. Se pueden utilizar otras combinaciones de restos de aminoácido tales como el péptido GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), el péptido GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), el péptido TKGPS (SEQ ID NO: 57), el péptido GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y el péptido GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). No se desea que los ejemplos enumerados

anteriormente limiten el alcance de la descripción de ningún modo, y se ha demostrado que los conectores que comprenden aminoácidos seleccionados al azar seleccionados del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparragina, glutamina, glicina, y prolina son adecuados en las proteínas de unión. Para descripciones adicionales de secuencias conectoras, véanse, p.ej., el documento WO2012135345 y la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2017/027488.

La identidad y la secuencia de restos de aminoácido en el conector puede variar dependiendo del tipo de elemento estructural secundario que es necesario lograr en el conector. Por ejemplo, glicina, serina, y alanina son mejores para conectores que tienen máxima flexibilidad. Algunas combinaciones de glicina, prolina, treonina, y serina son útiles si es necesario un conector más rígido y extendido. Cualquier resto de aminoácido puede ser considerado un conector combinado con otros restos de aminoácido para construir conectores peptídicos más grandes cuando sea necesario dependiendo de las propiedades deseadas.

En algunas modalidades, al menos uno de L_1, L_2, L_3 o L_4 tiene independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 o L_4 tienen independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3. En algunas modalidades, la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4. En algunas modalidades, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3, y la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4. En algunas modalidades, L_1 tiene de 3 a 12 restos de aminoácido de longitud, L_2 tiene de 3 a 14 restos de aminoácido de longitud, L_3 tiene de 1 a 8 restos de aminoácido de longitud, y L_4 tiene de 1 a 3 restos de aminoácido de longitud. En algunas modalidades, L_1 tiene de 5 a 10 restos de aminoácido de longitud, L_2 tiene de 5 a

8 restos de aminoácido de longitud, L_3 tiene de 1 a 5 restos de aminoácido de longitud, y L_4 tiene de 1 a 2 restos de aminoácido de longitud. En algunas modalidades, L_1 tiene 7 restos de aminoácido de longitud, L_2 tiene 5 restos de aminoácido de longitud, L_3 tiene 1 resto de aminoácido de longitud, y L_4 tiene 2 restos de aminoácido de longitud. En algunas modalidades, L_1 tiene 10 restos de aminoácido de longitud, L_2 tiene 10 restos de aminoácido de longitud, L_3 tiene 0 restos de aminoácido de longitud, y L_4 tiene 0 restos de aminoácido de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 tienen cada uno una longitud seleccionada independientemente entre 0 a 15 aminoácidos (p.ej., 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 aminoácidos), en donde al menos dos de los conectores tienen una longitud de 1 a 15 aminoácidos (p.ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 aminoácidos). En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 tienen cada uno 0 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y/o L_4 comprenden a secuencia derivada de una secuencia de origen natural en la unión entre un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo (p.ej., como se describe en el documento WO2012/135345). Por ejemplo, en algunas modalidades, el conector comprende una secuencia encontrada en la transición entre un dominio V_H y C_{H1} endógeno, o entre un dominio V_L y C_L endógeno (p.ej., kappa o lambda). En algunas modalidades, el conector comprende una secuencia encontrada en la transición entre un dominio V_H y C_{H1} humano endógeno, o entre un dominio V_L y C_L humano endógeno (p.ej., kappa o lambda humanas).

En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 tienen cada uno independientemente 0 aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG

(SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59).

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

Regiones Fc y dominios constantes

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende un anticuerpo cadena pesada completo o una cadena de polipéptido que comprende una región Fc. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc humana, p.ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humanas. En algunas modalidades, la región Fc incluye un anticuerpo bisagra, dominios CH1, CH2, CH3, y opcionalmente CH4. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana. En

algunas modalidades, la región Fc incluye una o más de las mutaciones descritas más abajo.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción incluye una o dos variantes de Fc. El término "variante de Fc" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula o secuencia que son modificadas a partir de un Fc nativo pero que todavía comprenden un sitio de unión para el receptor salvaje, FcRn (receptor Fc neonatal). Las variantes de Fc ilustrativas, y su interacción con el receptor salvaje, son conocidas en la técnica. Así, el término "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden ser eliminadas debido a que proporcionan rasgos estructurales o actividad biológica que no son requeridos por las proteínas de unión de tipo anticuerpo de la invención. Por tanto, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carecen de uno o más sitios o restos de Fc nativo, o en las que se han modificado uno o más sitios o restos de Fc, que afectan o están implicados en: (1) formación de enlaces disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula anfitriona seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal después de la expresión en una célula anfitriona seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor Fc distinto de un receptor salvaje, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

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

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y/o 329 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y/o P329A. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 298, 299, y/o 300 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y/o Y300S.

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a Fcγl y/o Fcγll. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a Fcγl y/o Fcγll pero no afectan a la unión a FcRn. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228 y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S228P y/o R409K. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234 y/o 235 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son F234A y/o L235A. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 234, 235, y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, y/o R409K. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que

corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende mutaciones de aminoácidos en sustituciones correspondientes a las posiciones 228, 233-236, y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las mutaciones de aminoácidos son S228P; E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236; y/o R409K.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, p.ej., modulando la afinidad por un reactivo de purificación. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de unión heterodiméricas se pueden separar selectivamente mediante purificación de su forma homodimérica si una de las dos regiones Fc de las formas heterodiméricas contiene una o varias mutaciones que reducen o eliminan la unión a Proteína A, debido a que las formas heterodiméricas tendrán una afinidad intermedia por la purificación basada en Proteína A que cualquier forma homodimérica y se pueden eluir selectivamente de la Proteína A, p.ej., mediante el uso de un pH diferente (Véase p.ej., Smith, E.J. et al. (2015) Sci. Rep. 5:17943). En algunas modalidades, la mutación comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de

cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}; y en donde solo una de la primera y segunda regiones Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende mutaciones en botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la purificación. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

Para mejorar los rendimientos de algunas proteínas de unión (p.ej., proteínas de unión biespecíficas o triespecíficas), los dominios C_{H3} se pueden alterar por mediante de la tecnología "botón en ojal" que se describe en detalle con algunos ejemplos, por ejemplo, en la Publicación Internacional Núm. WO 96/027011, Ridgway *et al*., 1996, *Protein Eng*. 9: 617-21; y Merchant *et al*., 1998, *Nat. Biotechnol*. 16: 677-81. Específicamente, las superficies de interacción de los dos dominios C_{H3} se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios C_{H3}. Cada uno de los dos dominios C_{H3} (de las dos cadenas pesadas) pueden ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodímeros (Merchant *et al*., 1998; Atwell *et al*., 1997, *J. Mol. Biol*. 270: 26-35) e incrementa el rendimiento. En modalidades concretas, el botón está en el segundo par de polipéptidos con un dominio variable sencillo. En otras modalidades, el botón está en el primer par de polipéptidos que tienen la orientación de entrecruzamiento. En otras modalidades más, los dominios C_{H3} no incluyen un botón en ojal.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción (p.ej., una proteína de unión triespecífica) comprende una mutación en “botón” en la segunda cadena polipeptídica y una mutación en “ojal” en la tercera cadena polipeptídica. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una mutación en “botón” en la tercera cadena polipeptídica y una mutación en “ojal” en la segunda cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la mutación en “botón” comprende una o varias sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y/o 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S354C, T366W, T366Y, S354C y T366W, o S354C y T366Y. En algunas modalidades, la mutación en “botón” comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W. En algunas modalidades, la mutación en “ojal” comprende una o varias sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 407 y, opcionalmente, 349, 366, y/o 368 y de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son Y407V o Y407T y opcionalmente Y349C, T366S, y/o L368A. En algunas modalidades, la mutación en “ojal” comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 366 y

opcionalmente 354 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son T366W o T366Y y opcionalmente S354C; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 407 y opcionalmente 349, 366, y/o 368 y de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y407V o Y407T y opcionalmente Y349C, T366S, y/o L368A.

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

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región

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

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

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W. En algunas

modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 354, 366, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, S354C, T366W, y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 349, 366, 368, 407, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, Y349C, T366S, L368A, Y407V, y R409K. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 349, 366, 368, 407, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, Y349C, T366S, L368A, Y407V, y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende

adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 354, 366, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, S354C, T366W, y R409K.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, 354, y 366 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, S354C, y T366W; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, 349, 366, 368, y 407 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, y Y407V. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la

primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, 349, 366, 368, y 407 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, y Y407V; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, 354, y 366 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, S354C, y T366W.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 234, 235, 354, 366, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, S354C, T366W, y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 234, 235, 349, 366, 368, 407, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P,

F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V, y R409K. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 234, 235, 349, 366, 368, 407, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V, y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 234, 235, 354, 366, y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, S354C, T366W, y R409K.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero (Véase p.ej., Hinton, P.R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). En algunas modalidades, la mutación comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina

C_{H2} y C_{H3}, y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende mutaciones en botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para mejorar la estabilidad, p.ej., de la región bisagra y/o la interfase del dímero de IgG4 (Véase p.ej., Spiess, C. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288:26583-26593). En algunas modalidades, la mutación comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}; en donde la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana; y en donde la primera y la segunda regiones Fc

comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende mutaciones en botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la estabilidad. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, p.ej., modulando la afinidad por un reactivo de purificación. Por ejemplo, se sabe que proteínas de unión heterodiméricas se pueden separar selectivamente mediante purificación de sus formas homodiméricas si una de las dos regiones Fc de las formas heterodiméricas contiene una o varias mutaciones que reducen o eliminan la unión a Proteína A, debido a que las formas heterodiméricas tendrán una afinidad intermedia por la purificación basada en Proteína A que cualquier forma homodimérica y pueden eluirse selectivamente de la Proteína A, p.ej., mediante el uso de un pH diferente (Véase p.ej., Smith, E.J. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:17943). En algunas modalidades, la mutación comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}; y en donde solo una de la

primera y segunda regiones Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende mutaciones en botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la purificación. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero (Véase p.ej., Hinton, P.R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). En algunas modalidades, la mutación comprende sustituciones en posiciones que corresponden a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}, en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende mutaciones en botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar

la semivida en suero. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para reducir la función efectora, p.ej., fagocitosis celular dependiente de anticuerpos mediada por receptor Fc (ADCP), citotoxicidad dependiente el complemento (CDC), y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}; en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}; en donde la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana; y en donde la primera y la segunda regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A y L235A. En algunas modalidades, las regiones Fc de la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A y L235A. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3};

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

las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A.

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

En algunas modalidades, los tipos de mutaciones descritos más arriba se pueden combinar en cualquier orden o combinación. Por ejemplo, una proteína de unión de la presente descripción puede comprender dos o más de las mutaciones en “botón” y “ojal”, la una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero, la una o más mutaciones para mejorar la estabilidad de IgG4, la una o más mutaciones para mejorar la purificación, y/o la una o más mutaciones para reducir la función efectora descrita más arriba.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende un fragmento de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a fragmentos de anticuerpo F(ab), F(ab’)2, Fab’-SH, Fv, o scFv.

Ensayos

La presente descripción proporciona proteínas de unión a antígeno que se unen a polipéptidos CD38 humanos y/o de cinomolgos, que inducen proliferación de células T (p.ej., células T CD4+ y/o CD8+), y/o que inducen la apoptosis de células CD38+. Los ensayos ilustrativos para medir estos parámetros e identificar tales proteínas de unión se proporcionan en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas modalidades,

la afinidad de unión entre una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma y un polipéptido purificado CD38 se mide mediante SPR (p.ej., como se describe más abajo), y la afinidad de unión entre una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma y un polipéptido CD38 expresado en la superficie de una célula se mide mediante citometría de flujo (p.ej., como se describe más abajo).

En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno de una proteína de unión de la presente descripción se une al polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, 1 nM o menor, o 0.8 nM o menor, según se mide mediante un ensayo de citometría de flujo utilizando células que expresan el polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 sobre su superficie celular, p.ej., como se describe más abajo. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, 1 nM o menor, o 0,75 nM o menor, según se mide mediante un ensayo de citometría de flujo utilizando células que expresan el polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 sobre su superficie celular, p.ej., como se describe más abajo. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, 1 nM o menor, o 0,83 nM o menor, según se mide mediante un ensayo SPR utilizando el polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 1, p.ej., como se describe más abajo. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 3,5 nM o menor, 1.5 nM o menor, o 1.0 nM o menor, según se mide mediante un ensayo SPR utilizando el polipéptido CD38 de mono cinomolgo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, p.ej., como se describe más abajo. Como se demuestra en la presente memoria, en algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción puede poseer una o más de las propiedades de unión ilustrativas descritas en la presente memoria. En algunas modalidades, la K_D se mide a 4°C o 25°C.

En algunas modalidades, una proteína de unión monoespecífica de la presente descripción posee una o más de las siguientes características: se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada con una KD de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, o 1,5 nM o menor, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, o 1 nM o menor, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38

de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada con una KD de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, 1 nM o menor, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, 1 nM o menor, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) como una proteína purificada, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; induce apoptosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD38 en su superficie celular; y tiene una o más mutaciones (p.ej., en una región Fc) que dan como resultado una disminución de la unión a FcγRI y/o FcγRII, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido CD38 (p.ej., humano o de mono cinomolgo) expresado en la superficie de una célula con una CE50 de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o

menor, 2 nM o menor, o 1 nM o menor, según se determina por citometría de flujo. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido CD38 (p.ej., humano o mono cinomolgo) como una proteína purificada con una CE50 de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, o 1 nM o menor, según se determina por ELISA. En algunas modalidades, la KD se mide a 4°C o 25°C.

En algunas modalidades, una proteína de unión triespecífica de la presente descripción posee una o más de las siguientes características: induce la proliferación de células T (p.ej., proliferación de células T CD4+ y/o CD8+); induce la expresión en células T (p.ej., células T CD4+ y/o CD8+) de Bcl-xL; induce la apoptosis de células CD38+ (p.ej., según se mide mediante tinción con Anexina V y/o captación de yoduro de propidio); se une a CD38 expresado en la superficie de una célula y uno o más antígenos diana de células T expresados en la superficie de una célula T; se une a CD38 expresado en la superficie de una célula, CD28 expresado en la superficie de una célula T, y CD3 expresado en la superficie de una célula T; estimula la activación del receptor de células T (p.ej., según se mide mediante expresión de CD69); induce la coestimulación de la señalización del receptor de células T (p.ej., mediada por CD28); tiene una o más mutaciones (p.ej., en una región Fc) que dan como resultado la disminución de la liberación de citocinas (p.ej., IFN-γ, IL-2, y/o TNF-α) por las PBMC, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones; induce la liberación de citocinas (p.ej., IFN-γ y/o IL-6) por las PBMC en presencia de una célula diana CD38+ (p.ej., según se mide mediante inmunoensayo); se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 1) como una proteína purificada con una KD de 1,5 nM o menor, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 12 nM o menor, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como una proteína purificada con una KD de 3,5 nM o menor, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula con una KD aparente de 7,5 nM o menor, según se determina por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) como una proteína purificada, según se determina por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de la isoforma E humana (p.ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) expresado en la superficie de una célula, según se determina por citometría de flujo; induce apoptosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD38 en su superficie celular; y tiene una

o más mutaciones (p.ej., en una región Fc) que dan como resultado una disminución de la unión a FcγRI y/o FcγRII, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido CD38 (p.ej., humano o de mono cinomolgo) expresado en la superficie de una célula con una CE50 de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, o 1 nM o menor, según se determina por citometría de flujo. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une a un polipéptido CD38 (p.ej., humano o de mono cinomolgo) como una proteína purificada con una CE50 de 20 nM o menor, 15 nM o menor, 12 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, o 1 nM o menor, según se determina por ELISA.

Ácidos Nucleicos

Se utilizan metodologías de ADN recombinante convencionales para construir los polinucleótidos que codifican los polipéptidos que forman las proteínas de unión, incorporar estos polinucleótidos a vectores de expresión recombinantes, e introducir tales vectores en células anfitrionas. Véase p.ej., Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed.). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica, o como se describe en la presente memoria. A no ser que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. De un modo similar, se pueden utilizar técnicas convencionales para síntesis

químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, suministro, y tratamiento de pacientes.

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

Ciertos aspectos de la presente descripción se refieren a kits de polinucleótidos. En algunas modalidades, uno o más de los polinucleótidos es un vector (p.ej., un vector de expresión). Los kits pueden encontrar uso, entre otros, en la producción de una o más de las proteínas de unión descritas en la presente memoria, p.ej., una proteína de unión triespecífica de la presente descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno, dos, tres, o cuatro polinucleótidos mostrados en la Tabla J (p.ej., de IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid, IgG1 LALA P329A mAb2xCD28supxCD3mid, IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid, IgG4 FALA mAb6xCD28supxCD3mid, IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid, o IgG1 NNSA mAb6xCD28supxCD3mid). En algunas modalidades, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ

ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 76, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 79, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81. En algunas modalidades, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 76, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81. En algunas modalidades, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 83, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81.

En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado está conectado operablemente a un promotor heterólogo para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión. Un promotor se puede referir a secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Una primera secuencia de ácido nucleico está conectada operablemente a una segunda

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

En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado es incorporado a un vector. En algunas modalidades, el vector es un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden incluir una o más secuencias reguladoras conectadas operativamente al polinucleótido que se debe expresar. El término "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p.ej., señales de poliadenilación). Los ejemplos de los potenciadores adecuados pueden incluir, pero no se

limitan a, secuencias potenciadoras de genes de mamífero (tales como globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína, insulina y similares), y secuencias potenciadoras de un virus de células eucarióticas (tales como el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen replicación, potenciadores de adenovirus, y similares). Los ejemplos de los vectores adecuados pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, episomas, transposones, y vectores virales (p.ej., adenoviral, viral de vaccinia, viral de Sindbis, sarampión, viral de herpes, lentiviral, retroviral, vectores virales adenoasociados, etc.). Los vectores de expresión se pueden utilizar para transfectar células anfitrionas, tales como, por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, y células de mamífero. Los vectores de ADN viral y plasmídico biológicamente funcionales susceptibles de expresión y replicación en un anfitrión son conocidos en la técnica, y se pueden utilizar para transfectar cualquier célula de interés.

Otros aspectos de la presente descripción se refieren a un sistema vector que comprende uno o más vectores que codifican una primera, segunda, tercera, y cuarta cadenas de polipéptido de cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente memoria. En algunas modalidades, el sistema vector comprende un primer vector que codifica la primera cadena polipeptídica de la proteína de unión, un segundo vector que codifica la segunda cadena polipeptídica de la proteína de unión, un tercer vector que codifica la tercera cadena polipeptídica de la proteína de unión, y un cuarto vector que codifica la cuarta cadena polipeptídica de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema vector comprende un primer vector que codifica la primera y segunda cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema

vector comprende un primer vector que codifica la primera y tercera cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema vector comprende un primer vector que codifica la primera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la segunda y tercera cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema vector comprende un primer vector que codifica la primera, segunda, tercera, y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. Los uno o más vectores del sistema vector puede ser cualquiera de los vectores descritos en la presente memoria. En algunas modalidades, los uno o más vectores son vectores de expresión.

Células anfitrionas aisladas

Otros aspectos de la presente descripción se refieren a una célula anfitriona aislada que comprende uno o más polinucleótidos aislados, kits de polinucleótidos, vectores, y/o sistemas vectores descritos en la presente memoria. En algunas modalidades, la célula anfitriona es un célula bacteriana (p.ej., una célula de *E. coli*). En algunas modalidades, la célula anfitriona es una célula de levadura (p.ej., una célula de *S. cerevisiae*). En algunas modalidades, la célula anfitriona es una célula de insecto. Los ejemplos de las células anfitrionas de insecto pueden incluir, por ejemplo, células de Drosophila (p.ej., células S2), células de Trichoplusia ni (p.ej., células High Five™), y células de Spodoptera frugiperda (p.ej., células Sf21 o Sf9). En algunas modalidades, la célula anfitriona es una célula de mamífero. Los ejemplos de las células anfitrionas de mamífero pueden incluir, por ejemplo, células de riñón embrionario humano (p.ej., células 293 o 293 subclonadas para crecer en cultivo en suspensión), células Expi293TM, células CHO, células de riñón de cría de hámster (p.ej., BHK, ATCC CCL 10), células de Sertoli de ratón (p.ej., células TM4), células de riñón de mono (p.ej., CV1 ATCC CCL 70), células

de riñón de mono africano verde (p.ej., VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (p.ej., HELA, ATCC CCL 2), células de riñón canino (p.ej., MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata búfalo (p.ej., BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (p.ej., W138, ATCC CCL 75), células de hígado humano (p.ej., Hep G2, HB 8065), células de tumor mamario de ratón (p.ej., MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI, células MRC 5, células FS4, una línea de hepatoma humano (p.ej., Hep G2), y células de mieloma (p.ej., células NS0 y Sp2/0).

Otros aspectos de la presente descripción se refieren a un método de producción de cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente memoria. En algunas modalidades, el método incluye a) cultivar una célula anfitriona (p.ej., cualquiera de las células anfitrionas descritas en la presente memoria) que comprende un ácido nucleico aislado, vector, y/o sistema vector (p.ej., cualquiera de los ácidos nucleicos aislados, vectores, y/o sistemas vectores descritos en la presente memoria) en condiciones tales que la célula anfitriona exprese la proteína de unión; y b) aislar la proteína de unión de la célula anfitriona. Los métodos de cultivo de las células anfitrionas bajo condiciones en las que se expresa una proteína son bien conocidos por un experto normal en la técnica. Los métodos para aislar proteínas de células anfitrionas cultivadas son bien conocidos por un experto normal en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de afinidad (p.ej., cromatografía de afinidad de dos etapas que comprende cromatografía de afinidad con proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaños).

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción es purificada mediante cromatografía de afinidad con proteína A, kappa cadena ligera cromatografía de afinidad (p.ej., utilizando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare), y opcionalmente cromatografía de afinidad

de cadena ligera lambda (p.ej., utilizando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare). En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción es purificada mediante cromatografía de afinidad con Proteína A, cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (p.ej., utilizando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare), y opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (p.ej., utilizando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare). En algunas modalidades, la proteína de unión comprende dos regiones Fc, comprendiendo cada una un dominio C_{H3}, y únicamente uno de los dominios C_{H3} comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción es purificada mediante cromatografía de afinidad con proteína A, a continuación cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (p.ej., utilizando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare), a continuación opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (p.ej., utilizando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare) en orden. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción es purificada mediante cromatografía de afinidad con Proteína A, a continuación cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (p.ej., utilizando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare), a continuación opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (p.ej., utilizando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare) en orden. Por ejemplo, en algunas modalidades, la proteína de unión se pone en contacto con Proteína A, se eluye de la Proteína A en condiciones adecuadas para

aislar la proteína de unión de las proteínas de unión que comprenden 0 o 2 dominios C_{H3} que comprenden las sustituciones de aminoácidos H435R y Y436F, se pone en contacto con un medio de afinidad de cadena ligera kappa (p.ej., como se utiliza en la resina KappaSelect; GE Healthcare), y se eluye del medio de afinidad de cadena ligera kappa en condiciones adecuadas para aislar la proteína de unión de las proteínas de unión que comprenden únicamente dominios C_L lambda (p.ej., de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Las condiciones adecuadas para la elución de la Proteína A son conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación un gradiente de elución escalonado de pH 4,5-2,8. En algunas modalidades, se emplean Proteína A o una variante de Proteína A útil para la purificación de proteínas. En algunas modalidades, la Proteína A se ancla a un sustrato o resina, p.ej., como parte de un medio de cromatografía. En algunas modalidades, después de elución del medio de afinidad de cadena ligera kappa, la proteína de unión se pone en contacto con un medio de afinidad de cadena ligera lambda (p.ej., como se utiliza en la resina LambdaFabSelect; GE Healthcare), y se eluye del medio de afinidad de cadena ligera lambda en condiciones adecuadas para aislar la proteína de unión de las proteínas de unión que comprenden únicamente dominios C_L kappa (p.ej., de acuerdo con las instrucciones del fabricante). En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se detecta utilizando cromatografía HIC. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende: una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio C_L lambda; un dominio C_{H3} de una segunda cadena polipeptídica que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W; un dominio C_{H3} de una tercera cadena polipeptídica que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 349, 366, 368, 407, 435, y 436 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el

Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, Y407V, H435R, y Y436F; y una cuarta cadena polipeptídica que comprende un dominio kappa C_L. En algunas modalidades, la proteína de unión es producida por una célula anfitriona. En algunas modalidades, la proteína de unión es purificada a partir de un medio de cultivo celular o extracto de células anfitrionas. En algunas modalidades, las proteínas de unión son secretadas por una célula anfitriona o producidas y extraídas de una célula anfitriona (p.ej., antes de ponerse en contacto con Proteína A). En algunas modalidades, la proteína de unión está en un medio de cultivo celular o extracto de células anfitrionas cuando se pone en contacto con Proteína A. En algunas modalidades, la proteína de unión se purifica de otras proteínas de unión, polipéptidos, y/u otros componentes celulares.

III. Proteínas de unión triespecíficas

En algunas modalidades, la proteína de unión de la descripción es una proteína de unión triespecífica y/o trivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (p.ej., tres) dianas antigénicas o proteínas diana diferentes. En algunas modalidades, una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L2}-L_1-V_{L1}-L_2-C_L [I]

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

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [II]

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{H3}-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3} [III]

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmulaV_{L3}-C_L [IV]

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera. En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica tienen una orientación de entrecruzamiento que forma dos sitios de unión a antígeno distintos. Como se ha descrito anteriormente, la segunda y tercera cadenas polipeptídicas incluyen una región Fc (p.ej., que comprende los dominios bisagra-C_{H2}-C_{H3}). En algunas modalidades, una o ambas regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana que comprenden sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236. En algunas modalidades, las regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana que comprenden mutaciones de aminoácidos en

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

En algunas modalidades, la proteína de unión de la descripción es una proteína de unión triespecífica y/o trivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (p.ej., tres) dianas antigénicas o proteínas diana diferentes. En algunas modalidades, al menos uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (p.ej., el dominio extracelular de polipéptidos CD38 humanos y/o de mono cinomolgo). En algunas modalidades, una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L2}-L_1-V_{L1}-L_2-C_L [I]

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

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1} [II]

y una tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{H3}-C_{H1} [III]

y una cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

V_{L3}-C_L [IV]

en donde:

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

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

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

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

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

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

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

L_1, L_2, L_3 y L_4 son conectores aminoacídicos;

y en donde el polipéptido de formula I y el polipéptido de formula II forman un par de entrecruzamiento de cadena pesada-cadena ligera. En algunas modalidades, la segunda y la tercera cadena polipeptídicas comprenden adicionalmente una región Fc conectada a C_{H1}, comprendiendo las regiones Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3}. En algunas modalidades, una o ambas regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana que comprenden sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236. En algunas modalidades, las regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana que comprenden mutaciones de aminoácidos en sustituciones correspondientes a las posiciones 228, 233-236, y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el Índice UE. En

algunas modalidades, las mutaciones de aminoácidos son S228P; E233P, F234V, L235A, y una deleción en 236; y/o R409K. En algunas modalidades, una o ambas regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y/o 329 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y/o P329A. En algunas modalidades, las regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana que comprenden sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 298, 299, y/o 300 de IgG1 humana de acuerdo con el Índice UE. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y/o Y300S.

En algunas modalidades, V_{H1} y V_{L1} forman un par de unión y forman un primer sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, V_{H2} y V_{L2} forman un par de unión y forman un segundo sitio de unión a antígeno. En algunas modalidades, V_{H3} y V_{L3} forman un par de unión y forman un tercer sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión también se pueden utilizar para la activación celular, el direccionamiento tumoral, la neutralización de actividades de citocina, la neutralización de infección viral, la combinación de múltiples eventos de señalización, para tratar cáncer, artritis, y/o trastornos inflamatorios. Por ejemplo, en algunas modalidades, una proteína de unión específicamente se une a una, dos, o tres dianas antigénicas seleccionadas entre A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como

TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, un receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido como PDL2), CD274 (también conocido como PDL1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNα, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (también conocido como un receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como integrina b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor plaquetario, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como un receptor para IL33), STEAP2, quinasa Syk, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un co-receptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y

XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1). En algunas modalidades, una o más de las dianas antigénicas anteriores son dianas antigénicas humanas.

En algunas modalidades, uno de los tres sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 (p.ej., un polipéptido CD3 humano), uno de los tres sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 (p.ej., un polipéptido CD28 humano), y uno de los tres sitios de unión a antígeno se une a un tercer polipéptido. En algunas modalidades, el sitio de unión a antígeno que se une específicamente a una diana antigénica distinta de CD3 o CD28 se une a una diana antigénica seleccionada entre A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, un receptor para IgE), CD24, CD27, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido como PDL2), CD274 (también conocido como PDL1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2,

CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNα, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (también conocido como un receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como integrina b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor plaquetario, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como un receptor para IL33), STEAP2, quinasa Syk, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un co-receptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1). En algunas modalidades, una o más de las dianas antigénicas anteriores son dianas antigénicas humanas.

En cualquiera de las proteínas de unión triespecíficas descritas más arriba, se puede utilizar cualquier conector o combinación de conectores descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas modalidades, al menos uno de L_1, L_2, L_3 o L_4 tiene independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 o L_4 tienen independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3 y L_4 tienen cada uno independientemente 0 aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, L_1, L_2, L_3

y L_4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L_2 comprende la secuencia TKGPS (SEQ ID NO: 57), L_3 comprende la secuencia S, y L_4 comprende la secuencia RT. En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_2 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud, y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_2 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud, y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L_2 tiene 0 aminoácidos de longitud, L_3 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud.

IV. Usos de las proteínas de unión

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

Para las aplicaciones de diagnóstico, en ciertas modalidades, las proteínas d unión se pueden marcar con un radical detectable. El radical detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el radical detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I, ^{99}Tc, ^{111}In, o ^{67}Ga; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato

de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o peroxidasa de rábano picante.

Las proteínas de unión también son útiles para la obtención de imágenes *in vivo*. Se puede administrar una proteína de unión marcada con un radical detectable a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y someter a ensayo la presencia y localización del anticuerpo marcado en el anfitrión. La proteína de unión se puede marcar con cualquier radical que sea detectable en un animal, ya sea mediante resonancia magnética nuclear, radiología, u otro método de detección conocido en la técnica.

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

La descripción también se refiere a un kit que comprende una proteína de unión y otros reactivos útiles para detectar niveles de antígenos diana en muestras biológicas. Tales reactivos pueden incluir una marca detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivo y negativo, y reactivos de detección. En algunas modalidades, el kit comprende una composición que comprende cualquier proteína de unión, polinucleótido, vector, sistema vector, y/o célula anfitriona descritos en la presente memoria. En algunas modalidades, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente

contiene una composición que es, por si misma o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). En algunas modalidades, la etiqueta o prospecto indican que la composición se utiliza para prevenir, diagnosticar, y/o tratar la afección seleccionada. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de manufactura o kit puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (ABPI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, aguas, y jeringas.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se administra a un paciente que lo necesita para el tratamiento o la prevención del cáncer. En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativos (p.ej., cáncer). En algunas modalidades, el método comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una de las proteínas de unión, o composiciones farmacéuticas relacionadas con ellas, descritas en la presente memoria. En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a los usos de al menos una de las proteínas de unión, o composiciones farmacéuticas relacionadas con ellas, descritas en la presente memoria para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativos (p.ej., cáncer) en un paciente que lo necesite. En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a al menos una de las proteínas de unión, o composiciones farmacéuticas relacionadas con ellas, descritas en la presente memoria para su uso en la fabricación de un medicamento para prevenir

y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativos (p.ej., cáncer) en un paciente que lo necesite. En algunas modalidades, el paciente es un ser humano. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que se une a una proteína de la superficie de las células T y otro sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano, p.ej., como se describe en la sección II más arriba. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano, un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28 humano, y un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3 humano.

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

En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de mama tal como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, linfoma de células B del centro germinal o leucemia linfoblástica aguda de células B. En ciertas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En ciertas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML),

leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), o un linfoma de células B.

En ciertas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. Los anticuerpos anti-CD38 se han sometido a prueba para el tratamiento del mieloma múltiple, tal como daratumumab e isatuximab. Sin embargo, si bien el mieloma múltiple se considera tratable, la recidiva es inevitable en casi todos los pacientes, conduciendo al desarrollo de una enfermedad refractaria al tratamiento. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple con recidiva o refractario. En algunas modalidades, el paciente se ha tratado con u tratamiento para mieloma múltiple anterior. En algunas modalidades, se administra una proteína de unión de la presente descripción al paciente como tratamiento de 1ª, 2ª, o 3ª línea para el mieloma múltiple. Sin desear estar limitado por la teoría, se piensa que una proteína de unión anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 de la presente descripción puede ser útil en el tratamiento del mieloma múltiple, p.ej., reclutando células T hacia las células tumorales a través de anti-CD38 (o anti-CD28/anti-CD38), activación de células T acopladas a través de anti-CD3/anti-CD28, y/o destruyendo células tumorales por medio de mecanismos basados en perforina/granzima. Se ha hecho referencia a CD28 como un nuevo marcador de cáncer para el mieloma múltiple. Véase Nair, J.R. et al. (2011) J. Immunol. 187:1243-1253.

En algunas modalidades, la al menos una proteína de unión se administra (o se debe administrar) combinada con una o más terapias anti-cancerosas (p.ej., cualquier terapia anti-cancerosa conocida en la técnica, tal como un agente o una terapia quimioterapéuticos). En algunas modalidades, la al menos una proteína de unión se administra (o se debe administrar) antes de las una o más terapia anti-cancerosas. En algunas modalidades, la al menos una proteína de unión se administra (o se debe administrar) concurrentemente con las una o más terapias anti-cancerosas. En algunas

modalidades, la al menos una proteína de unión se administra (o se debe administrar) después de las una o más terapias anti-retrovirales.

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

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden proteínas de unión están dentro del alcance de la descripción. Tales composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión, o un producto conjugado de proteína de unión-fármaco, mezclada con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado por su idoneidad para el modo de administración.

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

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener, o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolalidad, la viscosidad, la claridad, el color, el carácter isotónico, el olor, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción, o la penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina, o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido sórbico, sulfito de sodio, o hidrogenosulfito de sodio), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, u otros ácidos orgánicos), agentes voluminizantes (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)), agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina, o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa, o dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas), agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes,

agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol, o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronics; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbatos tales como Polisorbato 20 o Polisorbato 80; Triton; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos – preferiblemente cloruro de sodio o potasio – o manitol sorbitol), vehículos de suministro, diluyentes, excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticos (véase, p.ej., Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), y ediciones posteriores del mismo, incorporadas a la presente memoria como referencia para cualquier fin).

La composición farmacéutica óptima será determinada por el experto en la técnica dependiendo, por ejemplo, de la ruta de administración pretendida, el formato de suministro, y la dosificación deseada. Tales composiciones pueden incluir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo, y la velocidad de aclaramiento in vivo de la proteína de unión.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado para inyectables puede ser agua, solución salina fisiológica, o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente con un suplemento de otros materiales comunes en composiciones para la administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina

mezclada con albúmina de suero son vehículos ilustrativos adicionales. Otras composiciones farmacéuticas ilustrativas comprenden tampón Tris con un pH de aproximadamente 7,0-8,5, o tampón acetato con un pH de aproximadamente 4,0-5,5, que puede incluir adicionalmente sorbitol o un sustituto adecuado. En una modalidad de la descripción, las composiciones de proteínas de unión se pueden preparar para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene un grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Adicionalmente, la proteína de unión se puede formular como un producto liofilizado utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden seleccionar para suministro parenteral o subcutáneo. Alternativamente, las composiciones se pueden seleccionar para inhalación o para suministro a través del tracto digestivo, por ejemplo, oralmente. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro del conocimiento práctico de la técnica.

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

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso pueden estar en forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable, libre de pirógenos que comprende la proteína de unión deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula una proteína de unión como una solución isotónica estéril, apropiadamente conservada. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas

inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), esferas, o liposomas, que proporcionan una liberación controlada o sostenida del producto que puede ser suministrado a continuación través de una inyección de depósito. También se puede utilizar ácido hialurónico, y este puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros métodos adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen los dispositivos de suministro de fármacos implantables.

En una modalidad, se puede formular una composición farmacéutica para inhalación. Por ejemplo, se puede formular una proteína de unión en forma de un polvo seco para inhalación. Las soluciones para inhalación de proteínas de unión también se pueden formular con un propelente para suministro en aerosol. En otra modalidad más, las soluciones se pueden nebulizar.

También se contempla que ciertas formulaciones puedan ser administradas oralmente. En una modalidad de la descripción, las proteínas de unión que se administra de esta manera se pueden formular con o sin aquellos portadores comúnmente utilizados en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de la proteína de unión. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos, y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de proteínas de unión en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo

apropiado, se pueden preparar soluciones en formas de dosificación unitarias. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina, o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales de la descripción serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican proteínas de unión en formulaciones de suministro sostenido o controlado. Los mecanismos para formular una variedad de métodos de suministro sostenido o controlado diferentes, tales como portadores de liposomas, micro-partículas bio-erosionables o esferas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas para los expertos en la técnica. Otros ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p.ej., películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma etilo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), etil vinil acetato, o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas que se van a utilizar para la administración in vivo deben ser típicamente estériles. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización utilizando este método se puede llevar a cabo antes, o después, de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por

ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, se puede almacenar en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o en forma de un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar en una forma lista para su uso o en una forma (p.ej., liofilizada) que requiera reconstitución antes de su administración.

La descripción también abarca kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta descripción kits que contienen jeringas pre-cargadas con una o múltiples cámaras (p.ej., jeringas líquidas y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de proteína de unión que se va a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán por lo tanto dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la cual se está utilizando la proteína de unión, la ruta de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal, o tamaño del órgano) y el estado (la edad y el estado de salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico clínico puede titular la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de unión en la formulación que se esté utilizando. Típicamente, un médico clínico administrará la composición hasta alcanzar una dosificación que logre el efecto deseado. La composición se puede administrar por lo tanto en forma de una sola dosis,

en forma de dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o en forma de una infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o catéter. El ajuste adicional de la dosificación apropiada lo llevan a cabo rutinariamente los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por los mismos. Las dosificaciones apropiadas se pueden averiguar a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

La ruta de administración de la composición farmacéutica concuerda con métodos conocidos, p.ej., oralmente; por medio de inyección por las rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida; o mediante dispositivos de implantación. Cuando se desea, las composiciones se pueden administrar mediante inyección en bolo o continuamente mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

La composición también se puede administrar localmente a través de implantación de una membrana, esponja, u otro material apropiado sobre el cual se ha adsorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación retardada, o administración continua.

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos de modalidades específicas de la descripción, y los diversos usos de las mismas. Se exponen con fines meramente explicativos, y no se deben considerar limitantes del alcance de la invención en modo alguno.

La siguiente terminología se puede utilizar indistintamente en los Ejemplos y en los Dibujos en la presente memoria, para hacer referencia a dominios de unión a antígeno o anticuerpos anti-CD38:

antiCD38_C2-CD38-1: mAb1

antiCD38_C2-CD38-1_V_{H1}-VL1 o $CD38_{VH1}$: mAb2

antiCD38_C2-CD38-1_V_{H3}-VL3: mAb3

antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3: mAb4

antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3: mAb5

antiCD38_1370 o $CD38_{HHY1370}$: mAb6

antiCD38_SB19 o isatuximab: mAb7.

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

Los siguientes Ejemplos describen la generación y caracterización de anticuerpos anti-CD38 monoclonales. Ventajosamente, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria reaccionan de manera cruzada con las proteínas CD38 de ser humano y de mono, proporcionando de ese modo moléculas que se pueden utilizar para estudios tanto de seguridad como clínicos. Estos anticuerpos también son capaces de destruir las células CD38+ por apoptosis y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Este Ejemplo describe un diagrama de flujo eficaz para la generación de anticuerpos específicos de CD38 y anticuerpos monoclonales que presentan reacción cruzada de células B murinas individuales.

Materiales y métodos

Generación de anticuerpos monoclonales

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

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

Inmunización de ratones y selección de células B individuales

También se aislaron anticuerpos anti-CD38 directamente a partir de células B positivas para el antígeno sin fusión con células de mieloma. Utilizando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-CD38, tales como mAb1 (véanse SEQ ID NO: 5 y 6 para las secuencias VH y VL, respectivamente, y SEQ ID NO: 7 y 8 para las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente). Brevemente, los ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad (S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME) recibieron cada uno tres rondas de inmunización en el transcurso de 41 días utilizando el método clásico descrito por A. Wennerberg et al. (1993 Am. J. Pathol. 143:1050-1054). El

antígeno se administró intraperitonealmente en una localización ventral de los ratones. Tres días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se aislaron los bazos de manera aséptica y se lavaron con medio RPMI de nueva aportación. Los linfocitos se retiraron de los bazos y la suspensión de una sola célula se lavó dos veces con medio RPMI antes de su clasificación utilizando una estrategia de clasificación de cuatro colores que incluía un panel de anticuerpos fluorescentes y proteínas CD38 humanas y de mono duales y a continuación se separaron utilizando la clasificación celular por citometría de flujo para aislar células B que producen IgG específicas de CD38 con reacción cruzada humano/mono. Las células individuales se clasificaron directamente en tubos de PCR para amplificar el par cognado de genes de VH y VL mediante RT-PCR (T. Tiller, C. Busse y H. Wardemann 2009 J. Immunol. Methods 350:183-193). El ADN resultante se secuenció.

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

Generación de anticuerpos mediante inmunización en ratones transgénicos para inmunoglobulina humana y selección utilizando la tecnología de hibridoma

Las inmunizaciones, la fusión y el escrutinio se realizaron utilizando células de mieloma P3X63-Ag8.653 con el dominio extracelular de CD38 humana como describen Kilpatrick *et al.* 1997 en Hybridoma 16: 381389. Utilizando el método RIMMS descrito por Kilpatrick *et al.,* los Trianni Mice™ transgénicos hembra de 6-8 semanas de edad que

comprendían ADN que codificaba las regiones variables de la cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana recibieron cada uno cuatro rondas de inmunización en el transcurso de 14 días a intervalos de 3-4 días. La proteína CD38 emulsionada en coadyuvante de RIBI (Sigma núm. T2684) se administró subcutáneamente en seis sitios próximos a los ganglios linfáticos de drenaje, a lo largo del dorso de los ratones y en seis sitios yuxtapuestos a lo largo del abdomen. Cuatro días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron. Los ganglios linfáticos poplíteo bilateral, inguinal superficial, axilar y branquial se aislaron de manera aséptica y se lavaron con medio RPMI de nueva aportación. Los linfocitos se recuperaron de los ganglios linfáticos y la suspensión de una sola célula se lavó dos veces con medio RPMI antes de ser fusionados con células de mieloma P3X63-AG8.653 utilizando polietilenglicol. Después de la fusión, la mezcla celular se incubó en una incubadora a 37° C durante 16-24 horas. La preparación celular resultante se transfirió a medio semi-sólido selectivo y se cultivó en placa de manera aséptica en placas de Petri de 100 mm y se incubó a 37°C. Diez días después del inicio de la selección, las placas se examinaron para determinar el crecimiento del hibridoma, y las colonias visibles se recogieron y se colocaron en placas de 96 pocillos que contenían 200 µL de medio de crecimiento. Las placas de 96 pocillos se mantuvieron en una incubadora a 37°C durante 2 a 4 días. Utilizando esta técnica, y el inmunógeno descrito más arriba, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-CD38 tales como mAb 6 (véanse SEQ ID NO: 9 y 10 para las secuencias de VH y VL, respectivamente, y SEQ ID NO: 11 y 12 para las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. Las secuencias de VH y VL se recuperaron mediante RT-PCR y se produjo mAb 6 mediante expresión transitoria como se ha descrito más arriba.

Afinidad de unión a dominios extracelulares de CD38 solubles

Las propiedades de unión de los mab anti-huCD38 se evaluaron utilizando BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ). Brevemente, se acopló un chip biosensor CM5 BIAcore al aparato y se activó con 250 µL de NHS/EDC 1:1 a la temperatura ambiente. Una IgG1 anti-Fc humano de ratón (GE Healthcare núm. BR-1008-39) (13,5µg/mL en tampón acetato 0,05 M, pH 5) se inmovilizó sobre los chips activados en las celdas de flujo 1. La inmovilización se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 5 µL/min. El chip se bloqueó después por inyección de 55 µL de etanolamina-HCl, pH 8,5, seguido de cinco lavados con NaOH 50 mM, NaCl 1M. Para medir la unión de los mab anti-CD38 a la proteína CD38 humana o a la proteína CD38 cino, se utilizaron los anticuerpos a 2 µg/mL en tampón de migración de BIAcore (HBS-EP). Los antígenos (CD38 humana-etiqueta de histidina (ID2) o CD38 cino-etiqueta de histidina (ID3)) se inyectaron a 3-1.000 nM. Una vez completada la fase de inyección, se controló la disociación en tampón de migración de BIAcore a la misma velocidad de flujo durante 360 seg. La superficie se regeneró entre las inyecciones utilizando 30 µL de NaOH 50 mM-NaCl 1 M. Los sensogramas individuales se analizaron utilizando el soporte lógico BIAsimulation.

Afinidad de unión a pre-células B que expresaban CD38 humana

La unión de anticuerpos anti-CD38 a CD38 expresada sobre la superficie de células preB::300.19 murinas recombinantes se determinó mediante citometría de flujo. La línea celular recombinante fue descrita por J. Deckket et al. 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Las células preB::300.19 murinas que expresaban CD38 se aplicaron como recubrimiento a 40.000 células/pocillo sobre una placa High Bind de 96 pocillos (MSD L15XB-3) y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpos anti-CD38 durante 45 min a 4°C y se lavaron tres veces con BSA al 1% en PBS. Se añadieron 100 µL/pocillo de anti-IgG humana de cabra conjugada con Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; núm. 109-545-098) durante 45 min a 4°C y se lavaron tres veces con BSA al 1% en PBS. La unión

del anticuerpo se evaluó después de la centrifugación y la resuspensión de las células añadiendo 200 µl/pocillo de BSA al 1% en PBS y se leyó utilizando Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System. Los valores de KD aparente y CE50 se estimaron utilizando BIOST@T-BINDING y el soporte lógico BIOST@T-SPEED, respectivamente.

Resultados

La unión de mAb1 recién aislado a células SU-DHL-8 o MOLP-8 humanas se comparó con la de isatuximab utilizando citometría de flujo (**FIG. 1A**). Ambos anticuerpos mostraron una unión de alta afinidad a ambas líneas celulares. Sin embargo, solamente mAb1 fue capaz de unirse a células que expresaban CD38 de mono cinomolgo sobre su superficie (**FIG. 1B**).

La unión a dominios extracelulares solubles de los polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo se examinó para los anticuerpos mAb1 y mAb6 recién aislados utilizando la resonancia de plasmón superficial (SPR). Los resultados de la SPR se resumen en la Tabla A.

Tabla A. Afinidad de unión de anticuerpos al dominio extracelular soluble de hCD38 y cCD38 según lo determinado mediante ensayo SPR.

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

También se utilizó la citometría de flujo para examinar la unión de anticuerpos anti-CD38 mAb1 y mAb6 a pre-células B murinas que expresaban el polipéptido CD38 humano o de mono cinomolgo sobre su superficie celular. Los resultados se muestran en

la Tabla B. Ambos anticuerpos probados mostraron una elevada afinidad de unión a células preB::300.19 que expresaban huCD38 o cCD38.

Tabla B. Afinidad de unión de anticuerpos a hCD38 o cCD38 expresado por células preB::300.10 murinas según lo determinado por citometría de flujo.

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

Estos resultados demuestran la generación de anticuerpos que se unen con elevada afinidad a los polipéptidos CD38 de ser humano y mono cinomolgo. Estos anticuerpos, a diferencia de otros anticuerpos anti-CD38, presentan reacción cruzada con los polipéptidos CD38 de ser humano y mono cinomolgo en la forma extracelular soluble o expresado sobre la superficie de células de mamífero.

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

Este Ejemplo describe la humanización de los anticuerpos generados en el Ejemplo 1.

Las secuencias de los dominios variables de mAb1 se analizaron in-silico. Se utilizó la definición del sistema de información para inmunoglobulinas The International ImMunoGeneTics (IMGT) para identificar las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR).

Primero, en paralelo, se acometieron las búsquedas para identificar la combinación de secuencias de proteínas de la línea germinal de Ratón y la línea germinal Humana más próximas para cada cadena variable. Esto se realizó utilizando una búsqueda Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)

frente a las bases de datos de secuencias de proteínas de la línea germinal de Ratón y Humana. Para cada cadena de anticuerpo, se encontraron las secuencias de proteína de ratón y ser humano para V y J más próximas. La calificación de esta elevada identidad de secuencia de proteínas se midió por el porcentaje de identidad de la región V. Los resultados de las búsquedas para la cadena ligera y pesada de mAb1 se presentan en las Tablas C y D, respectivamente.

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

Especie	**Alelo V**	**Identidad Región V (%)**	**Alelo J**
[Homo sapiens] ***Mejores Líneas Germinales Funcionales***	IGKV4-1*01 (imgt) *Funcional*	66,34 %	IGKJ1*01 (imgt) *Funcional*
[Mus musculus] ***Mejores Líneas Germinales Funcionales***	IGKV3-10*01 (imgt) *Funcional*	**96,97 %**	IGKJ1*01 (imgt) *Funcional*

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

Especie	**Alelo V**	**Identidad Región V (%)**	**Alelo J**
[Homo sapiens]	IGHV1-3*01	69,39 %	IGHJ4*01

Mejores Líneas Germinales Funcionales	(imgt) *Funcional*		(imgt) *Funcional*
[Mus musculus] ***Mejores Líneas germinales Funcionales***	IGHV1-12*01 (imgt) *Funcional*	**87,76 %**	IGHJ3*01 (imgt) *Funcional*

A continuación, se escrutaron las secuencias de dominio variable de mAb1 para determinar las propensiones de las secuencias, tales como la desamidación, la escisión con ácido, la oxidación, o los sitios de formación de iso-aspartato. La estructura de mAb1 ha sido analizada mediante modelado 3D por homología con el fin de definir cuántos restos de aminoácidos interaccionan de manera intra o intermolecular. Esta etapa condujo a la identificación de un grupo de restos de aminoácido que son estructuralmente importantes para las funcionalidades de mAb1 como la conformación de las CDR y la unión al antígeno. Estos restos de aminoácido se seleccionaron para que estuvieran presentes en las secuencias variables de mAb1 humanizadas.

Las CDR del mAb1 murino parental se injertaron sobre los marcos relevantes. Basándose en los análisis anteriores, se seleccionaron **IGKV3-20*02 humana** acoplada con **IGKJ1*01** e **IGHV1-3*01 humana** acoplada con **IGHJ4*01** para que sean la base para la humanización de la cadena ligera variable y la cadena pesada variable de mAb1, respectivamente. La cadena ligera de mAb1 presentó una identidad de 64,52 % a lo largo de la región V con la línea germinal IGKV3-20*02 humana seleccionada. La cadena pesada de mAb1 presentó una identidad de 69,39 % a lo largo de la región V con la línea germinal IGHV1-3*01 humana seleccionada. Durante el procedimiento de humanización,

las CDR de mAb1 murino parental se transplantaron entre los marcos de la línea germinal seleccionada con el fin de recomponer las secuencias variables del anticuerpo patrón. Se prestó atención al grupo previamente identificado de restos de aminoácido de mAb1 que son estructuralmente importantes para sus funcionalidades, como se indicó más arriba. Si era necesario, esos restos de aminoácido se remplazaban en las secuencias recién creadas por su correspondiente resto de mAb1 exacto. Esto corresponde a una etapa de retro-mutación para incorporar restos de aminoácido de la secuencia parental adecuada. Algunas mutaciones de CDR se incorporaron tanto para la humanización como para evitar las propensiones de las secuencias en las CDR parentales. Las secuencias variables ligeras y pesadas recién creadas se utilizaron para generar modelos de homología 3D de la región variable de mAb1 humanizada. Los modelos 3D se construyeron utilizando Model Antibody Framework del paquete de programas BIOVIA Discovery Studio.

Basándose en el enfoque de injerto de CDR, se generaron dos variantes para la cadena ligera variable (V_{L1} y V_{L3}) y cuatro variantes para la cadena pesada variable (VH1, VH3, VH5 y VH6). La combinación concreta de restos de aminoácido que varían entre las secuencias ligera y pesada variables de mAb1 y sus versiones humanizadas se exponen en la Tabla E y la Tabla F, respectivamente.

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

Regiones Ig (IMGT)	**VL de mAb1 parental**	**V_{L1} humanizada**	**V_{L3} humanizada**
FR1	**S10**	**T**	**T**
	A12	**S**	**S**
	V13	**L**	**L**
	L15	**P**	**P**

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

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

Regiones Ig (IMGT)	**VH de mAb1 parental**	**V_{H1} humanizada**	**V_{H3} humanizada**	**VH5 humanizada**	**VH6 humanizada**

	Q5	**V**	**V**	**V**	**V**
	L11	**V**	**V**	**V**	**V**
FR1	**R13**	**K**	**K**	**K**	**K**
	S14	**P**	**P**	**S**	**P**
	M20	**V**	**V**	**V**	**M**
CDR1	**F32**	**Y**	**F**	**F**	**F**
	N33	**A**	**N**	**N**	**N**
FR2	**T40**	**A**	**A**	**A**	**A**
	G44	**R**	**R**	**G**	**R**
CDR2	**N55**	**Q**	**N**	**N**	**N**
	K65	**Q**	**Q**	**Q**	**Q**
	K67	**R**	**R**	**R**	**R**
	S76	**A**	**A**	**A**	**A**
FR3	**Q82**	**E**	**E**	**E**	**E**
	I83	**L**	**L**	**I**	**I**
	T87	**R**	**R**	**R**	**R**
	S91	**T**	**T**	**T**	**T**

La variante VL1 humanizada con SEQ ID NO: 14 presenta un total de 22 mutaciones *(18 en las FR y 4 en las CDR)* en comparación con la VL parental de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 6. Esta variante derivaba de las regiones marco de las líneas germinales humanas IGKV3-20*02 acopladas con IGKJ1*01 con 8 retro-mutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura de mAb, la conformación de las CDR y por lo tanto, sobre la unión a su diana. Cuatro posiciones de

las CDR parentales se mutaron con el fin de incrementar la tasa de humanización o evitar las propensiones de las secuencias.

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

La variante V_{H1} humanizada con SEQ ID NO: 13 presenta un total de 17 mutaciones *(14 en las FR y 3 en las CDR)* en comparación con la VH parental de la secuencia mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivaba de las regiones marco de las líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 11 retro-mutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura de mAb, la conformación de las CDR y por lo tanto, sobre la unión a su diana. Tres posiciones de las CDR parentales fueron mutadas con el fin de incrementar la tasa de humanización o evitar las propensiones de las secuencias.

La variante V_{H3} humanizada con SEQ ID NO: 17 presenta un total de 14 mutaciones *(14 en las FR)* en comparación con la VH parental de la secuencia mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivaba de las regiones marco de las líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 11 retro-mutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura de mAb, la conformación de las CDR y por lo tanto, sobre la unión a su diana.

La variante VH5 humanizada con SEQ ID NO: 21 presenta un total de 11 mutaciones *(11 en las FR)* en comparación con la VH parental de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivaba de las regiones marco de las líneas germinales

humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 14 retro-mutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura de mAb, la conformación de las CDR y por lo tanto, sobre la unión a su diana.

La variante VH6 humanizada con SEQ ID NO: 23 presenta un total de 12 mutaciones *(12 en las FR)* en comparación con la VH parental de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivaba de las regiones marco de las líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 13 retro-mutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura de mAb, la conformación de las CDR y por lo tanto, sobre la unión a su diana.

Las secuencias variables humanizadas ligeras y pesadas resultantes comparadas mediante BLAST para determinar la similitud de secuencia frente a la base de datos Immune Epitope Data Base (IEDB) ((PLos Biol (2005) 3(3)e91) www.iedb.org) para asegurarse de que ninguna de las secuencias contenía un epítopo de células B o T conocido enumerado en ella.

Las secuencias variables de aminoácidos completas de mAb1 y los dominios variables ligeros y pesados humanizados se exponen en la Tabla G. Estos dominios variables ligeros y pesados humanizados han sido combinados para generar varias versiones humanizadas de dominios variables parentales de mAb1. Los dominios variables de mAb2 corresponden a la asociación de V_{H1} humanizada combinada con VL1 humanizada. Los dominios variables de mAb3 corresponden a la asociación de V_{H3} humanizada combinada con VL3 humanizada. Los dominios variables de mAb4 corresponden a la asociación de VH5 humanizada combinada con VL3 humanizada. Los dominios variables de mAb5 corresponden a la asociación de VH6 humanizada con VL3 humanizada. Las proteínas de unión triespecíficas mostradas en la Tabla G se describen con mayor detalle en el Ejemplo 4.

Las correspondientes secuencias de ADN codificantes de las variantes VH y VL humanizadas descritas más arriba se clonaron en un vector de expresión de mamífero que codificaba respectivamente los dominios IgG1 humano o Ck humano para la expresión transitoria y la purificación como se describe en el Ejemplo 1. Las secuencias de aminoácidos de las variantes anti-CD38 humanizadas completas derivadas de mAb1 se enumeran como mAb2 (cadena pesada: HC1, SEQ ID NO: 15; cadena ligera: LC1, SEQ ID NO: 16), mAb3 (cadena pesada: HC3, SEQ ID NO: 19; cadena ligera: LC3, SEQ ID NO: 20), mAb4 (cadena pesada: HC5, SEQ ID NO: 22; cadena ligera: LC3, SEQ ID NO: 20), y mAb5 (cadena pesada: HC6, SEQ ID NO: 24; cadena ligera: LC3, SEQ ID NO: 20).

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

Las variantes anti-CD38 humanizadas generadas en el Ejemplo 2 se caracterizaron a continuación para la unión a polipéptidos CD38 humanos y de cinomolgo y la inducción de la apoptosis.

Materiales y métodos

Ensayo de inducción de apoptosis

Las células se incubaron a $2x10^5$ células/mL en medio completo (RPMI-1640, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM) con 1,5 µg/mL (10 nM) de los anticuerpos indicados durante 20 horas a 37°C con 5% de CO2. Las células se tiñeron con AnexinaV-FITC de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo sobre un citómetro de flujo BD FACSAria™ con el soporte lógico BD FACSDiva para el control de adquisición y el análisis de los datos (ambos de BD Biosciences).

Resultados

Se examinaron las propiedades de unión de los anticuerpos anti-CD38 humano seleccionados producidos como se ha descrito anteriormente (**FIGS. 2A-2H**). La unión de los anticuerpos a CD38 humano soluble y a CD38 de mono cinomolgo se examinó utilizando ELISA y SPR. Los datos de ELISA se utilizaron para determinar la CE50 de la unión del anticuerpo a CD38 humano y de mono cinomolgo para anticuerpos anti-CD38 humanizados mAb2 (**FIG. 2A**), mAb3 (**FIG. 2C**), mAb4, mAb5 (**FIG. 2E**), y anticuerpo anti-CD38 humano mAb6 (**FIG. 2I**).

La unión de las variantes anti-CD38 humanizadas o mAb anti-CD38 humano a CD38 también se evaluó utilizando el ensayo SPR descrito anteriormente. Los datos de SPR se utilizaron para determinar la K_D y la k_{off} de la unión del anticuerpo a CD38 humana y de mono cinomolgo para anticuerpos anti-CD38 humanizados mAb2 (**FIG. 2B**), mAb3 (**FIG. 2D**), mAb4, mAb5 (**FIG. 2F**), y anticuerpo anti-CD38 humano mAb6 (**FIG. 2H**). Los datos de unión se resumen en la Tabla K que muestra que todos los mAb anti-CD38 se unen a CD38 con características de unión similares.

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

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

mAb6	2,03E-04	1,44E-09	1,90E-04	1,38E-09

La capacidad de las variantes anti-CD38 humanizadas para unirse a células que expresan CD38 se evaluó utilizando el ensayo de unión basado en FACS descrito anteriormente. Los datos de FACS se utilizaron para determinar la CE50 de la unión del anticuerpo a CD38 humano y de mono cinomolgo para anticuerpos anti-CD38 humanizados mAb2 (**FIG. 2A**), mAb3 (**FIG. 2C**), mAb4, mAb5 (**FIG. 2E**), y anticuerpo anti-CD38 humano mAb6 (**FIG. 2G**). Los datos de unión, expuestos en la Tabla L, muestran que todas las variantes anti-CD38 humanizadas mostraban afinidades de unión similares para CD38 de la superficie celular.

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

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

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

A continuación se examinó la capacidad del anticuerpo mAb1 parental y mAb7 para inducir apoptosis. Ambos anticuerpos aumentaron la tinción con Anexina V y la

absorción de yoduro de propidio (PI). Cuarenta por ciento de las células se volvieron doblemente positivas para Anexina V y PI después del tratamiento con mAb7, mientras 60% de las células tratadas con mAb1 fueron doblemente positivas. Ambos anticuerpos mostraron un efecto apoptótico dependiente de la concentración similar en células SU-DHL-8 (**FIG. 2J**). De un modo similar, ambos anticuerpos promovieron la actividad ADCC contra células SU-DHL-8 en presencia de células NK92 (**FIG. 2K**), conduciendo a 60% de citotoxicidad y a una CI50 de 4-6 pM después de 4 horas at 37°C (**FIG. 2L**).

Se identificó una isoforma E de CD38 *in silico* y se validó a nivel de transcrito a partir de células NK, PBMC, y BMMC de pacientes de mieloma múltiple y líneas celulares de cáncer (MOLP-8, CU1702, y CU2332). La isoforma E de CD38 se puso de manifiesto por un escrutinio de bases de datos de secuencias nucleicas utilizando el programa BLASTN 2.2.26 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) sobre la edición de bases de datos de transcritos Human RefSeq 20131216. El programa BLASTN se aplicó sin enmascarar las regiones de baja complejidad de la secuencia y considerando al menos: una identidad de 98,5% con la secuencia nucleica de la isoforma A de CD38 humana en un tramo de 100 restos de ácido nucleico de longitud mínima. Las secuencias destacadas de este escrutinio se volvieron a alinear con el locus del gen CD38 con el fin de que fueran validadas por ser formas transcripcionales del gen CD38 humano (la misma estructura genómica Exón-Intrón). La secuencia nucleica de la isoforma E de CD38 fue una de las secuencias validadas por ser formas transcripcionales del gen CD38 humano.

También se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-CD38 para unirse a ambas isoformas A y E de CD38 humano. Para evaluar la unión a la isoforma A y E de

CD38, se llevó a cabo un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) utilizando las proteínas de isoforma A e isoforma E (preparadas como se describe en el Ejemplo 1) como antígeno de captura. Se recubrieron placas de 96 pocillos con cualquier isoforma a 0,5 µg/pocillo en PBS y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpos a la placa. La placa se incubó a 37°C durante 1 h y se lavó cinco veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBS-T). Después, se añadieron 100 µL de una dilución 1:25.000 de anti-IgG humana, conjugada con peroxidasa de rábano picante, (Jackson Ref: 109-035-098) a cada pocillo. Después de la incubación a 37°C durante 1 h en la oscuridad, las placas se lavaron con PBS-T cinco veces. La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo tampón TMB-H2O2 y se leyó a una longitud de onda de 450 nm. Los valores de CE50 se estimaron utilizando el soporte lógico BIOST@T-SPEED.

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

Tabla L2. Afinidad de unión de anticuerpos anti-CD38 para las isoformas A y E de CD38, basándose en CE50 según se determina por medio de ELISA.

Anticuerpo	Isoforma A de CD38 CE50 (nM)	Isoforma E de CD38 CE50 (nM)
mAb1	0,11 (CV 9 %)	0,08 (CV 7%)
mAb2	0,14 (CV 13%)	0,10 (CV 12%)
mAb6	0,47 (CV 3,7%)	0,32 (CV 5%)
mAb7	0,10 (CV 7,1%)	Sin unión

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

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

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

Asimismo se evaluó la capacidad de las variantes anti-CD38 humanizadas para inducir apoptosis por medio de un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) como se describió anteriormente. Previamente se habían identificado varios anticuerpos anti-CD38 con diversas propiedades funcionales, si bien algunos de estos pueden mediar la destrucción *in vitro* de líneas celulares CD38+ a través del impacto directo sobre la proliferación celular o la apoptosis. Los resultados de los ensayos de inducción de la apoptosis se muestran en la **FIG. 2M**. Todos los anticuerpos generados en los Ejemplos 1 y 2 fueron capaces de inducir apoptosis excepto mAb6. Los anticuerpos anti-CD38 mAb2,

mAb3, mAb4, y mAb5 condujeron a una inducción dependiente de la dosis de la apoptosis en células de linfoma SU-DHL-8; se proporciona la CI50 para cada anticuerpo en las **FIG. 2N-2Q**.

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

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

Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 se sometieron a prueba en el formato triespecífico (anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3) para determinar su capacidad de unión a CD38 cuando otros dominios de unión a antígeno están unidos a sus ligandos cognados utilizando SPR. El ensayo de unión a ligando secuencial se muestra en la **FIG. 3B**. Para la unión secuencial de los tres antígenos a cada Ab triespecífico, se inyectó la concentración saturante (> 10 KD) de cada antígeno durante 8 min seguido de 5 min de disociación. La regeneración de la superficie se llevó a cabo inyectando Glicina-HCl 10 mM pH 2,5 durante 60 seg a 30µl/min. Los datos se ajustaron con un modelo de unión cinética 1:1 y se analizaron utilizando el soporte lógico Biacore S200 Evaluation Software v 1.0. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculó utilizando la constante de la velocidad de asociación (k_{on}) y la constante de la velocidad de disociación (k_{off}).

Como se muestra en la **FIG. 3C**, este ensayo basado en SPR mostró que las proteínas de unión triespecíficas eran capaces de unirse a CD38 con independencia de si los dominios de unión al antígeno CD3 y/o CD28 también se unían a su antígeno cognado. Los resultados de un ensayo de unión secuencial ilustrativo se muestran en la **FIG. 4**. Los parámetros cinéticos medidos mediante SPR se proporcionan en la Tabla M2.

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

Estado de la proteína de unión antes de la unión a CD38	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**
Sin unión previa	9,02E+05	1,42E-03	1,57E-09
Unido previamente a CD3	8,35E+05	1,24E-03	1,48E-09
Unido previamente a CD28	7,39E+05	1,32E-03	1,79E-09
Unido previamente a CD3 después a CD28	8,18E+05	1,23E-03	1,50E-09
Unido previamente a CD28 después a CD3	8,37E+05	1,23E-03	1,47E-09

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

A continuación, se evaluó cada dominio de unión a antígeno de la proteína de unión triespecífica $CD38_{SB19x}CD28_{supx}CD3_{mid}$ mediante SPR para determinar la capacidad para unirse al antígeno cognado con y sin los otros dos dominios de unión a antígeno en saturación. Las Tablas M3 y M4 muestran los resultados de estos ensayos.

Tabla M3. Unión a la diana sin otras dianas presentes

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

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

Diana	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**
CD38	5,93E+05	1,44E-03	2,42E-09
CD28	1,05E+05	3,96E-04	3,77E-09
CD3	1,27E+05	2,36E-03	1,86E-08

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

Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 se sometieron a ensayo en un formato triespecífico con dos dominios de unión a antígeno anti-CD28 (súper agonista, “sup,” y agonista convencional, “cvn”) y dos dominios de unión a antígeno anti-CD3 (“mid” y “low”). Las secuencias de dominios variables para estos dominios de unión a antígeno se proporcionan como sigue: anti-$CD28_{sup}$: SEQ ID NO: 49 (VH) y SEQ ID NO: 50 (VL); anti-$CD28_{cvn}$: SEQ ID NO: 51 (VH) y SEQ ID NO: 52 (VL); anti-$CD3_{mid}$: SEQ ID NO: 53 (VH) y SEQ ID NO: 54 (VL); anti-$CD3_{low}$: SEQ ID NO: 84 (VH) y SEQ ID NO: 85 (VL). Los resultados de los ensayos de SPR que examinan la unión de proteínas de unión triespecíficas se muestran en la **FIG. 5**. Tres dominios de unión anti-CD38 tuvieron prácticamente la misma afinidad de unión en el formato de proteína de unión triespecífica que en un formato monoespecífico. Ambos dominios de unión a CD3 tuvieron aproximadamente la misma afinidad de unión en los formatos mono-, bi-, y triespecíficos. Los dominios de unión a CD28 mostraron una afinidad de unión ligeramente inferior (pero todavía nanomolar) en el formato bi- o triespecífico en comparación con el monoespecífico. Cuando los otros dos dominios de unión a antígeno se saturaron, los

dominios de unión a anti-$CD38_{SB19}$ y anti-$CD28_{sup}$ tuvieron afinidades de unión similares, en comparación con el momento en el que los otros dos dominios de unión a antígeno no estaban unidos a antígeno. Sin embargo, el dominio de unión anti-$CD3_{mid}$ mostró cinéticas más rápidas cuando los otros dos dominios de unión a antígeno estaban saturados. Estos resultados demuestran que los dominios de unión anti-CD38, anti-CD28, y anti-CD3 son compatibles para su uso con el formato de proteína de unión triespecífica.

Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 generados en la presente memoria también se compararon con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 existente de mAb7 (véanse las secuencias SEQ ID NO: 47 para VH y SEQ ID NO: 48 para VL, respectivamente). La unión de moléculas triespecíficas a CD38 expresado sobre la superficie de células preB::300.19 murinas recombinantes se determinó mediante citometría de flujo y los correspondientes anticuerpos monovalentes anti-CD38 se sometieron a ensayo paralelamente. La línea celular recombinante fue descrita por J. Deckket et al. 2014 en Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Las células preB::300.19 murinas que expresaban CD38 se recubrieron a 40.000 células/pocillo sobre una placa High Bind de 96 pocillos (MSD L15XB-3) y se añadieron 100 µL/pocillo de moléculas triespecíficas durante 45 min a 4°C y se lavaron tres veces con BSA al 1% en PBS. Se añadieron 100 µL/pocillo de anti-IgG humana de cabra conjugado con Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; núm. 109-545-098) durante 45 min a 4°C y se lavaron tres veces con BSA al 1% en PBS. La unión del anticuerpo se evaluó después de la centrifugación y la resuspensión de las células añadiendo 200 µl/pocillo de BSA al 1% en PBS y se leyó utilizando Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System. Los valores de la KD aparente y de la CE50 se estimaron utilizando BIOST@T-BINDING y el soporte lógico BIOST@T-SPEED, respectivamente.

Se utilizó la citometría de flujo como se ha descrito anteriormente para examinar la unión de mAb7 o la proteína de unión triespecífica con el dominio de unión antígeno anti-CD38 de mAb7 a células pre-B murinas que expresan el polipéptido CD38 humano o de mono cinomolgo sobre su superficie celular. Como se muestra en la **FIG. 6A**, la proteína de unión triespecífica CD38xCD28$_{supx}$CD3$_{mid}$ con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb7 se unían a células que expresaban CD38 humano (superior izquierda) con una afinidad aparente 8 veces menor que el anticuerpo monoespecífico de mAb7 (superior derecha). Ni el anticuerpo monoespecífico de mAb7 (inferior derecha) ni la proteína de unión triespecífica con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb7 (inferior izquierda) se unieron a las células que expresaban CD38 de cinomolgo.

El dominio de unión del anticuerpo anti-CD38 humanizado de mAb2 también se sometió a ensayo en formatos triespecíficos para determinar la unión a las células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de cinomolgo. Como se muestra en las **FIG. 6B-6D**, y a diferencia de mAb7, las proteínas de unión triespecífica CD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ y CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$ con dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2, así como el anticuerpo monoespecífico mAb2, fueron capaces de unirse a polipéptidos CD38 tanto de ser humano como de mono cinomolgo. La proteína de unión triespecífica CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$ con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 se unió a células que expresaban CD38 humano con una afinidad aparente 9 veces inferior que el anticuerpo mAb2 parental (compárese la **FIG. 6C**, superior con la **FIG. 6D**, superior). La proteína de unión triespecífica CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$ con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 se unió a células que expresaban CD38 de cinomolgo con una afinidad aparente 7,5 veces menor que el anticuerpo mAb2 parental (compárese la **FIG. 6C**, inferior con la **FIG. 6D**, inferior). La proteína de unión triespecífica CD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 se unió a

las células que expresaban CD38 humano con una afinidad aparente 2,5 veces menor que la proteína de unión triespecífica CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$ con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 (compárese la **FIG. 6C**, superior con la **FIG. 6B**, superior).

El dominio de unión del anticuerpo anti-CD38 humanizado mAb6 también se comparó con el anticuerpo monoespecífico mAb6 para determinar la unión a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de cinomolgo. Si bien el anticuerpo mono específico mAb6 se unía a las células que expresaban polipéptidos CD38 humanos (superior derecha) o de mono cinomolgo (inferior derecha) en el intervalo nM (**FIG. 6E**), la proteína de unión triespecífica CD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb6 se unió a las células que expresaban los polipéptidos CD38 humanos (superior izquierda) o de mono cinomolgo (inferior izquierda) sin saturación.

En conclusión, se encontró que la afinidad para la unión de la proteína de unión triespecífica CD38$_{SB19}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ a CD38 humano estaba en el mismo intervalo, se examine la unión a CD38 humano recombinante mediante SPR o a CD38 humano expresado sobre una superficie celular mediante citometría de flujo (**FIG. 6F**). De un modo similar, la afinidad de CD38V$_{H1}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid/low}$ (dominio de unión anti-CD38 de mAb2) y las proteínas de unión triespecíficas CD38V$_{H1}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid/low}$ (dominio de unión anti-CD38 de mAb2) para la unión a CD38 humano también estuvo en el mismo intervalo en ambos ensayos. Para CD38$_{HHY1370}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ (dominio de unión anti-CD38 de mAb6), se determinó por SPR que la K_D para la unión a CD38 humano era 1 nM, mientras no se pudo estimar un valor de CE50 exacto mediante citometría de flujo. En la Tabla M5 se proporciona un resumen de los valores de KD aparente (obtenidos mediante análisis FACS) de las proteínas de unión triespecíficas con diversos dominios de unión anti-CD38.

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

	KD aparente FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38
Triespecífica con antiCD38 *mAb2*	4,4 nM	7,5 nM
Triespecífica con antiCD38 mAb6	Sin saturación	Sin saturación
Triespecífica con antiCD38 mAb7	4 nM	Sin unión
	KD aparente FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	*Células que expresan cCD38*
mAb2	*0,5 nM*	*1 nM*
mAb6	*11,2 nM*	*6,6 nM*
mAb7	*0,5 nM*	*Sin unión*

Como se esperaba, la proteína de unión triespecífica ΔCD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ que carecía del dominio de unión anti-CD38 no se unía a las células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de mono cinomolgo (**FIG. 6G**). Esto indica que la unión observada en este ensayo era específica para los dominios de unión a antígeno CD38.

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

El siguiente Ejemplo describe experimentos que caracterizan la estabilidad, las propiedades de unión, y las actividades de los acopladores de células T novedosos que contienen dominios variables derivados de los anticuerpos mAb2 y mAb6. Se generaron anticuerpos anti-CD38xCD28xCD3 adicionales que comprendían variantes de los brazos anti-CD38, CD3 y CD28 de las proteínas de unión triespecíficas. Los nuevos anticuerpos anti-CD38/CD3/CD28 difieren en: 1) el dominio de unión anti-CD38 (mAb2 o mAb6); 2) el dominio de unión anti-CD3 ($CD3_{high}$ o $CD3_{low}$; véanse SEQ ID NO: 84 y 85 para las secuencias VH y VL anti-$CD3_{low}$, respectivamente); 3) el dominio de unión anti-CD28 ($CD28_{sup}$ o $CD28_{cvn}$). Dentro de las posibles combinaciones, se diseñó una colección de anti-CD38xCD28xCD3, se produjo, y con posterioridad se sometió a prueba para determinar diversas funciones.

Materiales y métodos

Producción y purificación de proteínas de unión triespecíficas

Se produjeron proteínas de unión triespecíficas mediante transfección transitoria de 4 plásmidos de expresión en células Expi293 utilizando ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se diluyó 25% (p/p) de cada plásmido en Opti-MEM, se mezcló con reactivo ExpiFectamine previamente diluido durante 20-30 minutos la temperatura ambiente (RT), y se añadió a células Expi293 ($2,5x10^6$ células/ml). A menudo se utilizó una optimización de la transfección para determinar la mejor razón de plásmidos con el fin de producir la proteína de unión triespecífica con un buen rendimiento y pureza.

A los 4-5 días de la transfección, el sobrenadante de las células transfectadas se recogió y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,45 µm (Nalgene). La proteína de unión triespecífica en el sobrenadante se purificó utilizando un procedimiento de 3 etapas. En primer lugar, se utilizó la purificación por afinidad con proteína A, y el Ab unido se hizo

eluir utilizando “Tampón de elución de IgG” (Thermo Fisher Scientific). En segundo lugar, se sometió a diálisis el producto frente a PBS (pH 7,4) durante la noche con 2 cambios de tampón PBS. Cualquier producto precipitado se aclaró por filtración a través de una unidad de filtro de 0,45 µm (Nalgene) antes de la siguiente etapa. En tercer lugar, se utilizó la purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Hiload 16/600 Superdex 200pg, o Hiload 26/600 Superdex 200pg, GE Healthcare) para eliminar los productos agregados y diferentes especies de la prep. Las fracciones se analizaron en SDS-PAGE reducida y no reducida para identificar las fracciones que contenían la proteína de unión triespecífica monomérica antes de combinarlas. El anticuerpo purificado se puede dividir en alícuotas y almacenar a -80°C a largo plazo.

Ensayos ELISA

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

Después del lavado, se añadió el anti-Fab humano secundario conjugado con HRP (1:5.000, Núm. Cat. 109-035-097, Jackson ImmunoResearch Inc) a cada pocillo y se incubó a RT durante 30 minutos. Después de lavar 5 veces con PBS + Tween 20 al 0,25%, se añadieron de 100 µl de TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL,

Gaithersburg, MD, EE.UU) a cada pocillo. La reacción se terminó añadiendo 50 µl de H_2SO_4 1M, y se midió la DO_{450} utilizando SpectraMax M5 (Molecular Devices) y se analizó utilizando el soporte lógico SoftMax Pro6.3 (Molecular Devices). Los datos finales se transfirieron al soporte lógico GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EE.UU), y se trazaron como se muestra. Se calculó la CE50 utilizando el mismo soporte lógico.

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

Ensayo de destrucción celular in vitro

Se estaban utilizando PBMC humanas purificadas para los ensayos de destrucción *in vitro* frente a diversas células cancerosas empleando diferentes proteínas de unión triespecíficas. Brevemente, el ensayo de destrucción se estableció en placas de fondo en V de 96 pocillos. Para cada placa, se cultivaron en placa 40 ml de PBMC de cada donante a 2x10^6 células/ml, y se prepararon 30 ml de células diana marcadas con PKH26 (Sigma Núm. MINI26) a 2,5x10^5 células/ml (4 µL de colorante para teñir 1x10^7 células). En primer lugar se añadieron a cada pocillo 20 µL/pocillo de proteínas de ensayo a diversas concentraciones o PMA, seguido de la adición de 80 µL/pocillo de células diana marcadas en cada pocillo (2X10^4 células/pocillo). Después se añadieron a cada pocillo 100 µL de PBMC, alcanzando E:T=10:1 pocillo (2x10^5 células/pocillo), y se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 37°C con 5% de CO2. Las células se centrifugaron, y el sobrenadante se recogió para medir la liberación de citocina, o se descartó. Las células

se tiñeron con tampón Vivid LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Staining Buffer (Life Technology núm. L34955) (el tampón de tinción se preparó añadiendo 60 µL de reactivo Vivid a 60 ml de PBS). Las células se resuspendieron en 100 µL de tampón de tinción mediante incubación durante 15 min a RT en la oscuridad. Después de lavar las células con 1xPBS, las células se resuspendieron en 200 µL de PBS con Paraformaldehído al 0,5%, y las células cancerosas PKH26+Vivid+ se recogieron por medio de un citómetro de flujo Fortessa (Beckton Dickinson, San Jose, CA), seguido de análisis utilizando el soporte lógico Flowjo. El porcentaje de destrucción se calcula como destrucción específica - destrucción espontánea/células totales y se traza como se muestra.

Ensayo de liberación de citocina

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

Modelos de ratón in vivo *y estudios de eficacia*

Se utilizaron ratones NSG injertados con células madre hematopoyéticas CD34+ humanas (hu-CD34) como modelo de ratón *in vivo*. Estos ratones desarrollan células inmunitarias humanas multi-linaje, y representan una plataforma validada para estudios de eficacia en inmuno-oncología (véase, p.ej., Shultz, L.D. *et al.* (2014) *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014:694-708). Los ratones NSG Hu-CD34^{+} se producen inyectando células madre hematopoyéticas CD34^{+}, que muestran un injerto multi-linaje eficaz de poblaciones de células inmunitarias humanas que incluyen células T, células B y algunas otras

poblaciones (McDermott, S.P. *et al.* (2010) *Blood* 116:193-200). La hematopoyesis multi-linaje se produce en 12 semanas. El injerto es estable durante más de un año sin enfermedad de injerto-contra-anfitrión.

Para el estudio de eficacia utilizando ratones NSG hu-CD34, los ratones se adquirieron de The Jackson Laboratory (Maine, EE.UU), y las poblaciones de células humanas se validaron antes de su uso. En general, se utilizaron $5x10^6$ células tumorales mezcladas en Matrigel (BD Biosciences) (50% v/v) para inocular el tumor en cada ratón. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó el intervalo de 100-150 mm^3, los ratones se seleccionaron y se asignaron al azar a cada grupo para el estudio. A los ratones se les administraron los anticuerpos intravenosamente a dosis determinadas 3 veces por semana. Se controló el peso corporal 1-3 veces por semana. El tamaño del tumor se midió por medio de mediciones del tumor con un calibre 1-3 veces /semana. Se terminó con todos los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 1.500 mm^3, o 24 horas después de la última dosis. Las muestras de sangre terminal (0,3 mL) se recogieron en tubos separadores de suero, se mezclaron invirtiéndolos suavemente cinco veces, y se colocaron en una gradilla de tubos. Los tumores terminales también se recogieron y se pesaron antes de ser colocados en fijador para su análisis inmunohistoquímico.

Los ratones NSG humanizados con PBMC humanas (hu-PBMC) se utilizaron como otro modelo de ratón *in vivo*. Estos ratones se produjeron inyectando PBMC humanas purificadas de donantes sanos, que tienen la tasa de injerto más rápida utilizando células mononucleares de sangre periférica adulta y permiten estudios a corto plazo que requieren una función de las células NK y las células T de memoria y efectora fuerte, y son adecuadas para estudios de eficacia a corto plazo (3-4 semanas) debido a la enfermedad de injerto-contra-anfitrión.

Para el estudio de eficacia utilizando ratones NSG hu-PBMC, se adquirieron ratones NSG de 8-10 semanas de edad (Núm. Cat.: 005557, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) de The Jackson Laboratory (Maine, EE.UU). Cada ratón se inoculó con $5x10^6$ células tumorales en Matrigel (BD Biosciences) (50% v/v) subcutáneamente. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó el intervalo de 50-100 mm^3, se reconstituyeron $10x10^6$ PBMC humanas de donantes sanos para cada ratón intraperitonealmente (IP). La reconstitución de células humanas se validó al día siguiente. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó el intervalo de 100-150 mm^3, los ratones se seleccionaron y se asignaron al azar a cada grupo para el estudio. Los anticuerpos se administraron intravenosamente a dosis determinadas 3 veces por semana. El peso corporal se controló 1-3 veces por semana. El tamaño del tumor se midió mediante mediciones del tumor con un calibre 1-3 veces/semana. Se terminó con todos los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 1.500 mm^3 o 24 horas después de la última dosis. Se recogieron muestras de sangre terminal (0,3 mL) en tubos separadores de suero, se mezclaron invirtiéndolos suavemente cinco veces, y se colocaron en una gradilla de tubos. Los tumores terminales también se recogieron y se pesaron antes de colocarlos en fijador para su análisis imunohistoquímico.

Para el modelo de ratón NSG hu-PMBC diseminado, se inyectaron1-$5x10^6$ células en cada ratón intravenosamente el día 0. El día 3, se tomaron imágenes de luminancia en el momento inicial para la aleatorización. El día 4, se reconstituyeron $10x10^6$ PBMC humanas de donantes sanos para cada ratón intraperitonealmente (IP). Los ratones se trataron semanalmente el día 5, 12, 19 utilizando las dosis indicadas. Se tomaron semanalmente imágenes corporales de luminancia el día 10, 17, 24 para controlar el volumen del tumor en cada animal. Al terminar el estudio, se recogieron sangre, bazo, hueso y médula ósea para su estudio histopatológico.

Resultados

La capacidad de los anticuerpos para unirse a los tres antígenos diana se sometió a prueba mediante un ensayo ELISA. IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{low}$, IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{low}$ mostraron una afinidad de unión similar a CD3 y CD38 humanos y de mono, pero una afinidad de unión variable a CD28 (ser humano y mono tienen un dominio extracelular idéntico) mostrando $CD28_{sup}$ mejor afinidad (**FIG. 7A**). La variante IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y las variantes LALA P329A y NNAS de IgG1 mostraron todas una unión similar a CD3, CD28, y CD38 humanos (**FIG. 7B**).

A continuación, se sometieron a prueba las variantes de proteínas de unión anti-CD38xCD3xCD28 para determinar su capacidad para inducir la activación de células T y la destrucción de células tumorales mediada por anticuerpos (**FIGS. 8A- 8D**). La **FIG. 8A** muestra las actividades de destrucción *in vitro* de IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$, contra la línea celular de mieloma múltiple humano RPMI-8226 utilizando PBMC de 3 donantes diferentes a E:T=10.Se calculó la CE50 de la actividad de destrucción y se resume en la Tabla N. Ambas proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xCD3xCD28 que contenían $CD28_{sup}$ mostraron mejores actividades de destrucción. También se examinaron las actividades de destrucción *in vitro* de estas moléculas utilizando las líneas celulares NCI-H929 (**FIG. 8B**), KMS-26 (**FIG. 8C**), y KMS-11 (**FIG. 8D**).

Las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD3xanti-CD28 con variantes LALA P329A NNAS de IgG1, o variante FALA de IgG4, también presentaron destrucción *in vitro* de células de mieloma múltiple KMS-11 (**FIG. 8E**) y U266 (**FIG. 8F**). Se calculó la

CE50 para cada anticuerpo contra cada línea celular y se resume en la Tabla Q2 (KMS-11) y Q3 (U266).

Las **FIG. 9A, 9B, y 10** muestran el perfil de activación de células T *in vitro* de las IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ e IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{low}$. Ambos anticuerpos mostraron actividades de activación similares para células T CD4 y CD8. La CE50 para cada anticuerpo contra cada línea celular se calculó y se resume en la Tabla N (RPMI-8226), Tabla O (NCI-H929), Tabla P (KMS-26), y Tabla Q (KMS-11).

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

Anticuerpo	**CE50 (ng/ml)**		
	Donante Núm. 65	Donante Núm. 67	Donante Núm. 68
IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$	5,30	1,95	3,3
IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$	2,24	3,42	3,4
IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$	8,31	29,52	46,8
IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$	4,62	8,98	16,5

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

	CE50 (ng/ml)		
	Donante Núm. 65	Donante Núm. 67	Donante Núm. 68
IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$	0,51	0,48	0,9
IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$	0,94	1,84	2,5

IgG4 CD38$_{VH1}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$	3,70	9,47	10,4
IgG4 CD38$_{hhy1370}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$	2,31	6,39	7,2

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

	CE50 (ng/ml)		
	Donante Núm.65	Donante Núm.67	Donante Núm.68
IgG4 CD38$_{VH1}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$	1.03	0.91	1.3
IgG4 CD38$_{hhy1370}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$	3.95	5.06	5.3
IgG4 CD38$_{VH1}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$	10.73	28.17	22.4
IgG4 CD38$_{hhy1370}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$	15.84	32.10	25.7

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

	CE50 (ng/ml)		
	Donante Núm. 65	Donante Núm. 67	Donante Núm. 68
IgG4 CD38$_{VH1}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$	3,05	3,40	14,7
IgG4 CD38$_{hhy1370}$xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$	4,17	7,74	25,1
IgG4 CD38$_{VH1}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$	18,14	98,83	566,8
IgG4 CD38$_{hhy1370}$xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$	16,30	27,63	139,2

Tabla Q2: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células KMS-11 CD38+ por PBMC de diferentes donantes (variantes de Fc de IgG1/4)

CE50 (pM) (KMS11)	**IgG4 FALA $CD38_{VH1}$ x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$**	**IgG1 LALA P329A $CD38_{VH1}$ x$CD28_{sup}$ x$CD3_{mid}$**	**IgG1 NNAS $CD38_{VH1}$ x$CD28_{sup}$ x$CD3_{mid}$**	**IgG4 FALA $CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$**	**IgG1 LALA P329A $CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$**	**IgG1 NNAS $CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$**
KP50901	3,879	4,375	4,411	7,731	9,311	17,71
KP50904	4,379	6,739	8,644	19,01	18,88	24,39

Tabla Q3: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células U266 CD38+ por PBMC de diferentes donantes (variantes de Fc de IgG1/4)

CE50 (pM) (U266)	**IgG4 FALA $CD38_{VH1}$x $CD28_{sup}$x $CD3_{mid}$**	**IgG1 LALA P329A $CD38_{VH1}$x $CD28_{sup}$x $CD3_{mid}$**	**IgG1 NNAS $CD38_{VH1}$x $CD28_{sup}$x $CD3_{mid}$**	**IgG4 FALA $CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$**	**IgG1 LALA P329A $CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$**	**IgG1 NNAS $CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$**
KP50901	1,879	1,031	1,150	2,691	1,597	2,816
KP50904	0,8657	3,570	2,018	2,112	0,8375	3,527

También se examinó la producción de citocinas inducida por las variantes de proteínas de unión triespecíficas (**FIGS. 11A y 11B**) utilizando el método descrito por Stebbings, R. *et al.* (2007) (*J. Immunol.* 179:3325-3331) recubriendo la placa con los

anticuerpos indicados, seguido de incubación con PBMC humanas durante 24 horas utilizando 2 concentraciones de los anticuerpos de ensayo (5 µg/ml y 25 ng/ml). Los sobrenadantes de cultivo de 24 horas se recogieron y se utilizaron para medir la concentración de IL2, IL6, IL10, IL12, y TNF-α, IFN-γ en los sobrenadantes como se describió anteriormente. IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$, IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ estimularon todos la producción de un nivel significativo de IL2, TNF-α, y IFN-γ a 5 µg/ml, pero no lograron inducir un nivel medible de cualquier citocina a 25 ng/ml, una dosis que muestra eficacia in vivo en 2 modelos de ratón NSG humanizados.

Se sometió a ensayo la actividad anti-tumoral en modelos de ratón *in vivo* para las variantes de proteínas de unión triespecíficas (**FIG. 12A-13F**) como se describió anteriormente. Las **FIG. 12A-12E** muestran el resultado del estudio de eficacia *in vivo* utilizando el modelo de ratón NSG injertado con células madre hematopoyéticas CD34+ humanas (hu-CD34) en el que se había implantado la línea celular humana de MM RPMI-8226. Se utilizaron IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y anticuerpos de biespecíficos CD38xCD3 de control de referencia para tratar a los ratones que portaban tumores a las dosis indicadas 3QW (6 doses en total). Se midieron el peso corporal y el crecimiento del tumor para cada ratón y se trazaron (**FIG. 12A y 12E**). También se trazaron la curva de crecimiento tumoral medio (**FIG. 12D**), el volumen del tumor el Día 18 (**FIG. 12B**) y el peso del tumor terminal el D19 (**FIG. 12C**) para cada grupo. Todos los grupos tratados con IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ no solamente mostraron una eficacia estadística en comparación con el control de PBS, también mostraron una eficacia estadísticamente mejor a la dosis de 1 µg/kg en comparación con el anticuerpo biespecífico CD38xCD3 de control.

Las **FIG. 13A-13F** muestran los resultados del estudio de eficacia *in vivo* utilizando el modelo de ratón NSG humanizado con PBMC humanas al que se ha implantado la línea celular humana de MM RPMI-8226. Se utilizaron IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ y anticuerpos biespecíficos CD38xCD3 de control de referencia para tratar ratones que portaban tumores a las dosis indicadas 3QW (8 dosis en total). Se midió el crecimiento del tumor para cada ratón y se trazó (**FIG. 13A**). También se trazaron la curva de crecimiento tumoral medio (**FIG. 13F**), el volumen del tumor el Día 4 (día de inicio del tratamiento; **FIG. 13B**), el volumen del tumor el Día 21 (día del último tratamiento; **FIG. 13C**), el volumen tumoral medio el Día 21 (**FIG. 13D**) y el peso del tumor terminal el Día 22 (**FIG. 13E**) para cada grupo. Todos los grupos tratados con IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ no solamente mostraron una eficacia estadística en comparación con el control de PBS, también mostraron una eficacia estadísticamente mejor a múltiples dosis en comparación con el anticuerpo biespecífico CD38xCD3 de control, indicando una actividad anti-tumoral *in vivo* superior mediante el anticuerpo anti-CD38/CD3/CD28 triespecífico.

El anticuerpo biespecífico CD38xCD3 de control de referencia comprendía las siguientes secuencias:

SEQ ID NO 108: cadena pesada 1 de referencia (se une a CD38)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAPGKGLEWVSEINP
QSSTINYATSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGNWFPYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP
VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRS
KYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWF
AYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS
TGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNVDTWVAWYQQKPGQSPKALIYSASYR
YSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ejemplo 6: Estudio de aumento gradual de la dosis con proteínas de unión triespecíficas que contienen mAb2 and mAb6 Anti-CD38

Materiales y métodos

Todos los estudios NHP se llevaron a cabo por medio de Covance (Princeton, New Jersey, EE.UU) de acuerdo con el protocolo Covance ICUCA. Se utilizaron Monos Cinomolgos macho no expuestos previamente a fármaco y proteína o no expuestos previamente a proteína en todos los estudios. Basándose en el diseño del estudio, los monos se seleccionaron y se agruparon para cada proteína de unión triespecífica. El anticuerpo se administró por infusión intravenosa durante 1 hora a través de la vena safena. Se administraron dosis crecientes en días consecutivos para las dosis bajas (<10

µg/kg), pero con un intervalo de 1-2 días para las dosis más altas (>10 µg/kg) con fines de observación. Las muestras de sangre se recogieron a las 0 horas (Día 1 solamente), 0,5 horas (infusión media), 1, y 6 horas desde el inicio de la infusión para todos los animales después de cada dosis, según se especifique. Se recogieron muestras de sangre no programadas adicionales a discreción del director del estudio, el patólogo, y/o el veterinario clínico. Todos los animales se devolvieron a la colonia el Día 60. Las PBMC y el suero de las muestras de sangre se prepararon utilizando métodos convencionales, y se conservaron para futuros análisis.

La sangre de los primates no humanos tratados se tiñó con anticuerpos conjugados fluorescentemente contra marcadores de células T e IgG humana, fragmento Fcγ y se analizaron en un citómetro de flujo.

Resultados

Se llevó a cabo un estudio de toxicidad de aumento gradual de la dosis utilizando proteínas de unión triespecíficas IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que contenía mAb2, IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que contenía mAb6, IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ que contenía mAb2, e IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ que contenía mAb6 en primates no humanos. Los tres dominios de unión en las 4 proteínas de unión presentaban reacción cruzada con polipéptidos CD38/CD3/CD28 de cinomolgo. El estudio se ideó para evaluar el perfil de toxicidad potencial de las moléculas. Las muestras de sangre se recogieron para el aislamiento del suero y las PBMC. Las poblaciones de células T circulantes se investigaron después de cada dosificación (**FIG. 14E-14H**), junto con la activación de la subpoblación de células T (CD69+) (**FIG. 14A-14D**). Los porcentajes de células T CD4 y CD8 disminuyeron con el aumento gradual de la dosis. La activación de células T CD4 y CD8 significativa fue prominente comenzando a dosis de 2,5 µg/kg, sugiriendo una capacidad de activación potente para las moléculas que contienen mAb2 y

mAb6. Se observó una deleción de células T circulantes con todas las proteínas a 12,5 µg/kg (**FIG. 14I-14L**), que de nuevo se correlaciona con la potencia. El agotamiento de células T circulantes fue más bien transitorio, retornando al nivel previo al tratamiento después de 24-48 horas (**FIG. 14M-14P**). También se midió el nivel en suero de varias citocinas. Se observó una liberación de IL-6 e IL-10 significativa a 12,5 µg/kg con todas las moléculas, que fue más bien transitoria, retornando al momento inicial a las 24 horas (**FIG. 14U**).

IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ (**FIG. 14V**) e IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ (**FIG. 14W**) indujeron ambas el agotamiento de las células T en sangre a dosis más altas. De un modo similar, IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ (**FIG. 14X**) e IgG4 $CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ (**FIG. 14Y**) también indujeron agotamiento de células T en sangre a dosis más altas. Sin embargo, las células T comenzaron a reaparecer en la sangre 24 horas después del tratamiento con cualquiera de las cuatro proteínas de unión triespecíficas (**FIG. 14Z-14AC**). Las **FIG. 14AD y 14AE** muestran la cantidad de IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ unida a células T CD4+ después de la administración de una dosis de 100µg/kg. Las **FIG. 14AF y 14AG** muestran la cantidad de IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ unida a células T CD8+ después de la administración de una dosis de 100µg/kg. Estos datos demostraban claramente que el Ab IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ se puede unir a células T in vivo con un tiempo prolongado (48-72 horas).

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

Materiales y métodos

Se capturaron Fcγ RI humano recombinante etiquetado con 6-His C-terminal (R&D Systems Núm. 1257-FC-050), Fcγ RIIA humano recombinante etiquetado con 10-His C-

terminal (R&D Systems Núm. 1330-CD-050/CF) y FcγRIII humano recombinante etiquetado con HPC4 C-terminal (V158 o F158) en un chip Biacore. Se inyectaron anticuerpos a 200, 100 y 50 nM durante 2 min, seguido de 2 min de disociación en tampón HBS-P+, CaCl2 2 mM pH 7,4 a una velocidad de flujo de 30 µL/min utilizando Biacore 200. Se mostró la curva de unión a 200 nM.

Se utilizó el ensayo ELISA que empleaba Receptor Fc Neonatal (FcRn) humano recombinante etiquetado con HPC4 C-terminal para medir las propiedades de unión de las proteínas de unión triespecíficas con diferentes modificaciones de Fc. Brevemente, se utilizó el Receptor Fc Neonatal (FcRn) humano recombinante para recubrir la placa de ELISA (Nunc 80040LE) (2 ug/ml en PBS) durante la noche. Se añadieron proteínas de unión triespecíficas diluidas seriadamente con diferentes modificaciones de Fc a cada pocillo y se incubaron a la temperatura ambiente durante una hora, seguido de lavado e incubación con anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con HRP.

Resultados

A continuación se sometieron a ensayo variantes de proteínas de unión triespecíficas descritas anteriormente para determinar su unión a diversos receptores Fc con el fin de optimizar la farmacocinética (PK)/farmacodinámica (PD).

Las variantes de Fc humanas se caracterizaron por la unión a FcγR I (**FIG. 15A**), FcγR IIa (**FIG. 15B**), y FcγR IIIb/c (**FIG. 15C**) como se describió anteriormente. Las variantes sometidas a ensayo fueron IgG1 humana, IgG4 humana, e IgG4 humana con mutaciones FALA (F234A y L235A de acuerdo con el índice UE) con una proteína de unión triespecífica de control.

Como se muestra en las **FIG. 15A-15C**, IgG1 e IgG4 de tipo salvaje fueron capaces de unirse a FcγR I y FcγR IIa, pero no a FcγR IIIb/c, como se ha informado previamente. Las mutaciones FALA en IgG4 eliminaron la unión a FcγR I y FcγR IIa. Sin

desear estar limitado por la teoría, se piensa que la eliminación de la unión a FcγR I y FcγR IIa puede mejorar la PK/PD al eliminar la acumulación no deseada a través de las interacciones Fc/FcγR.

A continuación, se examinó la variante FALA de IgG4 para determinar la unión a FcRn. La variante, así como la IgG4 de tipo salvaje, se unieron a FcRn (**FIG. 16**). Estos resultados demuestran que las mutaciones FALA en IgG4 no afectan a las interacciones entre Fc de IgG4 y FcRn, implicando un impacto mínimo sobre la semivida de la proteína de unión.

Los parámetros PK de IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, IgG1 LALA P329A LALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, e IgG4 FALA $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, determinados en ratones NSG, se resumen en la **FIG. 17**. Las modificaciones de Fc de IgG4 mostraron una semivida y una AUC significativamente mejoradas en ratones NSG al eliminar la unión a FcγRI específica de NSG, que es abundante en macrófagos.

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

Materiales y métodos

Liberación de citocinas a partir de PBMC humanas

Las PMBC humanas se incubaron con 100 pM de proteínas de unión durante 24 hrs. Los sobrenadantes se recogieron y se midieron las citocinas por medio de Luminex utilizando placas Drop Array (por triplicado). Para los experimentos que utilizaban células diana tumorales, las PMBC humanas se incubaron con 100 pM de anticuerpos y con, o sin, células diana RPMI-8226 a una razón E:T 10:1 durante 24 hrs. Los sobrenadantes se recogieron después de que las PBMC se incubaran con proteínas triespecíficas y se

sometieron a ensayo para determinar las citocinas con el kit MILLIPLEX® MAP y se analizaron en un MAGPIX® System.

Ensayo Bcl-xL

Se incubaron células T clasificadas negativamente a partir de PBMC (magnéticamente) con Ab unidos a placas 100 nM durante 1 día. A continuación las células T se lavaron y se tiñeron con anticuerpos conjugados fluorescentemente específicos para marcadores de células T y Bcl-xL y se analizaron en un citómetro de flujo.

Proliferación de células T

Se incubaron células T clasificadas negativamente a partir de PBMC (separación de células en esferas magnéticas) con Ab unidos a placas (100 nM) durante 1 a 6 días. Las células totales se contaron mediante citometría de flujo utilizando esferas de recuento en días específicos después del inicio de la incubación. La multiplicidad de cambio se calculó a partir de los recuentos de células el Día 0 (500 células/uL). Resultados de 3 donantes de PBMC.

Expresión de IL-2

Se incubaron Células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ con proteínas triespecíficas durante 6 horas, a continuación se utilizó el sistema de ensayo de luciferasa Bio-Glo™ para detectar la expresión del gen informador de luciferasa.

Activación in vitro *de PBMC*

Se determinó la activación ($CD69^+$) de células PBMC humanas tratadas con anticuerpos triespecíficos anti-CD38xCD28xCD3 o proteína de unión IgG4 de control.

Eficacia in vivo *en modelo de tumor diseminado*

Para el modelo de ratón NSG de hu-PMBC diseminadas, se inyectaron 1-5 x106 células en cada ratón intravenosamente el día 0. El día 3, se tomaron las imágenes de luminancia en el momento inicial para la aleatorización. El día 4, se reconstituyeron 10x106 PBMC humanas de donantes sanos para cada ratón intraperitonealmente (IP). Los ratones se trataron semanalmente los días 5, 12, 19 utilizando las dosis indicadas. Se tomaron imágenes corporales de luminancia semanalmente el día 10, 17, 24 para controlar el volumen tumoral en cada animal. Al terminar el estudio, se recogieron sangre, bazo, hueso y médula ósea para su estudio histopatológico.

Resultados

Las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 que contenían mAb2 con la región Fc variante FALA de IgG4 causaron niveles marcadamente reducidos de liberación de IFN-γ no específico en PBMC humanas, en comparación con proteínas de unión similares con regiones Fc de tipo salvaje (**FIG. 18A**). Se observaron resultados similares con la liberación de IL-2 (**FIG. 18B**) y TNF-α (**FIG. 18C**). En gran medida, la liberación de citocina fue significativamente menor para estas proteínas de unión triespecíficas con variante de Fc que para el anticuerpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referencia. Estos resultados implican una mejora del perfil de seguridad de las proteínas de unión triespecíficas con variantes de Fc debido a una reducción en la liberación de citocina no específica.

Las variantes de Fc de IgG1 e IgG4 $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que contenía mAb2 y $CD38_{HH71370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que contenía mAb6 también condujeron a la activación *in vitro* de las PBMC humanas (**FIG. 18D**).

La co-estimulación inmunitaria mediante ligación de CD28 es necesaria para la supervivencia y proliferación de células T; la señalización de TCR sola no da como resultado la proliferación de células T (Sharmee y Allison (2015) *Science* 348:56-61). La

proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ condujo a la inducción de Bcl-xL en células T tanto CD4+ como CD8+, mientras la eliminación de los dominios de unión a antígeno CD28 o CD3 eliminó este efecto (**FIG. 19A y 19B**). Estos resultados demuestran, como se esperaba, que son necesarios los brazos de unión tanto CD3 como CD28 para la inducción Bcl-xL en células T por las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38, suministrando de ese modo una señal pro-supervivencia a las células T. El brazo anti-CD28 de la proteína de unión triespecífica es crítico para la regulación positiva de Bcl-xL pro-supervivencia en las células T. Cuando se comparó con un anticuerpo anti-CD38xanti-CD3 de referencia, la proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}$xCD28xCD3 condujo a una mayor regulación positiva de Bcl-xL en células T CD4+ y CD8+ (**FIG. 19C y 19D**).

Para determinar el impulsor primario de la activación de las células T por las proteínas de unión triespecíficas $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$, se utilizó la expresión de IL-2 en una línea Jurkat informadora de células T Jurkat que contenía el promotor de IL2 humana que impulsaba el informador de luciferasa para medir la activación. La mutación por inactivación de un gen del dominio de unión anti-CD3 condujo a la eliminación de la activación de células T, demostrando que la activación de células T es un efecto específico de la ligación a CD3 (**FIG. 19E**). Estos resultados muestran que anti-CD3 es el impulsor primario de la activación de células T por proteínas de unión triespecíficas, y que anti-CD28 también contribuye significativamente a la señal de activación de células T. También se examinó el impulsor primario de la liberación de citocinas utilizando PBMC humana (**FIG. 19F**). Examinando la liberación de TNF, IFNg, IL-2, IL-6, y IL-10, se encontró que CD3 es el determinante primario de la liberación de citocina. Se encontró que CD28 tenía una mínima contribución. También se encontró que las proteínas de

unión triespecíficas con anti-$CD38_{VH1}$ inducían menos liberación de citocinas que el comparador de referencia.

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

A continuación se utilizó el modelo de ratón NSG humanizado para los experimentos de crecimiento de tumores sólidos *in vivo*. A los ratones se les implantaron en la semana 6-8 células de mieloma humano RPMI8226. En la semana 9, se introdujeron PBMC humanas por medio de inyección ip, las hPBMC se reconstituyeron, y se administró terapia anti-tumoral en las semanas 10-13. A 56 ratones hembra NSG humanizados con PBMC se les implantaron 5 millones de células RPMI8226 en matrigel al 50%, y los ratones se seleccionaron y se aleatorizaron en el estudio el día 5 o 6 después de la implantación. Este modelo sirve como modelo de tumor *in vivo* en ratones con células T maduras humanas.

Asimismo se sometieron a ensayo las proteínas de unión triespecíficas en un modelo de ratón NSG de crecimiento de tumor diseminado, utilizando células de mieloma humano NCI-H929-Luc y sometiendo a ensayo el crecimiento tumoral por medio de luminiscencia. La proteína de unión triespecífica $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ con la variante de Fc FALA de IgG4 mostró una eficacia anti-tumoral dependiente de la dosis, estadísticamente significativa en este modelo de tumor diseminado a 30 µg/kg (**FIG. 21**). La proteína de unión triespecífica $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ con la variante de Fc FALA de IgG4 también mostró una eficacia anti-tumoral dependiente de la dosis,

estadísticamente significativa en este modelo de tumor diseminado a 30 µg/kg y 10µg/kg (**FIG. 22**).

Las proteínas de unión triespecíficas IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que contenía mAb2 e IgG4 FALA $CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ que contenía mAb6 mostraron potentes actividades de destrucción tumoral *in vitro* contra células de mieloma NCI-H929-Luc utilizando PBMC humanas de dos ratones NSG humanizados donantes (**FIG. 23A y 23B**). La proteína de unión triespecífica IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ mostró una actividad contra el tumor *in vivo* superior, en comparación con un anticuerpo biespecífico de referencia, en el modelo de tumor diseminado (**FIG. 23C**). Los valores P de la comparación con el control de vehículo (PBS) se determinaron como sigue: IgG4 FALA $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$: p=0,0023; IgG4 FALA $CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$: p=0,0088; Fab-scFv-Fc CD38xCD3 biespecífico de referencia: p=0,6045.

Tomados juntos, estos resultados demuestran un candidato anti-CD38 mejorado con una región Fc variante que muestra una mayor semi-vida, una liberación de citocinas no específica reducida, y mayor eficacia anti-tumoral *in vivo*.

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

Se requieren dos señales para estimular las células T hacia una función efectora óptima y una proliferación sostenida. La activación mediada por el complejo receptor de células T (TCR)-CD3 induce la activación transcripcional que conduce a la secreción de citocinas. El compromiso de una segunda proteína de membrana superficial, CD28, estimula una vía alternativa de transducción de señales e inhibe la muerte celular programada (Esensten JH, Helou YA, et al. Immunity 44: 973-88 (2016); Hui E, Cheung J, et al. Science 355: 1428-1433 (2017)). En ausencia de una segunda señal, la estimulación de células T a través de CD3 solo conduce típicamente a la muerte celular inducida por

activación (Chai JG, Lechler RI. Int Immunol. 9: 935-44 (1997)). Se planteó la hipótesis de que la proliferación de células T podría aumentarse combinando especificidades contra estas dos dianas diferentes.

La **FIG. 24A** muestra un ensayo informador de luciferasa que se llevó a cabo utilizando Células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ (Promega) después de la estimulación por $CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$ y sus mutantes KO de sitio de unión único o KO triples a una concentración 10 nM. Estos datos ilustran la contribución de CD28 a la estimulación de células T (p.ej., señalización NFAT).

Usando el formato de Ab biespecífico cruzado de doble variable (CODV) (Steinmetz A, et al. MAbs 8: 867-878 (2016)), se evaluaron combinaciones de Fv de α-CD3ε (señal 1) y α-CD28 (señal 2) para determinar si el doble compromiso de estas moléculas de la superficie celular podría estimular y mantener la activación de las células T (Figura 24B). Se usó un Ab anti-CD3 Fvε de afinidad media (KD ~ 20 nM) para evitar la estimulación del receptor de células T de alta afinidad que causa una liberación de citoquinas de alto nivel y aumenta el riesgo del síndrome de liberación de citocinas. Este agonista de CD3 se probó en ambas posiciones del brazo dual en combinación con un Ab CD28 superagonista que se había demostrado con anterioridad que soportaba la proliferación de células T (Waibler Z, Sender LY, et al. *PLoS One* 3:e1708(2008)). Estos anticuerpos biespecíficos monovalentes se incubaron con PBMC humanos in vitro, y se midió la estimulación de las células T mediante la secreción de interferón-γ e IL-2. Si bien ambas orientaciones eran activas, se observó la liberación óptima de estas citocinas con CD3 en la posición proximal y CD28 en la posición distal (**FIG. 24B**). Este brazo dual se seleccionó para emparejarse con un anticuerpo anti-CD38 en el formato Ab triespecífico (Xu L, Pegu A, et al. *Science* **358**:85–90 (2017)).

La **FIG. 25** muestra que la regulación positiva del miembro de la familia Bcl-2 Bcl-xL en células T primarias inducidas por $CD38_{V_{H1}}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$ es dependiente de CD28. Estos datos ilustran la contribución de CD28 a la supervivencia de las células T.

La **FIG. 26** muestra que anti-CD28 en el Ab triespecífico proporcionaba una señalización secundaria esencial para soportar la proliferación de células T primarias in vitro. Estos datos ilustran la contribución de CD28 a la proliferación de células T.

Tomados juntos, estos datos muestran que anti-$CD28_{sup}$ en el anticuerpo triespecífico $CD38_{V_{H1}}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$ proporciona funcionalidades significativas en la activación de células T, la supervivencia y la proliferación in vitro.

La **FIG. 27** muestra la configuración del anticuerpo triespecífico, codificado por un anticuerpo parental. También se muestra un modelo de estructura del Ab triespecífico $CD38V_{H1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}$ obtenido basándose en estructuras cristalinas de Fab V_{H1} anti-CD38 y Fab CODV $CD28_{sup}/CD3_{mid}$ (derecha).

Las **FIG. 28A y 28B** muestran que las células de mieloma múltiple (MM) con una expresión en la superficie de CD38 elevada (RPMI-8226; **FIG. 28A**) y baja (KMS-11; **FIG. 28B**) fueron lisadas de manera eficaz por las PBMC humanas (E:T=10:1) incubadas con diversas concentraciones del Ab triespecífico. La contribución a la actividad de destrucción por cada sitio de unión se demostró por las mutaciones KO del sitio de unión. Estos datos demuestran que el anticuerpo triespecífico de CD38 lisaba las células MM humanas a través del reconocimiento tanto de CD38 como de CD28. CD28 expresado en células de Mieloma Múltiple proporcionó una diana secundaria por el anticuerpo triespecífico $CD38_{V_{H1}}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid_}$FALA, potenciando significativamente su actividad de destrucción.

Las **FIG. 29A-29C** muestra que el mutante anti-$CD28_{sup}KO$ del Ab triespecífico mostraba una actividad anti-tumoral marcadamente reducida contra células MM $CD38_{high}$, $CD38_{mid}$ y $CD38_{low}$ in vitro. Se muestran ensayos que utilizan células RPMI-8226 (**FIG. 29A**), U266 (**FIG. 29B**), o KMS-11 (**FIG. 29C**). La expresión de CD28 en células MM aumentó sus susceptibilidad a la citolisis mediada por el anticuerpo triespecífico para CD38.

La **FIG. 30** muestra los resultados de un estudio de eficacia in vivo en un modelo de línea celular de mieloma múltiple humano diseminado utilizando un ratón NSG reconstituido con células T primarias humanas amplificadas in vitro. La reducción de la carga tumoral en los grupos de tratamiento con anticuerpo triespecífico $CD38V_{H1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$_FALA fue dependiente de la dosis y estadísticamente diferente. De este modo, el anticuerpo triespecífico para CD38 confirió protección contra el crecimiento tumoral de células MM humanas diseminadas in vivo.

Un estudio microscópico demostró adicionalmente la destrucción de células cancerosas por células T humanas primarias mediada por el anticuerpo triespecífico in vitro. Las **FIG. 31A** y **31B** muestran imágenes microscópicas que demuestran que RPMI-8226 (células de MM humanas, marcadas con colorante CellTracker Deep Red) eran lisadas por PBMC humanas mediadas por el anticuerpo triespecífico $CD38_{V_{H1}}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$_FALA. La **FIG. 31A** muestra el control, mientras la **FIG. 31B** muestra la lisis mediada por el anticuerpo triespecífico $CD38_{V_{H1}}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$_FALA. Se utilizó una razón E:T 10:1 con 24 horas de incubación. La exposición al Ab control mutante triple nulo indujo cambios mínimos en la viabilidad de las células tumorales durante 24 horas (**FIG. 31A**). Por el contrario, la incubación con el Ab triespecífico CD38 activo CD38 indujo una agrupación sustancial de células T alrededor de las células tumorales, lo que condujo

a su lisis casi completa (**FIG. 31B**). Estos datos demuestran que el anticuerpo triespecífico CD38/CD3xCD28 mediaba la citólisis de células de mieloma por células T.

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

La región Fc de los anticuerpos se une a los receptores celulares en los monocitos y las células NK que inducen inflamación inespecífica, lo que podría predisponer a los sujetos de tratamiento al síndrome de liberación de citocinas. El papel de los receptores Fc en la estimulación de la liberación de citocinas se examinó mediante pruebas de mutantes que eliminaron la unión de FcγI, FcγIIa,b y FcγIII. Para este propósito, se utilizó un isotipo IgG4 que no fija el complemento.

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

Una mutación (“FALA”) en la región Fc que ha sido descrita previamente (Alegre ML, Peterson LJ, et al. *Transplantation* **57**:1537-43(1994); *véanse también* Ejemplos 7-9) eliminó la unión a todos los receptores Fc (**FIGS. 32 & 33**). Cuando se usó para detectar la liberación inespecífica de citoquinas, abrogó la liberación de IFN-γ en las PBMC no estimuladas mientras que permitía una estimulación máxima en presencia de dianas tumorales que expresaban CD38 (**FIG. 34**, izquierda vs. derecha, FALA). Este mutante de Fc retenía su actividad citolítica sobre dianas de tumor de mieloma de modo comparable al control de tipo natural de Fc en células que expresan niveles diferentes de CD38 (**FIG. 35**). De manera similar, otra región de Fc de IgG4 mutada (“PVA,” *véase* **FIG.**

32) que eliminó la unión a receptores Fc (**FIG. 33**) también abrogó la liberación de IFN-γ en PBMC no estimuladas mientras que permitía una estimulación máxima en presencia de dianas tumorales que expresaban CD38 (**FIG. 34**, izquierda vs. derecha, PVA) y retenía su actividad citolítica sobre dianas de tumor de mieloma de modo comparable al control de tipo natural de Fc en células que expresan niveles diferentes de CD38 (**FIG. 35**).

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

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

Como se ha indicado anteriormente en relación con las **FIGS. 28A & 28B**, la mutación de la unión específica de CD3 abrogaba la citolisis, mientras que las mutaciones anti-CD38 y CD28 nulas mostraron muerte marcadamente reducida, pero se retenía alguna función residual, lo que indicaba que ambas anti-CD38 y CD28 contribuían a la muerte de las células tumorales.

Comparado con el daratumumab (el anticuerpo monoclonal α-CD38 autorizado para el tratamiento del mieloma múltiple; *see* McKeage K. *Drugs.* **76**:275-81(2016)), el Ab triespecífico mostró una notable potencia mortal 3-4 unidades logarítmicas mayor *in vitro* contra diferentes líneas celulares que expresan CD38, incluidas ambos tipos $CD38_{high}$ y $CD38_{low}$ de células de mieloma múltiple (**FIG. 36**).

Ejemplo 12: Ab CD38/CD3xCD28 estimula las respuestas de memoria central CD4 y CD8, Th1 y frente a antígenos específicos

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

Materiales y Métodos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de sangre de donantes humanos sanos recogida por Research Blood Components, LLC (Boston, MA). Las PBMC se añadieron a placas recubiertas con anticuerpos (350 ng/pocillo) (5 x 10^5 células/mL), como se ha descrito más arriba, y se incubaron a 37°C durante 3 y 7 días. Las células se recolectaron en puntos de tiempo específicos y se analizaron por citometría de flujo para detectar los subconjuntos de células T: vírgenes (CCR7+ CD45RO-), Tcm (CCR7+ CD45RO+), Tem (CCR7- CD45RO+), Tregs (CD4+ Foxp3+ CD25hi). Las células también se trataron con monensina (GolgiStop) (BD Biosciences, CA) durante al menos 6 horas antes de la tinción del flujo para determinar la expresión de citoquina intracelular: Th1 (CD4+ IFN-γ+), Th2 (CD4+ IL-4+), y Th17 (CD4+ IL-17+). Se detectaron células T CD8+ específicas para pp65 de CMV usando pentámero conjugado fluorescente restringido al HLA de donantes de PBMC (A*02:01/NLVPMVATV) (ProImmune, Oxford, UK). Se obtuvieron PBMC a partir de HemaCare (Van Nuys, CA) a partir de donantes con poblaciones positivas conocidas de CMV y tipos de HLA. Las PMBC de donantes negativos para el tipo de HLA restrictivo se usaron como control negativo. La tinción se hizo siguiendo el protocolo del fabricante.

Resultados

Las PBMCs humanas se incubaron durante 7 días con el Ab triespecífico o un control negativo mutante triple en ausencia de citoquinas. El análisis de los subconjuntos CD4 reveló la mayor proliferación en el conjunto de células de memoria central, con un pequeño incremento en células de memoria efectora (**FIG. 37A**). El análisis del subconjunto CD4 también reveló la mayor proliferación de células Th1 (>6 veces) en

comparación con las células Th2 o Th17 (**FIG. 37B**). En el subconjunto CD8, hubo un incremento >150 veces en el subconjunto CD8 de memoria central en el día 7, con un incremento menor en células de memoria efectora (**FIG. 37C**). Es importante destacar que las respuestas de CD8 específicas de antígeno preexistentes al CMV, dirigidas al epítopo pp65 en donantes de HLA-A2 seropositivos usando tinción de tetrámero (Gratama JW, van Esser JW, et al. *Blood* **98**:1358-1364(2001)), amentaron en >44 veces en presencia de Ab triespecífico CD38 en comparación con el control negativo (**FIG. 37D**).

En conjunto, estos datos indican que el Ab triespecífico CD38 estimula la función de Th1 y las respuestas protectoras de las células T de memoria CD8 que probablemente que probablemente mejores la inmunidad anti-tumoral *in vivo*.

Ejemplo 13: CD28 en células de mieloma múltiple aumenta el reconocimiento por parte de las células T y la citólisis

Materiales y Métodos

Citometría de flujo

Los niveles de CD28 y CD38 en las líneas celulares tumorales indicadas se determinaron por citometría de flujo usando el kit QIFI (Dako, Denmark, cat. # K007811) como está descrito (S4). Brevemente, se usaron anticuerpos de ratón CD38 antihumanos (clon AT13/5, IgG1 de ratón, Santa Cruz Biotech, cat # 59028) y CD28 antihumanos (clon CD28.2, IgG1 de ratón, k, BioLegend, cat # 3029123) como anticuerpos primarios (a 10 ug/ml) para detectar CD38 y CD28 de superficie en líneas celulares usando el protocolo del fabricante. Las densidades superficiales se calcularon utilizando los estándares de calibración del kit QIFI y la formulación proporcionada por el kit.

Generación de líneas celulares de mieloma múltiple CD28 KO humano usando desactivación mediada por CRISPR

Para la línea celular KMS-11, la desactivación de CD28 se realizó usando el kit de desactivación de CRISPR CD28 humano (Origene). El kit contiene un vector donante con un casete funcional de GFP-puromicina y dos vectores Cas-9 característicos cada uno con un ARN guía prediseñado diferente (gRNA 1: TACCTGTTACTTGAATTGAA (SEQ ID NO:117) y gRNA 2: ATTTTTTGAGGTCTTCCAAT (SEQ ID NO:118) que dirigen al Exón 1 y al Intrón 1 de CD28, respectivamente). Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 3.10^5 células/pocillo en RPMI 1640 GlutaMAX Medium enriquecido con 10% FBS y se cotransfectaron después de 24 horas con los tres vectores usando Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió puromicina 48 horas después de la transfección a una concentración final de 0,5 µg/mL. La eficiencia de la transfección fue del 30% cuando se usaron 6,25 µL/pocillo de Lipofectamine™ 3000, 1,25 µg de cada vector Cas-9/gRNA y 2,5 µg del vector donante de GFP-puromicina. La desactivación de CD28 sobre la línea de células RPMI 8226 se llevó a cabo usando el conjunto de Lentivirus todo en uno CD28 sgRNA CRISPR (Applied Biological Materials Inc.). Consiste en un conjunto de 3 vectores todo en uno lentivirales que expresan el gen Cas9, un gen de resistencia a puromicina y un sgRNA diferente (sgRNA 1: ATTGTCGTACGCTACAAGCA (SEQ ID NO:119) que se dirige al exón 2 de CD28 y sgRNA 2: CAAAAGGGCTTAGAAGGTCC (SEQ ID NO:120) y sgRNA 3: CTATAGCTTGCTAGTAACAG (SEQ ID NO:121) que se dirige al exón 3 de CD28). Las células se infectaron utilizando un protocolo de espinoculación con 2.10^5 células mezcladas con partículas lentivirales (10UI/célula), 8 µg/mL de polbreno y mejorador de transducción 1:100 ViralPlus Transduction Enhancer (Applied Biological Materials Inc.). La mezcla se preincubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó durante 30 minutos a 32°C y 800×g y se sembró en una placa de 12 pocillos. Se añadió

puromicina 48 horas después de la infección a una concentración final de 0,25 µg/mL. Ambas líneas de células se sometieron a al menos 5 pases (o hasta que se estabilizó la viabilidad celular) antes de confirmar la disminución de CD28 al nivel de proteína por citometría de flujo (CD28 PE Clone 28.2 antibody - BioLegend). Las células negativas en CD28 después se clasificaron en un clasificador de células Sony SH800S Cell Sorter y se cultivaron en un medio enriquecido con 0,25 µg/mL o 0,5 µg/mL de puromicina, 100 Unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (ThermoFisher Scientific). Después se clonaron las células por dilución limitante y la desactivación de CD28 se validó por citometría de flujo y por PCR y secuenciación de Sanger usando los cebadores directo e inverso que se mencionan a continuación.

Tabla R. Lista cebadores directos e inversos.

Línea celular	Amplicón	Cebadores	Tamaño del amplicón	Comentarios
KMS-11	CD28_GFP_izquierda	F: CACAACCTGTCCCCATCCTATGAA (SEQ ID NO:122) R: AAGCTGCCATCCAGATCGTTATCG (SEQ ID NO:123)	1475 bp	Valida la inserción del casete de GFP-puromicina (lado izquierdo)
	CD28_PURO_derecha	F: CCAAATTAAGGGCCAGCTCATTCC (SEQ ID NO:124) R: ACCTGTACATCCTTGGGCAAATCC (SEQ ID NO:125)	1233 bp	Valida la inserción del casete de GFP-puromicina (lado derecho)
	CD28_Exon_1	F: GTCAGGATGCCTTGTGGTTTGAGT (SEQ ID NO:126) R: CAGAGCTTCCAGAGCCAATCTAC (SEQ ID NO:127)	Variable; WT=720	Región que rodea la unión exón1-intrón1 de CD28 correspondiente al sitio de inserción del casete de GFP-puromicina y/o inserciones/deleciones después de la escisión CRISPR
RPMI 8226	Exon_2	F: CCATGTACTGCCTTCTGGGTGAAA (SEQ ID NO:128)	Variable; WT=682 bp	Región que rodea el exón 2 de CD28 correspondiente a

	R: CCACTGACCACAACCCAGTTTT (SEQ ID NO:129)		sitios de escisión CRISPR
Exon_3	F: AGGCCATTGGAAGTCACCGTTT (SEQ ID NO:130) R: GCCAACATTGTCCATTGGCTTCAG (SEQ ID NO:131)	Variable; WT=816 bp	Región que rodea el exón 3 de CD28 correspondiente a sitios de escisión CRISPR

Resultados

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

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

Línea celular	**CD28**	**CD38**
JJN3	1.040	50
KMS-11 (p17)	35.345	2.845
U266	170.525	13.825
L-363	9.145	17.500
MM.1S	56.560	44.535
MM.1R	66.220	49.160
KMS-12BM	0	62.845
RPMI 8226	83.915	136.255
NCI-H929	22.065	153.620
LP-1	7.420	372.835
U266-CD38++	126.465	633.805
JJN3-CD38	0	714.805

MOLP-8	245	885.030
NCI-H929-CD38++	22.935	981.310
RPMI 8226-CD38++	86.320	1.419.120

Se ha dado a conocer que la expresión de CD28, a pesar de estar ausente en células plasmáticas normales (Almeida J, et al. *British J. of Haematol.* **107**:121-131(1999)), puede ser detectada en células plasmáticas de mieloma primario de aproximadamente la tercera parte de los nuevos pacientes diagnosticados (Mateo G, et al. *Clin. Cancer Res.* **11**:3661–3667(2005)). Más aún, su frecuencia aumenta durante el progreso del mieloma y guarda relación con un mal pronóstico y unas características agresivas del mieloma (Robillard N, Jego G, et al. *Clin Cancer Res.* **4**:1521-6(1998); Nair JR, Carlson LM, et al. *J Immunol.* **187**:1243-53(2011)).

Para determinar si la expresión de CD28 sobre las células diana podría mejorar el reconocimiento por parte de las células T y la lisis, se comparó la actividad de Abs triespecíficos de tipo natural vs. deficientes en CD28 sobre tres líneas de mieloma independientes con grados variables de expresión de CD38 and CD28. Como se ha indicado antes en el Ejemplo 9 y en las **FIGS. 29A-29C**, se obervó citolisis en las tres líneas, independientemente del nivel de expresión de CD28 por el anticuerpo triespecífico CD38; sin embargo, frente a todas las líneas celulares, la actividad citolítica del Ab triespecífico deficiente en CD28 disminuyó en más de 30-100 veces, observándose la máxima disminución sustancial en la línea celular KMS-11 que mostró la menor expresión de CD38 (cf. WT vs. ΔCD28, **FIG. 29C** vs. **FIG. 29A** or **FIG. 29B**).

La contribución de CD28 al reconocimiento de células tumorales y la lisis se confirmó además usando desactivación mediada por CRISPR de CD28 sobre la célula diana de mieloma. La expresión de CD28 fue indetectable en células KMS-11 CD28KO

comparando con la línea parental (**FIG. 38**, panel superior, derecho vs. izquierdo). La sensibilidad de las células KMS-11 CD28KO a la citolisis por parte de las células T se redujo concomitantemente 10-100 veces (**FIG. 38**, panel inferior, izquierdo). En consonancia con este efecto, no se observaron diferencias en la citólisis con el anticuerpo triespecífico CD38 en comparación con el anticuerpo mutante deficiente en CD28 triespecífico sobre las células mutantes CD38 KO (**FIG. 38**, panel inferior, derecho).

Ejemplo 14: Citolisis del Ab triespecífico CD38 frente a líneas de células de cáncer hematológico CD38$^+$

Los ejemplos anteriores demuestran que los anticuerpos anti-CD38/CD3/CD28 triespecíficos promueven la citólisis de células de mieloma múltiple. Se probó la capacidad de estos anticuerpos para promover la citólisis de otras líneas celulares de cáncer.

Como se indica en la **FIG. 39**, un Ab mutante FALA triespecífico CD38/CD28xCD3 tuvo una actividad citolítica dirigida a líneas CD38$^+$CD28$^-$, incluidas leucemia mielocítica aguda (AML (KG-1)), un linfoma de células B (OCI-Ly19), leucemia linfocítica T aguda (ALL (KOPN8)), y linfoma linfocítico crónico (CLL(Z-138)). Esto demuestra que los anticuerpos triespecíficos anti-CD38/CD3/CD28 tienen actividad contra otras líneas celulares de cáncer hematológico CD38+, incluidas las que son CD28-.

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

Se llevó a cabo la activación *in vitro* de PBMC humanas por TGN1412 (TGN), un solo brazo de unión TGN1412(TGNslg) y un solo brazo de unión anti-CD28$_{sup}$(CD28$_{sup}$slg) como está descrito (Findlay L, Eastwood D, et al*. J Immunol Methods* 352:1-12 (2010)). Se sembraron 10^5 PBMCs humanas sobre placas de 96 pocillos de polipropileno revestidas en seco con los anticuerpos indicados (1 ug/pocillo) durante 24 horas como se

ha descrito previamente. Se midieron citoquinas tales como IFN-γ, TNF-α, e IL2 en el sobrenadante por Luminex como se describe en el Ejemplo 8.

La inclusión de una sola especificidad del superagonista de CD28 también redujo la liberación inespecífica de citoquinas observada con el mAb superagonista de CD28 (FIG. 40) previamente asociada con sus efectos adversos como IgG nativa en seres humanos (Suntharalingam G, Perry MR, et al. N Engl J Med 355:1018-1028(2006)). En cambio, la co-estimulación por el Ab triespecífico incrementó la potencia y la superviviencia de las células T que lisan y progen contra tumores. Más interesante aún, el anticuerpo triespecífico CD38 amplifica de forma preferente las poblaciones de células Th1 y Tcm *in vitro*, exhibiendo una importante característica que difiere de los Abs monoclonales agonistas de α-CD3 o superagonistas de α-CD28 usados para propagar Treg para inducir tolerancia (Penaranda C1, Tang Q, Bluestone JA. J Immunol. 187:2015-22.(2011); Tabares P, Berr S, et al. Eur J Immunol. 44:1225-36(2014)).

Tomados conjuntamente, los datos presentados en los Ejemplos 1-15 muestran anticuerpos triespecíficos anti-CD38/CD3/CD28 que estimulan una potente inmunidad anti-tumoral mediante la participación de dos receptores de señalización de células T y la mejora del reconocimiento de las célula diana. La unión a CD3 y CD28 desencadenó la señalización del receptor de células T que regulaba positivamente Bcl-xl e inhibía la apoptosis de células T, aumentando la función efectora de células T y la supervivencia. El tercer brazo del Ab triespecífico interactuó con CD38, que se expresa altamente en células de mieloma múltiple. Casualmente, CD28 también se expresa en las células de la mayoría de los mielomas; por lo tanto, el Ab triespecífico mejoró el direccionamiento al mismo tiempo que mejoró la activación de las células T y la citólisis. El anticuerpo triespecífico optimizado lisó las células de mieloma >1000 veces más eficazmente que el

daratumumab, un agente terapéutico de mAb anti-CD38, y mostró una potente actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de ratón humanizado.

Si bien la descripción incluye diversas modalidades, se entiende que a los expertos en la técnica se les ocurrirán variaciones y modificaciones. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas estas variaciones equivalentes que entran dentro del alcance de la descripción. Además, los encabezamientos de secciones utilizados en la presente memoria tiene fines meramente organizativos y no se deben considerar limitantes de la materia descrita.

Cada modalidad descrita en la presente memoria se puede combinar con cualquier otra modalidad o modalidades a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier rasgo o modalidad indicado como preferido o ventajoso se puede combinar con cualquier otro rasgo o rasgos o modalidad o modalidades indicados como preferidos o ventajosos, a menos que se indique claramente lo contrario.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD38 Y MÉTODOS DE USO

<130> 183952029940

<140> Sin asignar aún

<141> Simultáneamente con la presente

<150> US 62/570,655

<151> 2017-10-10

<150> US 62/570,660

<151> 2017-10-11

<150> US 62/676,221

<151> 2018-05-24

<150> EP 18187186.4

<151> 2018-08-03

<160> 110

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> dominio extracelular de CD38 (isoforma A)

<400> 1

Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro

1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu

20 25 30

Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala

35 40 45

Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro

50 55 60

Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu

65 70 75 80

Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg

85 90 95

Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp

100 105 110

Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser

115 120 125

Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe

130 135 140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val

145 150 155 160

His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser

165 170 175

Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln

180 185 190

Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp

195 200 205

Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys
210 215 220

Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe
225 230 235 240

Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
245 250 255

<210> 2

<211> 265

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> dominio extracelular de CD38 que contiene una cola his en el extremo C

<400> 2

Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
20 25 30

Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
35 40 45

Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
50 55 60

Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65 70 75 80

Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
85 90 95

Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
100 105 110

Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser
115 120 125

Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
130 135 140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val
145 150 155 160

His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser
165 170 175

Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln
180 185 190

Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp
195 200 205

Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys
210 215 220

Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe
225 230 235 240

Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
245 250 255

Ser Ala Ser His His His His His His
260 265

<210> 3

<211> 485

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> dominio extracelular de CD38 fusionado a
dominio de Fc humano en el extremo C

<400> 3

Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
20 25 30

Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
35 40 45

Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
50 55 60

Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65 70 75 80

Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
85 90 95

Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
100 105 110

Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser
115 120 125

Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe

130 135 140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val

145 150 155 160

His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser

165 170 175

Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln

180 185 190

Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp

195 200 205

Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys

210 215 220

Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe

225 230 235 240

Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile

245 250 255

Gly Ala Leu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

260 265 270

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

275 280 285

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

290 295 300

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

305 310 315 320

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

325 330 335

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
340 345 350
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
355 360 365
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
370 375 380
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
385 390 395 400
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
405 410 415
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
420 425 430
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
435 440 445
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
450 455 460
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
465 470 475 480
Ser Leu Ser Pro Gly
485

<210> 4
<211> 265
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> dominio extracelular de CD38 que contiene una cola his en el extremo C

<400> 4

Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro
1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu
20 25 30

Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
35 40 45

Phe Ile Ser Lys Tyr Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
50 55 60

Leu Val Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Thr Leu Leu
65 70 75 80

Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
85 90 95

Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Met Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
100 105 110

Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Phe Glu Ile Asn Tyr Gln Ser
115 120 125

Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
130 135 140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val
145 150 155 160

His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser

165 170 175

Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln

180 185 190

Ala Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp

195 200 205

Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys

210 215 220

Arg Asn Ile Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe

225 230 235 240

Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile

245 250 255

Ser Ala Ser His His His His His His

260 265

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VH del mAb1

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VL del mAb1

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 7

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de HC del mAb1

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
225 230 235 240
Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 8

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de LC del mAb1

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VH del mAb6

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VL del mAb6

<400> 10

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de HC del mAb6

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de LC del mAb6

<400> 12

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VH1 del mAb2

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de V_{L1} del mAb2

<400> 14

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Gln Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 15

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de HC1 del mAb2

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
225 230 235 240

Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 16

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de LC1 del mAb2

<400> 16

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Gln Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VH3 del mAb3

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de V_{L3} de los mAb3 y mAb4 y mAb5

<400> 18

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 19

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de HC3 del mAb3

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
225 230 235 240

Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de LC3 de los mAb3 y mAb4 y mAb5

<400> 20

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de VH5 del mAb4

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de HC5 del mAb4

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly

225 230 235 240

Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia amino de VH6 del mAb5

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia amino de HC6 del mAb5

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly

225 230 235 240

Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<400> 28

000

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<211> 256

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> dominio extracelular de CD38

<400> 30

Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro
1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu
20 25 30

Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
35 40 45

Phe Ile Ser Lys Tyr Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
50 55 60

Leu Val Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Thr Leu Leu
65 70 75 80

Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
85 90 95

Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Met Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
100 105 110

Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Phe Glu Ile Asn Tyr Gln Ser

115 120 125

Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe

130 135 140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val

145 150 155 160

His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser

165 170 175

Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln

180 185 190

Ala Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp

195 200 205

Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys

210 215 220

Arg Asn Ile Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe

225 230 235 240

Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile

245 250 255

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-H1

<400> 31

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Asn

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-H2

<400> 32

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb1/mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-H3

<400> 33

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr

1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-L1

<400> 34

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Gly Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-L2

<400> 35

Leu Ala Ser

1

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb1/mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-L3

<400> 36

Gln Gln Asn Lys Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2 CDR-H1

<400> 37

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala

1 5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2 CDR-H2

<400> 38

Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2 CDR-L1

<400> 39

Gln Ser Val Ser Ser Tyr Gly Gln Gly Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2 CDR-L2

<400> 40

Gly Ala Ser

1

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 CDR-H1

<400> 41

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 CDR-H2

<400> 42

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 CDR-H3

<400> 43

Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 CDR-L1

<400> 44

Gln Gly Ile Arg Asn Asp

1 5

<210> 45

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 CDR-L2

<400> 45

Ala Ala Ser

1

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 CDR-L3

<400> 46

Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro Thr

1 5

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb7 VH dominio

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb7 VL dominio

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD28sup VH dominio

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD28sup VL dominio

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD28cvn VH dominio

<400> 51

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD28cvn VL dominio

<400> 52

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr

20 25 30

Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asn Asp Val Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 53

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD3mid VH dominio

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-CD3mid VL dominio
<400> 54
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn

20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly

85 90 95

Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 56

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 57

Thr Lys Gly Pro Ser

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 58

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 59

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 60

<211> 570

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid IgG4(ojal) FALA Pesada 1

secuencia polipeptídica

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met His Trp Val Arg Gln

145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser

165 170 175

Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr

180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

195 200 205

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr

210 215 220

Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

225 230 235 240

Ser Ser Arg Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
245 250 255

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
260 265 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
275 280 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
290 295 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305 310 315 320

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
325 330 335

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
340 345 350

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
355 360 365

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
370 375 380

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
385 390 395 400

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
405 410 415

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
420 425 430

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

435 440 445

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

450 455 460

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu

465 470 475 480

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe

485 490 495

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

500 505 510

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

515 520 525

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

530 535 540

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

545 550 555 560

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

565 570

<210> 61

<211> 338

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid Ligera 1 secuencia polipeptídica

<400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
115 120 125

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala
130 135 140

Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
145 150 155 160

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly
165 170 175

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
180 185 190

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

195 200 205

Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

210 215 220

Ile Lys Thr Lys Gly Pro Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val

245 250 255

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

260 265 270

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr

275 280 285

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

290 295 300

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val

305 310 315 320

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly

325 330 335

Glu Cys

<210> 62

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 IgG4(botón) FALA Pesada 2 secuencia polipeptídica

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435 440 445

<210> 63

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 Ligera2 secuencia polipeptídica

<400> 63

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Gln Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 64

<211> 573

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid IgG1(ojal) LALA P329A Pesada 1

secuencia polipeptídica

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met His Trp Val Arg Gln

145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser

165 170 175

Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr
210 215 220

Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser Arg Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
245 250 255

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
260 265 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
275 280 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
290 295 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305 310 315 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
325 330 335

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
340 345 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

370 375 380

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

385 390 395 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

405 410 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

420 425 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

435 440 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

450 455 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

465 470 475 480

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val

485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

500 505 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

565 570

<210> 65

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 IgG1(botón) LALA P329A Pesada 2 secuencia polipeptídica

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 66

<211> 573

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid IgG1(ojal) NNSA Pesada 1

secuencia polipeptídica

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met His Trp Val Arg Gln
145 150 155 160
Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser
165 170 175
Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190
Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

195 200 205

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr

210 215 220

Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

225 230 235 240

Ser Ser Arg Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

245 250 255

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

260 265 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

275 280 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

290 295 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

305 310 315 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

325 330 335

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

340 345 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

355 360 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

370 375 380

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

385 390 395 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
405 410 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg Val Val Ser Val
420 425 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
435 440 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
450 455 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
465 470 475 480

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
500 505 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

<210> 67

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 IgG1(botón) NNSA Pesada 2 secuencia polipeptídica

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 68

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 IgG4(botón) FALA P329A Pesada 2

secuencia polipeptídica

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435 440

<210> 69

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 Ligera2 secuencia polipeptídica

<400> 69

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 70

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 IgG1(botón) LALA P329A Pesada 2
secuencia polipeptídica

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

5

<210> 71

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> CD38hhy1370 IgG1(botón) NNSA Pesada 2 secuencia polipeptídica

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

20 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

25 Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 72
<211> 1710
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG4(ojal) FALA Pesada 1 secuencia polinucleotídica

<400> 72

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgag gtcgtgaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctactaca tccactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatcggcagc atctaccccg gcaacgtgaa caccaactac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca ccagcatcag caccgcctac 240

atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcac ccggtcccac 300

tacggcctgg attggaactt cgacgtgtgg ggcaagggca ccaccgtgac agtgtctagc 360

agccaggtgc agctggtgga atctggcggc ggagtggtgc agcctggcag aagcctgaga 420

ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc accaaggcct ggatgcactg ggtgcgccag 480

gcccctggaa agcagctgga atgggtggcc cagatcaagg acaagagcaa cagctacgcc 540

acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac 600

accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgtcgg 660

ggcgtgtact atgccctgag ccccttcgat tactggggcc agggaaccct cgtgaccgtg 720

tctagtcgga ccgccagcac aaagggccca tcggtgttcc ctctggcccc ttgcagcaga 780

agcaccagcg aatctacagc cgccctgggc tgcctcgtga aggactactt tcccgagccc 840

gtgaccgtgt cctggaactc tggcgctctg acaagcggcg tgcacacctt tccagccgtg 900

ctccagagca gcggcctgta ctctctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagcagcctg 960

ggcaccaaga cctacacctg taacgtggac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

cgggtggaat ctaagtacgg ccctccctgc cctccttgcc cagcccctga agctgccggc 1080

ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 1140

cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tcccaggaag atcccgaggt gcagttcaat 1200

tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagttc 1260

aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 1320

aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag ggcctgccca gctccatcga gaaaaccatc 1380

agcaaggcca agggccagcc ccgcgagcct caagtgtgta ccctgccccc tagccaggaa 1440

gagatgacca agaaccaggt gtccctgagc tgtgccgtga aaggcttcta ccccagcgac 1500

attgccgtgg aatgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cacccccct 1560

gtgctggaca gcgacggctc attcttcctg gtgtccaagc tgaccgtgga caagagccgg 1620

tggcaggaag gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1680

acccagaagt ccctgtctct gtccctgggc 1710

<210> 73

<211> 1014

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid Ligera 1 secuencia polinucleotídica

<400> 73

gacatcgtga tgacccagac ccccctgagc ctgagcgtga cacctggaca gcctgccagc 60

atcagctgca agagcagcca gagcctggtg cacaacaacg ccaacaccta cctgagctgg 120

tatctgcaga agcccggcca gagcccccag tccctgatct acaaggtgtc caacagattc 180

agcggcgtgc ccgacagatt ctccggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc 240

agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactattgtg gccagggcac ccagtacccc 300

ttcacctttg gcagcggcac caaggtggaa atcaagggcc agcccaaggc cgcccccgac 360

atccagatga cccagagccc cagcagcctg tctgccagcg tgggcgacag agtgaccatc 420

acctgtcagg ccagccagaa catctacgtg tggctgaact ggtatcagca gaagcccggc 480

aaggccccca agctgctgat ctacaaggcc agcaacctgc acaccggcgt gcccagcaga 540

ttttctggca gcggctccgg caccgacttc accctgacaa tcagctccct gcagcccgag 600

gacattgcca cctactactg ccagcagggc cagacctacc cctacacctt tggccagggc 660

accaagctgg aaatcaagac caagggcccc agccgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 720

atcttcccac ctagcgacga gcagctgaag tccggcacag cctctgtcgt gtgcctgctg 780

aacaacttct acccccgcga ggccaaagtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 840

ggcaacagcc aggaaagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 900

agcaccctga cactgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg 960

acccaccagg gcctgtctag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgt 1014

<210> 74

<211> 1338

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 IgG4(botón) FALA Pesada 2 secuencia polinucleotídica

<400> 74

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacgcca tgcactgggt caaagaggcc 120

cctggccaga gactggaatg gatcggctac atctaccccg gccagggcgg caccaactac 180

aaccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgata caagcgccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaacaggc 300

ggcctgaggc gggcctactt tacctattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360

gctagcacaa agggcccatc ggtgttccct ctggcccctt gcagcagaag caccagcgaa 420

tctacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaactctg gcgctctgac aagcggcgtg cacacctttc cagccgtgct ccagagcagc 540

ggcctgtact ctctgagcag cgtcgtgaca gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600

tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 660

aagtacggcc ctccctgccc tccttgccca gcccctgaag ctgccggcgg accctccgtg 720

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 780

tgcgtggtgg tggatgtgtc ccaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 840

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa cagcacctac 900

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960

tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1020

ggccagcccc gcgagcctca agtgtatacc ctgccccctt gccaggaaga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgtggtg tctcgtgaaa ggcttctacc ccagcgacat tgccgtggaa 1140

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200

gacggctcat tcttcctgta ctccaagctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 1260

aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320

ctgtctctgt ccctgggc 1338

<210> 75

<211> 654

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 Ligera2 secuencia polinucleotídica

<400> 75

gacatcgtgc tgacacagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

atcagctgta gagccagcca gagcgtgtcc agctacggcc agggcttcat gcactggtat 120

cagcagaagc ccggccagcc ccccagactg ctgatctatg gcgccagcag cagagccaca 180

ggcatccccg ccagattttc tggctctggc agcggcaccg acttcaccct gacaatcagc 240

cccctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agaacaaaga ggacccctgg 300

accttcggcg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 360

atcttcccac ctagcgacga gcagctgaag tccggcacag cctctgtcgt gtgcctgctg 420

aacaacttct acccccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 480

ggcaacagcc aggaaagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540

agcaccctga ccctgtccaa ggccgattac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg 600

acccaccagg gcctgtctag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgc 654

<210> 76

<211> 1719

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid IgG1(ojal) LALA P329A Pesada 1

secuencia polinucleotídica

<400> 76

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgag gtcgtgaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctactaca tccactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatcggcagc atctaccccg gcaacgtgaa caccaactac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca ccagcatcag caccgcctac 240

atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcac ccggtcccac 300

tacggcctgg attggaactt cgacgtgtgg ggcaagggca ccaccgtgac agtgtctagc 360

agccaggtgc agctggtgga atctggcggc ggagtggtgc agcctggcag aagcctgaga 420

ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc accaaggcct ggatgcactg ggtgcgccag 480

gcccctggaa agcagctgga atgggtggcc cagatcaagg acaagagcaa cagctacgcc 540

acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac 600

accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgtcgg 660

ggcgtgtact atgccctgag ccccttcgat tactggggcc agggaaccct cgtgaccgtg 720

tctagtcgga ccgccagcac aaagggcccc agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 780

agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc tgcctcgtga aggactactt tcccgagccc 840

gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg accagcggcg tgcacacctt tccagctgtg 900

ctgcagtcca gcggcctgta cagcctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg 960

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

aaggtggaac ccaagagctg cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgcccccgaa 1080

gccgccggag gcccttccgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1140

agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1200

aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccaagagag 1260

gaacagtaca acagcaccta ccgggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1320

ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg ccctggccgc ccccatcgag 1380

aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc cgcgaacccc aggtgtgcac actgccccca 1440

agcagggacg agctgaccaa gaaccaggtg tccctgagct gtgccgtgaa aggcttctac 1500

ccctccgata tcgccgtgga atgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1560

acccccccctg tgctggacag cgacggctca ttcttcctgg tgtccaagct gacagtggac 1620

aagtcccggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac 1680

aaccactaca cccagaagtc cctgagcctg agccccggc 1719

<210> 77

<211> 1347

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 IgG1(botón) LALA P329A Pesada 2 secuencia polinucleotídica

<400> 77

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacgcca tgcactgggt caaagaggcc 120

cctggccaga gactggaatg gatcggctac atctaccccg gccagggcgg caccaactac 180

aaccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgata caagcgccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaacaggc 300

ggcctgaggc gggcctactt tacctattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360

gctagcacaa agggccccag cgtgttccct ctggccccta gcagcaagag cacatctggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaattctg gcgccctgac cagcggcgtg cacacctttc cagctgtgct gcagtccagc 540

ggcctgtaca gcctgagcag cgtcgtgaca gtgcccagca gctctctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 660

aagagctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccccgaagc cgccggaggc 720

ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 780

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc caagagagga acagtacaac 900

agcacctacc gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960

gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctggccgccc ccatcgagaa aaccatcagc 1020

aaggccaagg gccagccccg cgaaccccag gtgtacacac tgcccccatg cagggacgag 1080

ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtgaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140

gccgtggaat gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccctgtg 1200

ctggacagcg acggctcatt cttcctgtac tccaagctga cagtggacaa gtcccggtgg 1260

cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320

cagaagtccc tgagcctgag ccccggc 1347

<210> 78

<211> 1719

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD28supxCD3mid IgG1(ojal) NNSA Pesada 1 secuencia polinucleotídica

<400> 78

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgag gtcgtgaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctactaca tccactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatcggcagc atctaccccg gcaacgtgaa caccaactac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca ccagcatcag caccgcctac 240

atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcac ccggtcccac 300

tacggcctgg attggaactt cgacgtgtgg ggcaagggca ccaccgtgac agtgtctagc 360

agccaggtgc agctggtgga atctggcggc ggagtggtgc agcctggcag aagcctgaga 420

ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc accaaggcct ggatgcactg ggtgcgccag 480

gcccctggaa agcagctgga atgggtggcc cagatcaagg acaagagcaa cagctacgcc 540

acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac 600

accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgtcgg 660

ggcgtgtact atgccctgag ccccttcgat tactggggcc agggaaccct cgtgaccgtg 720

tctagtcgga ccgccagcac aaagggcccc agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 780

agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc tgcctcgtga aggactactt tcccgagccc 840

gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg accagcggcg tgcacacctt tccagctgtg 900

ctgcagtcca gcggcctgta cagcctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg 960

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

aaggtggaac ccaagagctg cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgcccccgaa 1080

ctgctgggag gcccttccgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1140

agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1200

aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccaagagag 1260

gaacagtaca acaatgcctc ccgggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1320

ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg ccctgcctgc ccccatcgag 1380

aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc cgcgaacccc aggtgtgcac actgccccca 1440

agcagggacg agctgaccaa gaaccaggtg tccctgagct gtgccgtgaa aggcttctac 1500

ccctccgata tcgccgtgga atgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1560

acccccccctg tgctggacag cgacggctca ttcttcctgg tgtccaagct gacagtggac 1620

aagtcccggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac 1680

aaccactaca cccagaagtc cctgagcctg agccccggc 1719

<210> 79

<211> 1347

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38VH1 IgG1(botón) NNSA Pesada 2 secuencia polinucleotídica

<400> 79

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacgcca tgcactgggt caaagaggcc 120

cctggccaga gactggaatg gatcggctac atctaccccg gccagggcgg caccaactac 180

aaccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgata caagcgccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaacaggc 300

ggcctgaggc gggcctactt tacctattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360

gctagcacaa agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tatgttgacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

aatgcctccc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga atcaagtcag cctgtggtgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac tcaaaactca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 80

<211> 1329

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 IgG4(botón) FALA P329A Pesada 2

secuencia polinucleotídica

<400> 80

caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ctggcaggtc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggaa tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gactggaatg ggtggccgtg atttggtacg acggcagcaa caagtactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcggcgaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaatgttc 300

agaggcgcct tcgactactg gggccagggc acactcgtga ccgtgtctag tgcgtcgacc 360

aagggcccat cggtgttccc tctggcccct tgcagcagaa gcaccagcga atctacagcc 420

gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgctctga caagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tccagagcag cggcctgtac 540

tctctgagca gcgtcgtgac agtgcccagc agcagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600

aacgtggacc acaagcccag caacaccaag gtggacaagc gggtggaatc taagtacggc 660

cctccctgcc ctccttgccc agcccctgaa gctgccggcg gaccctccgt gttcctgttc 720

cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg 780

gtggatgtgt cccaggaaga tcccgaggtg cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840

gtgcacaacg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca acagcaccta ccgggtggtg 900

tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg 960

tccaacaagg gcctgcccag ctccatcgag aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc 1020

cgcgagcctc aagtgtatac cctgcccccc tgccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080

tccctgtggt gtctcgtgaa aggcttctac cccagcgaca ttgccgtgga atgggagagc 1140

aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccctg tgctggacag cgacggctca 1200

ttcttcctgt actccaagct gaccgtggac aagagccggt ggcaggaagg caacgtgttc 1260

agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtctctg 1320

tccctgggc 1329

<210> 81

<211> 642

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 Ligera2 secuencia polinucleotídica

<400> 81

gccatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagccagcca gggcatccgg aacgacctgg gctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gctagctctc tgcagtccgg cgtgcccagc 180

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatctctgg cctgcagccc 240

gaggacagcg ccacctacta ctgtctgcaa gactacatct actaccccac cttcggccag 300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccacct 360

agcgacgagc agctgaagtc cggcacagcc tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgcgagg ccaaagtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gaaagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgaca 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtctagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gt 642

<210> 82

<211> 1338

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 IgG1(botón) LALA P329A Pesada 2

secuencia polinucleotídica

<400> 82

caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ctggcaggtc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggaa tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gactggaatg ggtggccgtg atttggtacg acggcagcaa caagtactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcggcgaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaatgttc 300

agaggcgcct tcgactactg gggccagggc acactcgtga ccgtgtctag tgcgtcgacc 360

aagggcccca gcgtgttccc tctggccccc agcagcaaga gcacatctgg cggaacagcc 420

gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaattct 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcagtccag cggcctgtac 540

agcctgagca gcgtcgtgac agtgcccagc agctctctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggaacc caagagctgc 660

gacaagaccc acacctgtcc cccttgtcct gcccccgaag ccgccggagg cccttccgtg 720

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 780

tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 840

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg aacagtacaa cagcacctac 900

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctggccgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1020

ggccagcccc gcgaacccca ggtgtacaca ctgcccccat gcagggacga gctgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgtggtg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa 1140

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200

gacggctcat tcttcctgta ctccaagctg acagtggaca agtcccggtg gcagcagggc 1260

aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320

ctgagcctga gccccggc 1338

<210> 83

<211> 1338

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38hhy1370 IgG1(botón) NNSA Pesada 2 secuencia polinucleotídica

<400> 83

caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ctggcaggtc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggaa tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gactggaatg ggtggccgtg atttggtacg acggcagcaa caagtactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcggcgaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaatgttc 300

agaggcgcct tcgactactg gggccagggc acactcgtga ccgtgtctag tgcgtcgacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtatgttgac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa caatgcctcc 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag 1080

aatcaagtca gcctgtggtg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcta ctcaaaactc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggt 1338

<210> 84

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD3low VH dominio

<400> 84

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-CD3low VL dominio

<400> 85

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly

85 90 95

Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 86

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3 VH FW1

<400> 86

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 87

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb4 VH FW1

<400> 87

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 88

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb5 VH FW1

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 89

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VH FW1

<400> 89

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3/mAb5 VH FW2

<400> 90

Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Tyr

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb4 VH FW2

<400> 91

Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Tyr

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VH FW2

<400> 92

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10 15

Val

<210> 93

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3 VH FW3

<400> 93

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr

1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Phe Cys

35

<210> 94

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb4/mAb5 VH FW3

<400> 94

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr

1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Phe Cys

35

<210> 95

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VH FW3

<400> 95

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn

1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5/mAb6 VH FW4

<400> 96

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 97

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW1

<400> 97

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 98

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VL FW1

<400> 98

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW2

<400> 99

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VL FW2

<400> 100

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 101

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW3

<400> 101

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 102

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VL FW3

<400> 102

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala

20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys

35

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW4

<400> 103

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb6 VL FW4

<400> 104

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 105

<211> 159

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD38 isoforma E secuencia

<400> 105

Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
20 25 30

Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
35 40 45

Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
50 55 60

Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65 70 75 80

Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
85 90 95

Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
100 105 110

Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser
115 120 125

Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
130 135 140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg His Phe Trp Glu Cys Gly Ser Pro
145 150 155

<210> 106

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb7 Cadena ligera

<400> 106

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 107

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mAb7 Cadena pesada

<400> 107

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 108

<211> 445

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> referencia Cadena pesada 1 (se une a CD38)

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Pro Gln Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Thr Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Asn Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asp Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Lys His Glu Asp Pro Glu Val Lys

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Asp Val Ser
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asp Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu
405 410 415

Gln Gly Asp Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 109

<211> 485

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> referencia Cadena pesada 2 (se une a CD3)

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Lys Pro

115 120 125

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly

130 135 140

Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly

145 150 155 160

Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr

165 170 175

Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg

180 185 190

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg

195 200 205

Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly

210 215 220

Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
225 230 235 240
Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Pro
245 250 255
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
260 265 270
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
275 280 285
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
290 295 300
Lys His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
305 310 315 320
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
325 330 335
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
340 345 350
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
355 360 365
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
370 375 380
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met Thr Lys Asn Gln
385 390 395 400
Val Lys Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
405 410 415
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

420 425 430

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

435 440 445

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

450 455 460

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

465 470 475 480

Leu Ser Pro Gly Lys

485

<210> 110

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> referencia Cadena ligera (se une a CD38)

<400> 110

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Trp

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

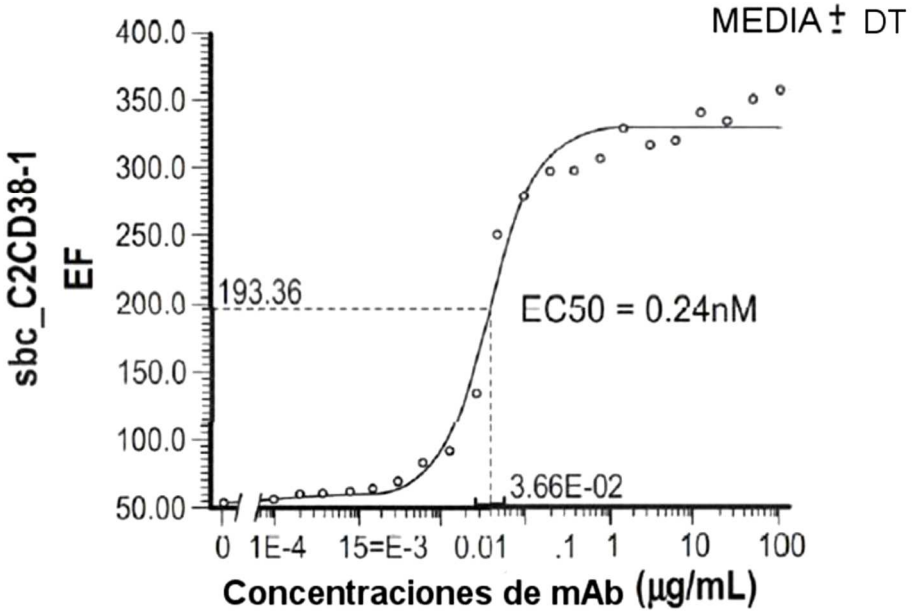
<400> 132

Gln Ser Val Ser Ser Tyr Gly Gln Gly

1 5

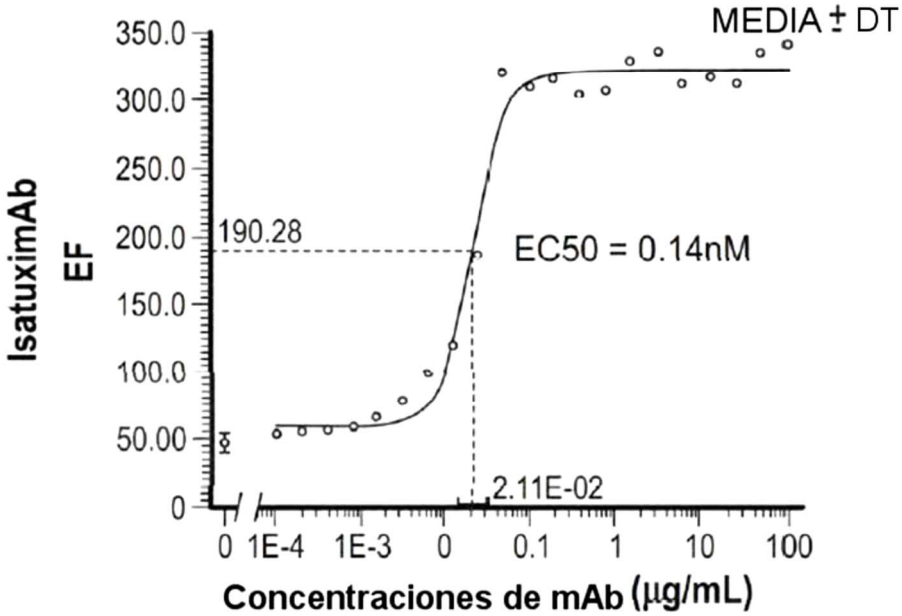
SUDHL8

C2CD38-1 se une a células SUDHL8



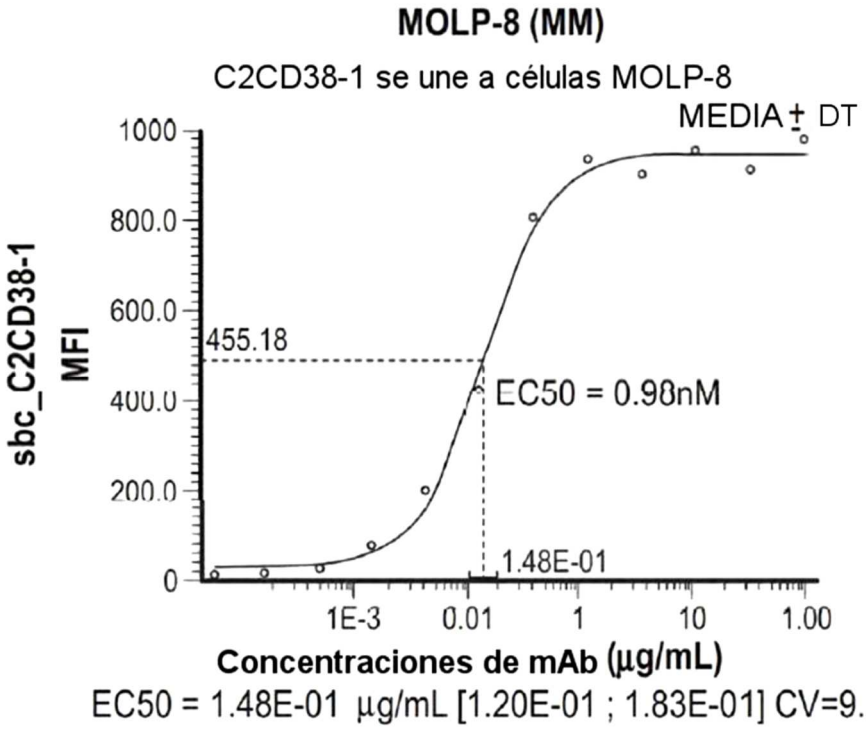
EC50 = 3.66E-02 µg/mL [2.96E-02 ; 4.53E-02] CV=10.2%

SAR650984 se une a células SUDHL8



EC50 = 2.11E-02 µg/mL [1.75E-02 ; 2.55E-02] CV=9.0%

FIG. 1A


MOLP-8 (MM)
C2CD38-1 se une a células MOLP-8
MEDIA ± DT
sbc_C2CD38-1 MFI
1000
800.0
600.0
455.18
400.0
200.0
0
EC50 = 0.98nM
1.48E-01
1E-3
0.01
1
10
1.00
Concentraciones de mAb (µg/mL)
EC50 = 1.48E-01 µg/mL [1.20E-01 ; 1.83E-01] CV=9.1%

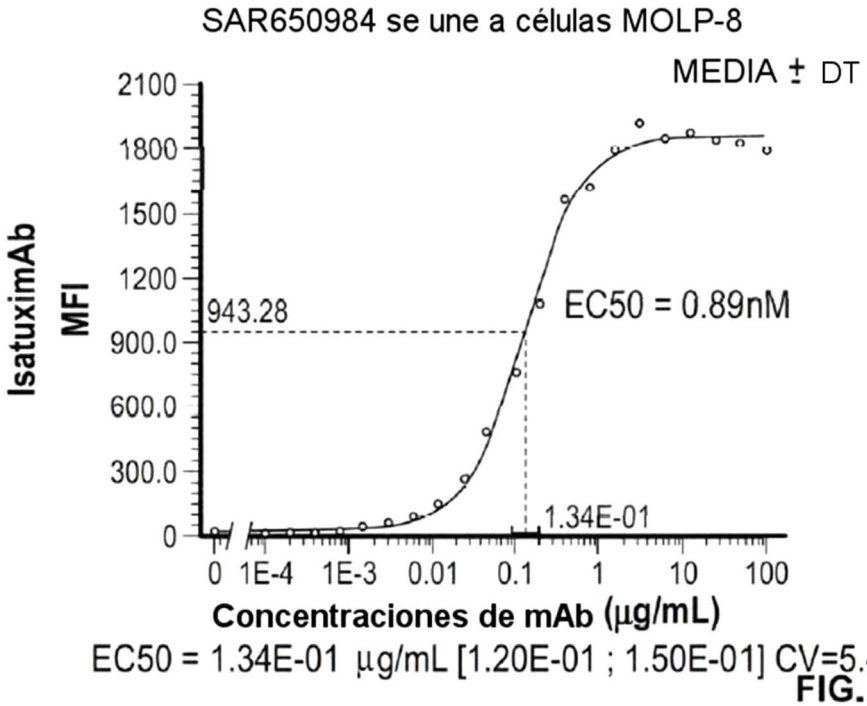

SAR650984 se une a células MOLP-8
MEDIA ± DT
IsatuximAb MFI
2100
1800
1500
1200
943.28
900.0
600.0
300.0
0
EC50 = 0.89nM
1.34E-01
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 100
Concentraciones de mAb (µg/mL)
EC50 = 1.34E-01 µg/mL [1.20E-01 ; 1.50E-01] CV=5.4%

FIG. 1A (Cont.)

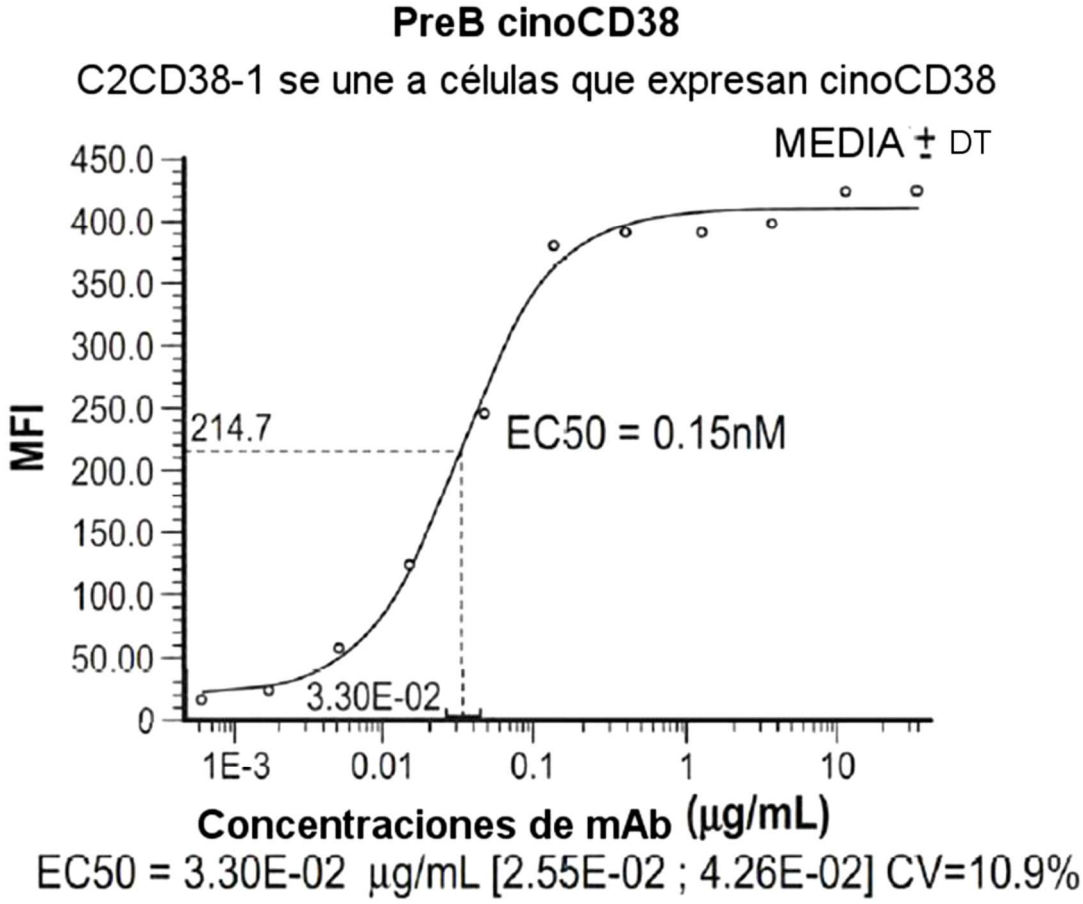

PreB cinoCD38
C2CD38-1 se une a células que expresan cinoCD38
MEDIA ± DT
MFI
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.00
0
214.7
EC50 = 0.15nM
3.30E-02
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones de mAb (µg/mL)
EC50 = 3.30E-02 µg/mL [2.55E-02 ; 4.26E-02] CV=10.9%

FIG. 1B

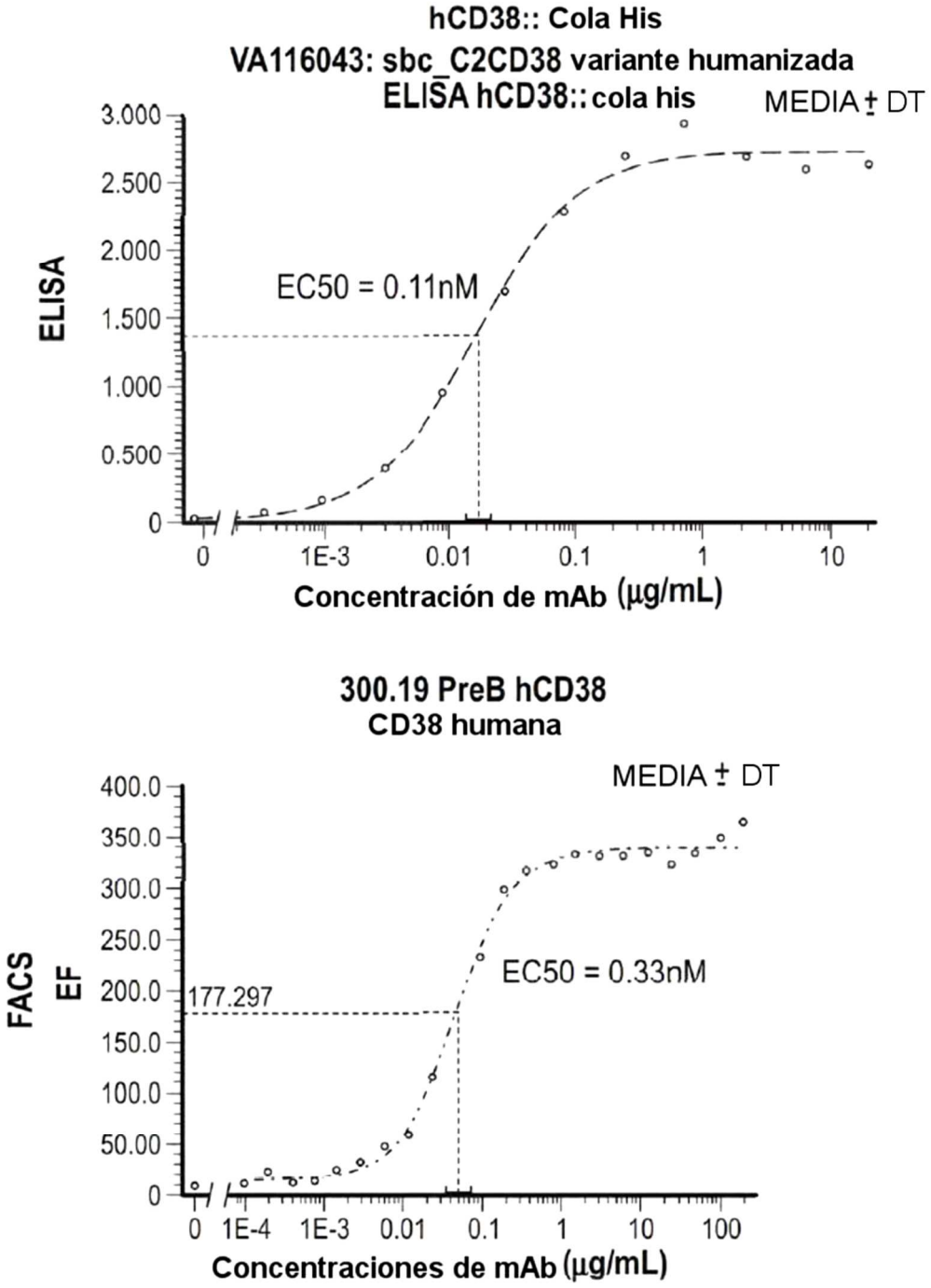

hCD38:: Cola His
VA116043: sbc_C2CD38 variante humanizada
ELISA hCD38:: cola his
MEDIA ± DT
ELISA
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.11nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentración de mAb (µg/mL)
300.19 PreB hCD38
CD38 humana
MEDIA ± DT
FACS
EF
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.00
0
177.297
EC50 = 0.33nM
0
1E-4
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2A

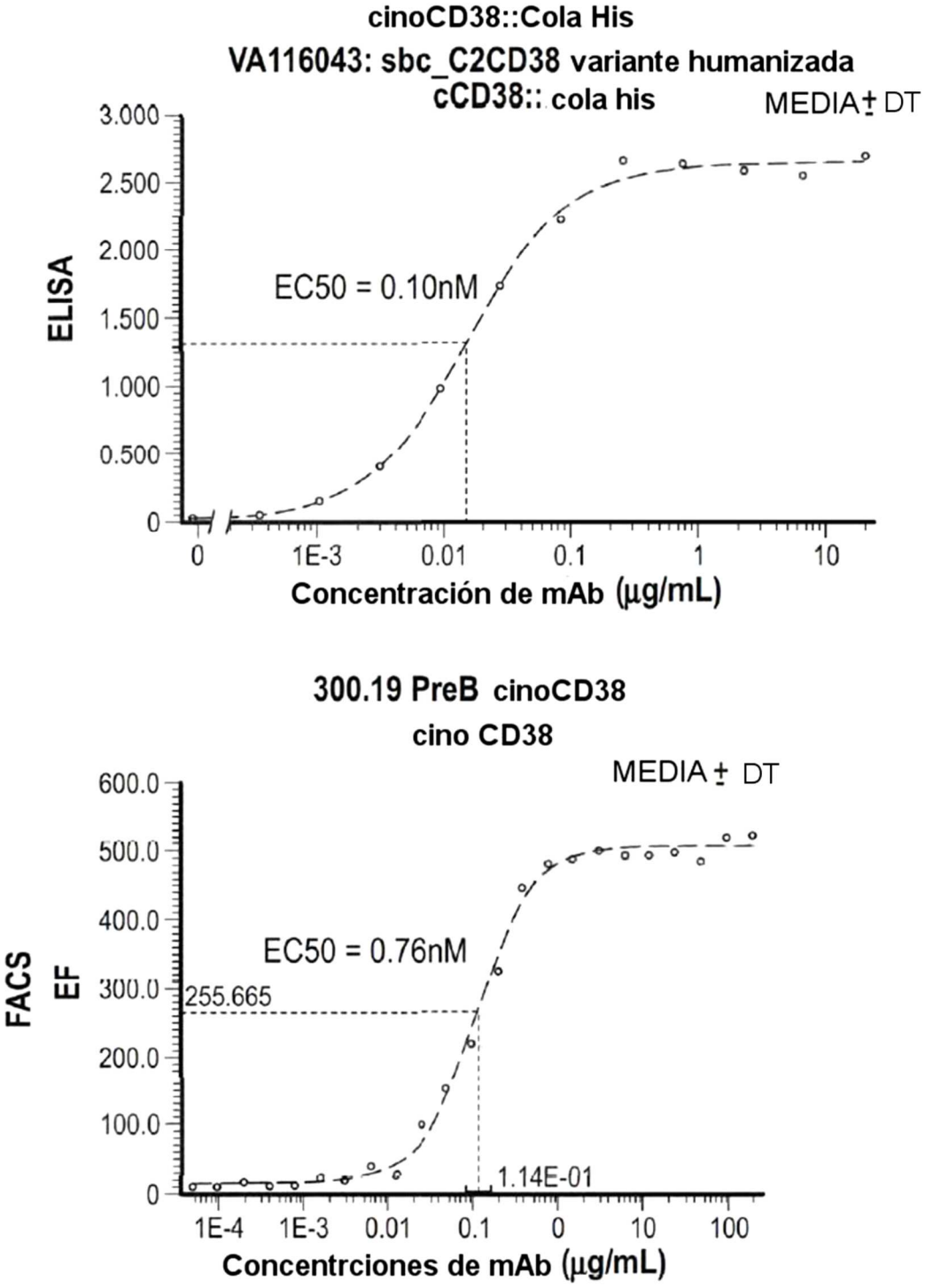
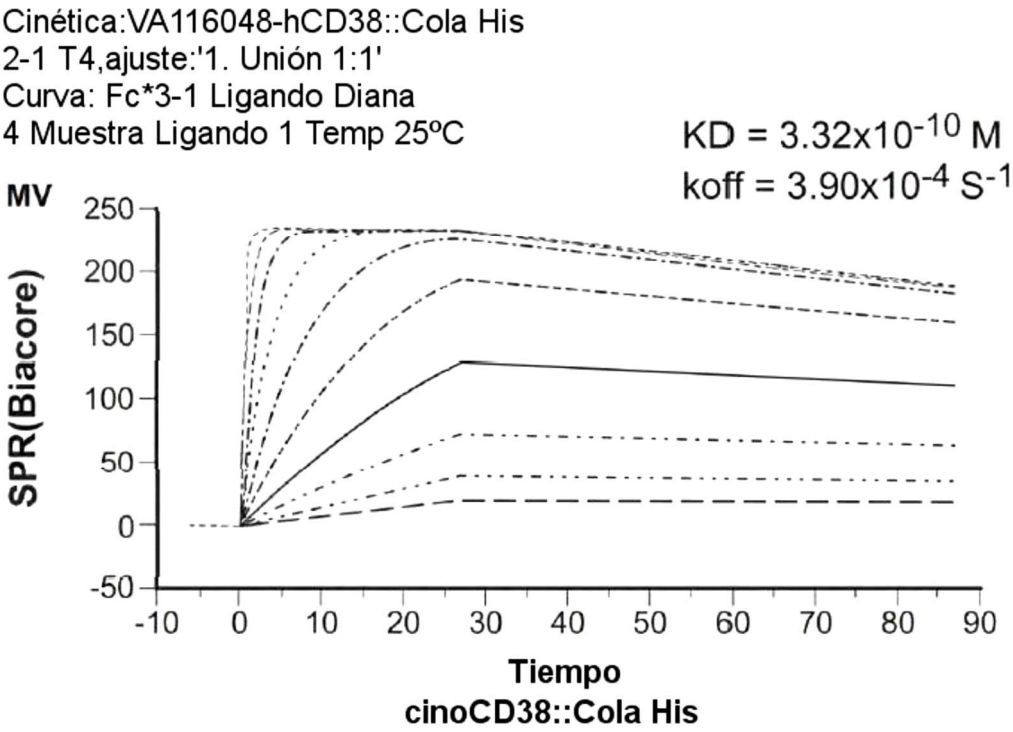

cinoCD38::Cola His
VA116043: sbc_C2CD38 variante humanizada
cCD38:: cola his
MEDIA ± DT
ELISA
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.10nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentración de mAb (µg/mL)
300.19 PreB cinoCD38
cino CD38
MEDIA ± DT
FACS
EF
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
EC50 = 0.76nM
255.665
1.14E-01
1E-4
1E-3
0.01
0.1
0
10
100
Concentrciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2A (Cont.)

hCD38::Cola His



cinoCD38::Cola His

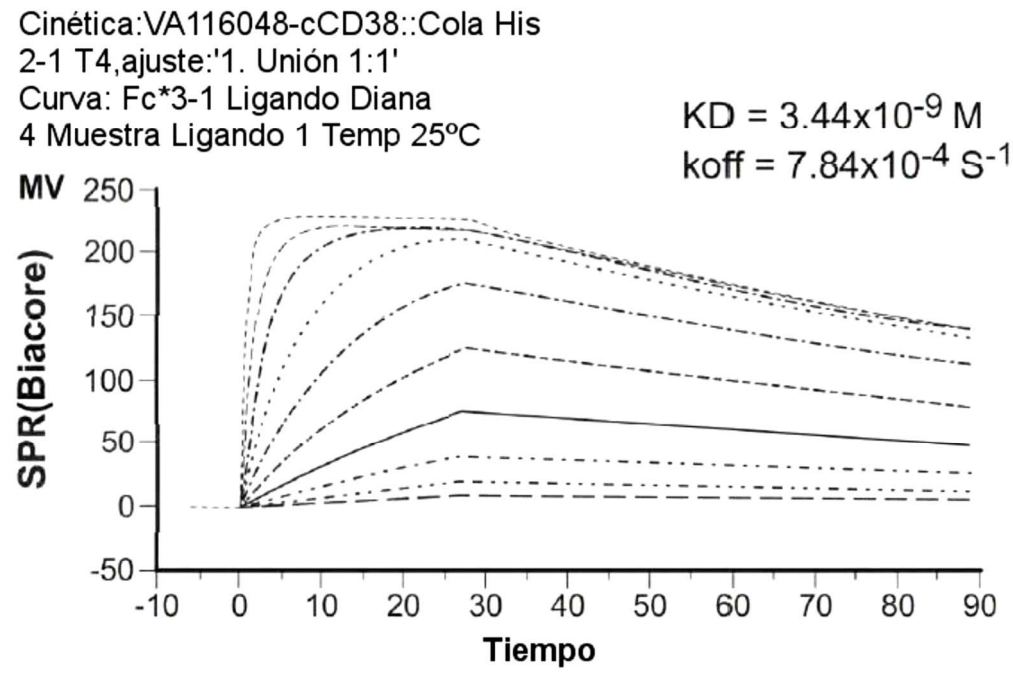
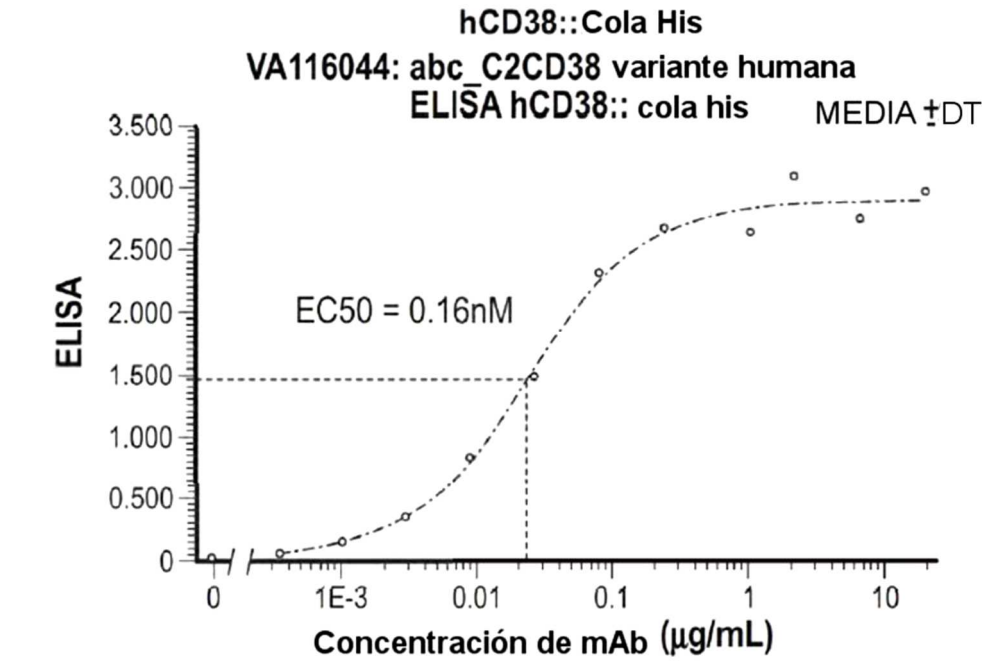


FIG. 2B


hCD38::Cola His
VA116044: abc_C2CD38 variante humana
ELISA hCD38:: cola his
MEDIA ± DT
ELISA
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.16nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentración de mAb (µg/mL)

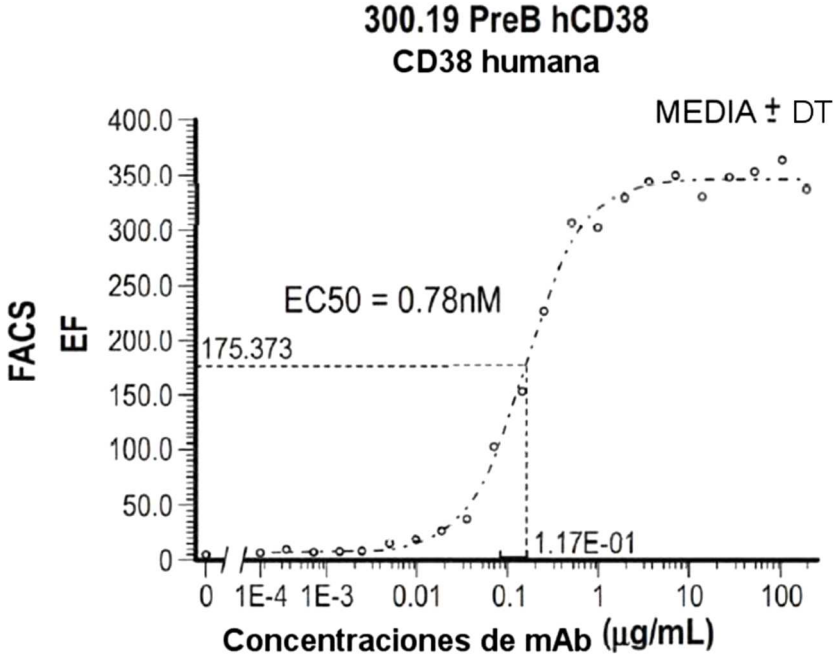

300.19 PreB hCD38
CD38 humana
MEDIA ± DT
FACS
EF
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
EC50 = 0.78nM
175.373
1.17E-01
0
1E-4
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2C

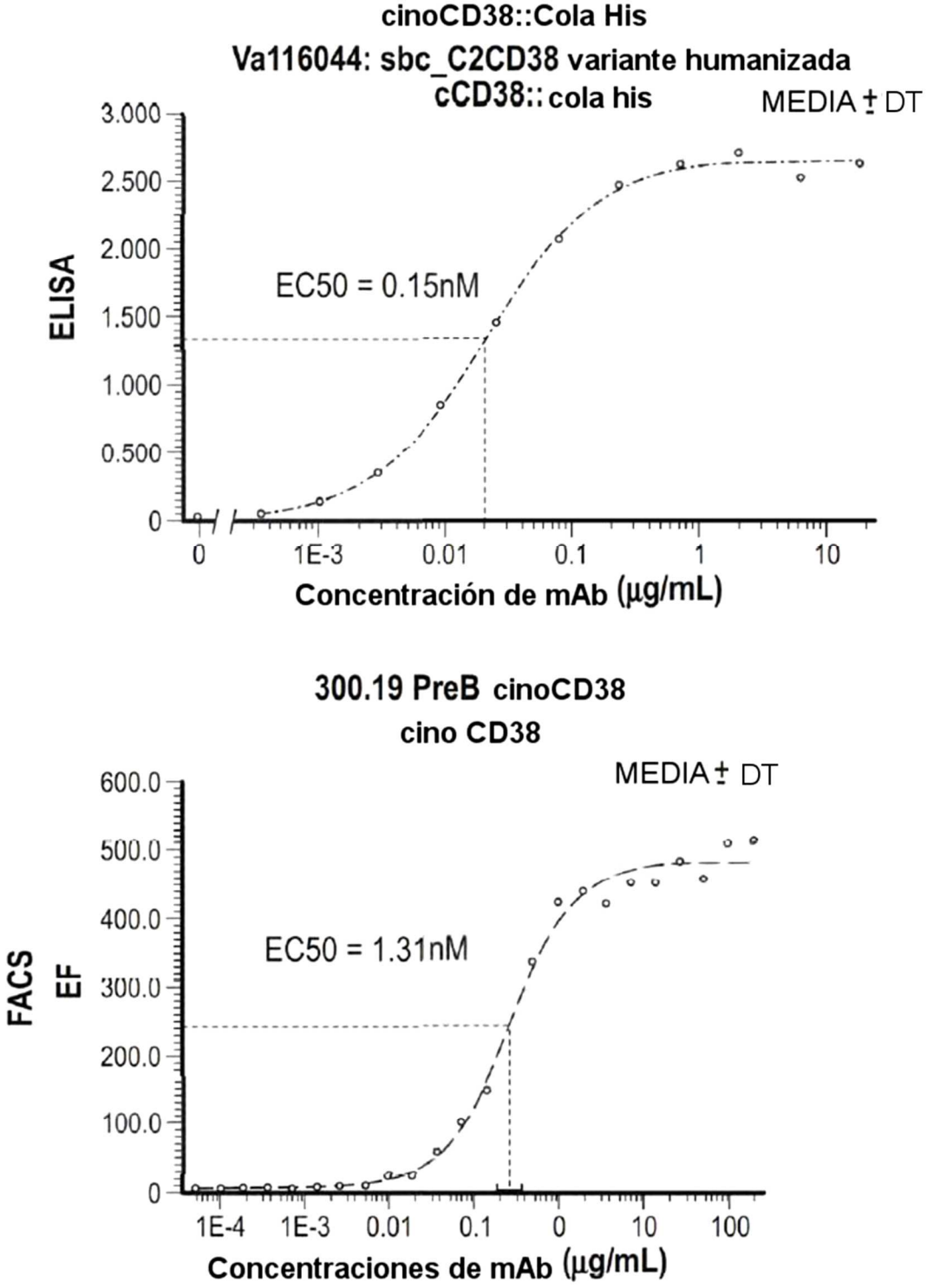
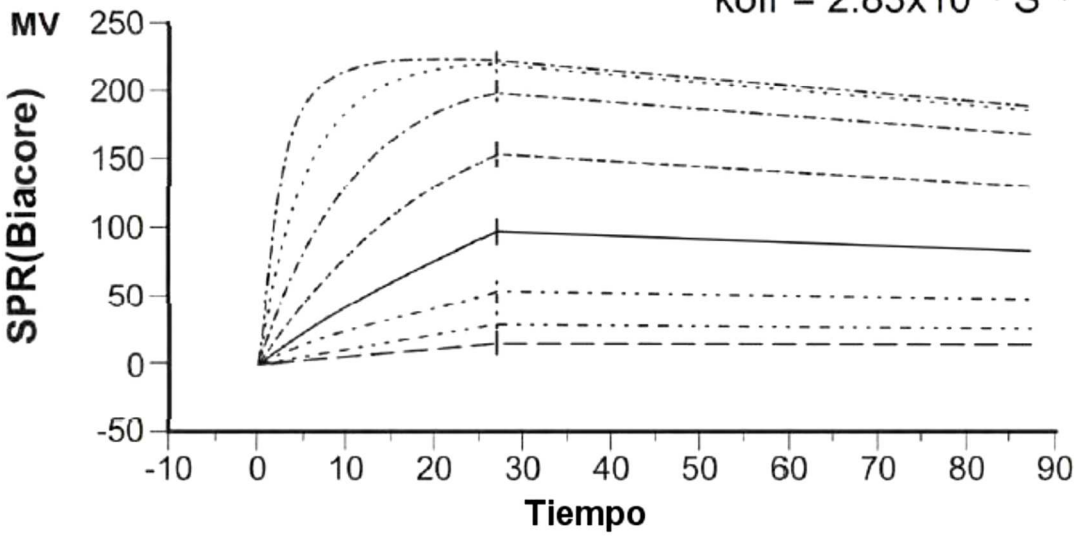

cinoCD38::Cola His
Va116044: sbc_C2CD38 variante humanizada
cCD38:: cola his
MEDIA ± DT
ELISA
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.15nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentración de mAb (µg/mL)
300.19 PreB cinoCD38
cino CD38
MEDIA ± DT
FACS
EF
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
EC50 = 1.31nM
1E-4
1E-3
0.01
0.1
0
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2C (Cont.)

hCD38::Cola His

Cinética:VA116044-hCD38::Cola His
3-1 T5 2',ajuste:'1. Unión 1:1'
Curva: Fc*3-1 Ligando Diana
5 Muestra Ligando 1 Temp 25ºC

$KD = 4.83x10^{-10}$ M
$koff = 2.83x10^{-4}$ S^{-1}



cinoCD38::Cola His

Cinética:VA116044-cCD38::Cola His
3-1 T5,ajuste:'1. Unión 1:1'
Curva: Fc*3-1 Ligando Diana
5 Muestra Ligando 1 Temp 25ºC

$KD = 7.10x10^{-10}$ M
$koff = 1.29x10^{-4}$ S^{-1}

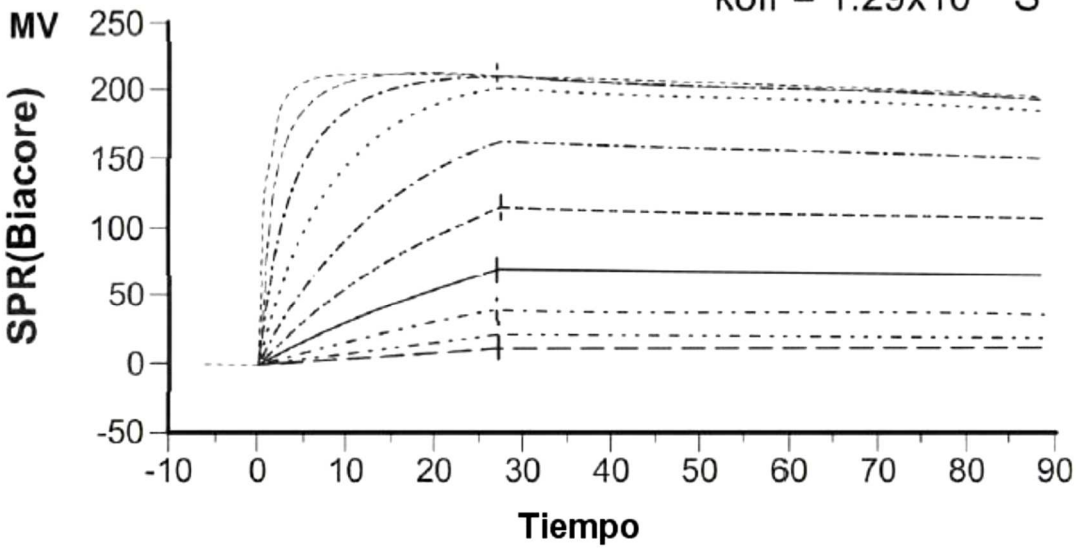


FIG. 2D

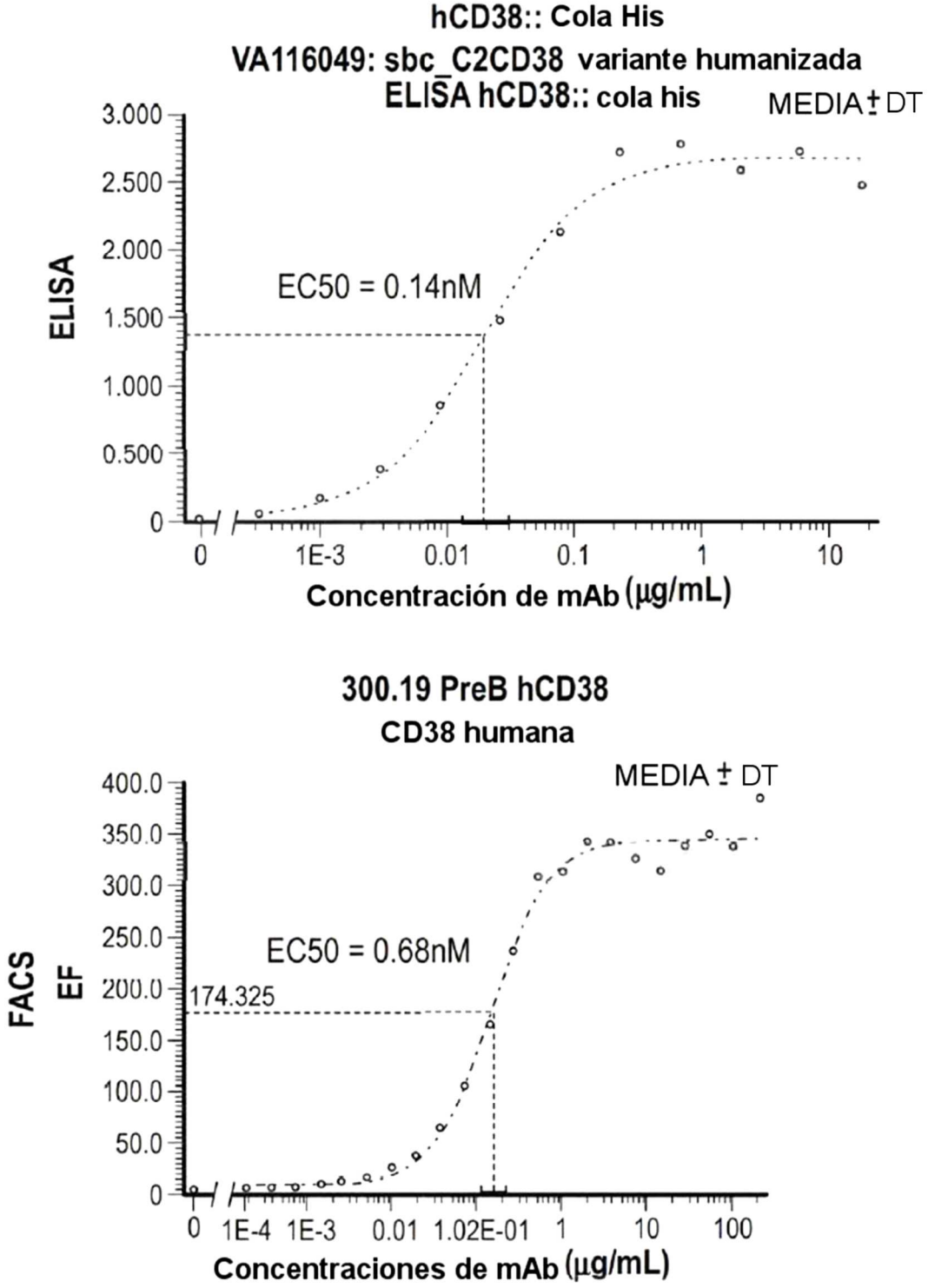

hCD38:: Cola His
VA116049: sbc_C2CD38 variante humanizada
ELISA hCD38:: cola his
MEDIA ± DT
ELISA
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.14nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentración de mAb (µg/mL)
300.19 PreB hCD38
CD38 humana
MEDIA ± DT
FACS
EF
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
EC50 = 0.68nM
174.325
0
1E-4
1E-3
0.01
1.02E-01
1
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2E

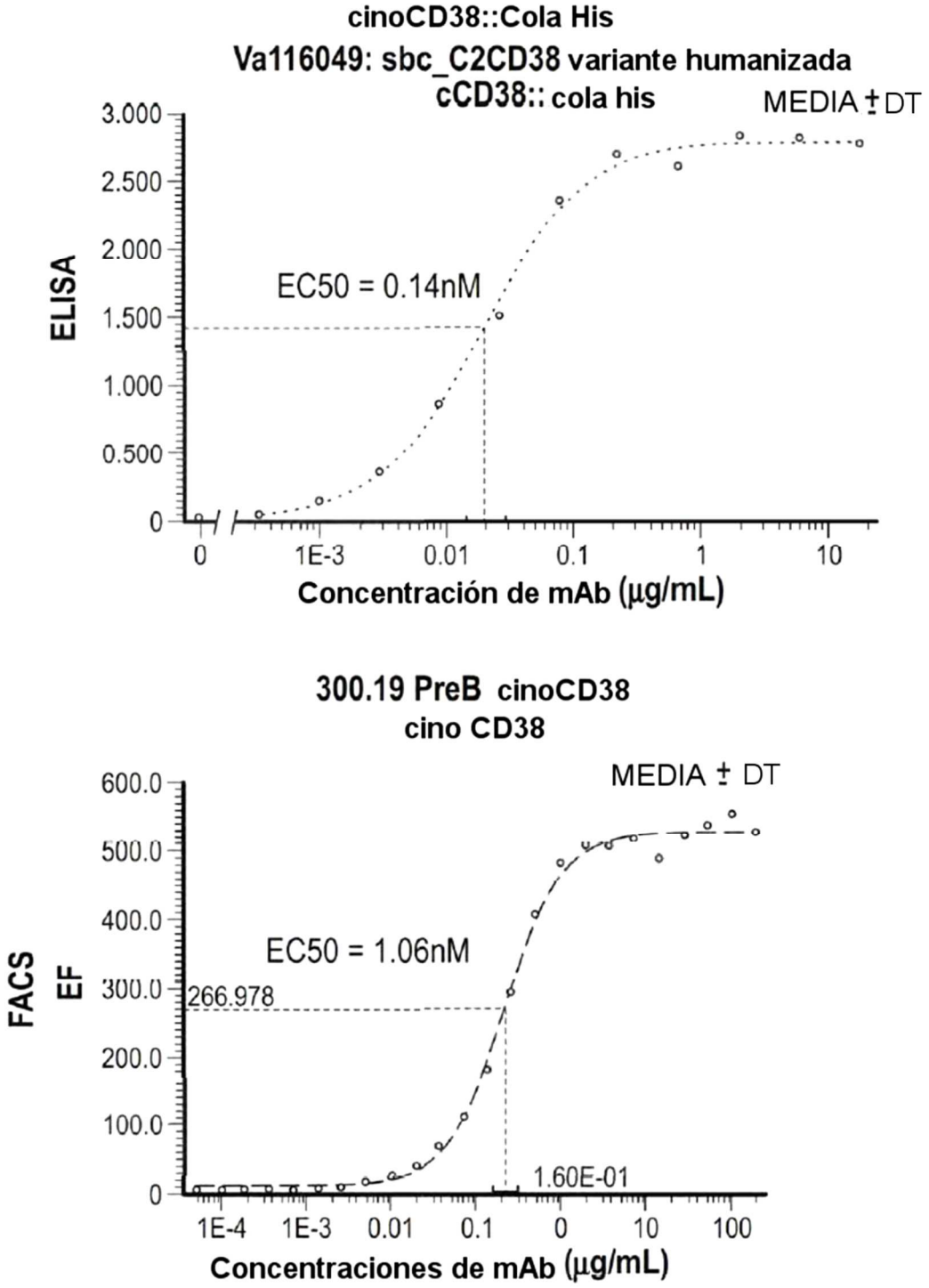
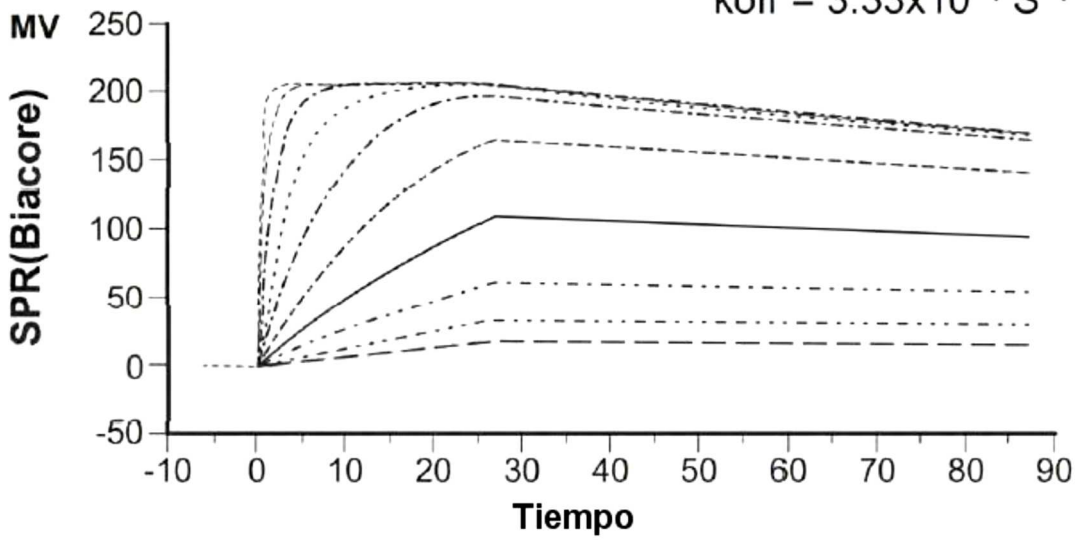

cinoCD38::Cola His
Va116049: sbc_C2CD38 variante humanizada
cCD38:: cola his
MEDIA ± DT
ELISA
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.14nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentración de mAb (µg/mL)
300.19 PreB cinoCD38
cino CD38
MEDIA ± DT
FACS
EF
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
EC50 = 1.06nM
266.978
1.60E-01
1E-4
1E-3
0.01
0.1
0
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2E (Cont.)

hCD38::Cola His

Cinética:VA116049-hCD38::Cola His
2-1 T4',ajuste:'1. Unión 1:1'
Curva: Fc*2-1 Ligando Diana
4 Muestra Ligando 1 Temp 25ºC

$KD = 3.12x10^{-10}$ M
$koff = 3.33x10^{-4}$ S^{-1}



cinoCD38::Cola His

Cinética:VA116049-cCD38::Cola His
2-1 T4 2',ajuste:'1. Unión 1:1'
Curva: Fc*2-1 Ligando Diana
4 Muestra Ligando 1 Temp 25ºC

$KD = 5.63x10^{-10}$ M
$koff = 1.25x10^{-4}$ S^{-1}

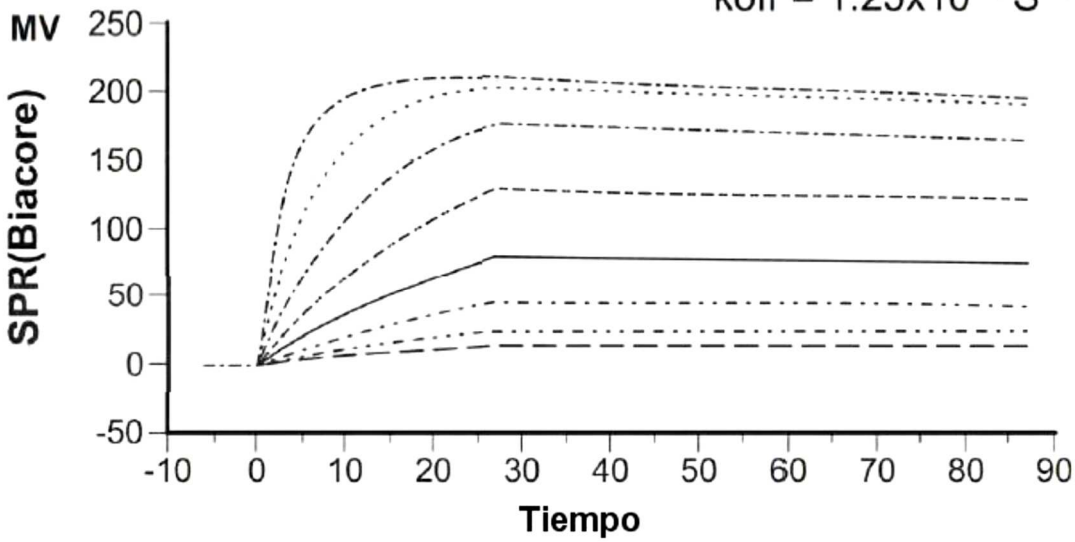


FIG. 2F

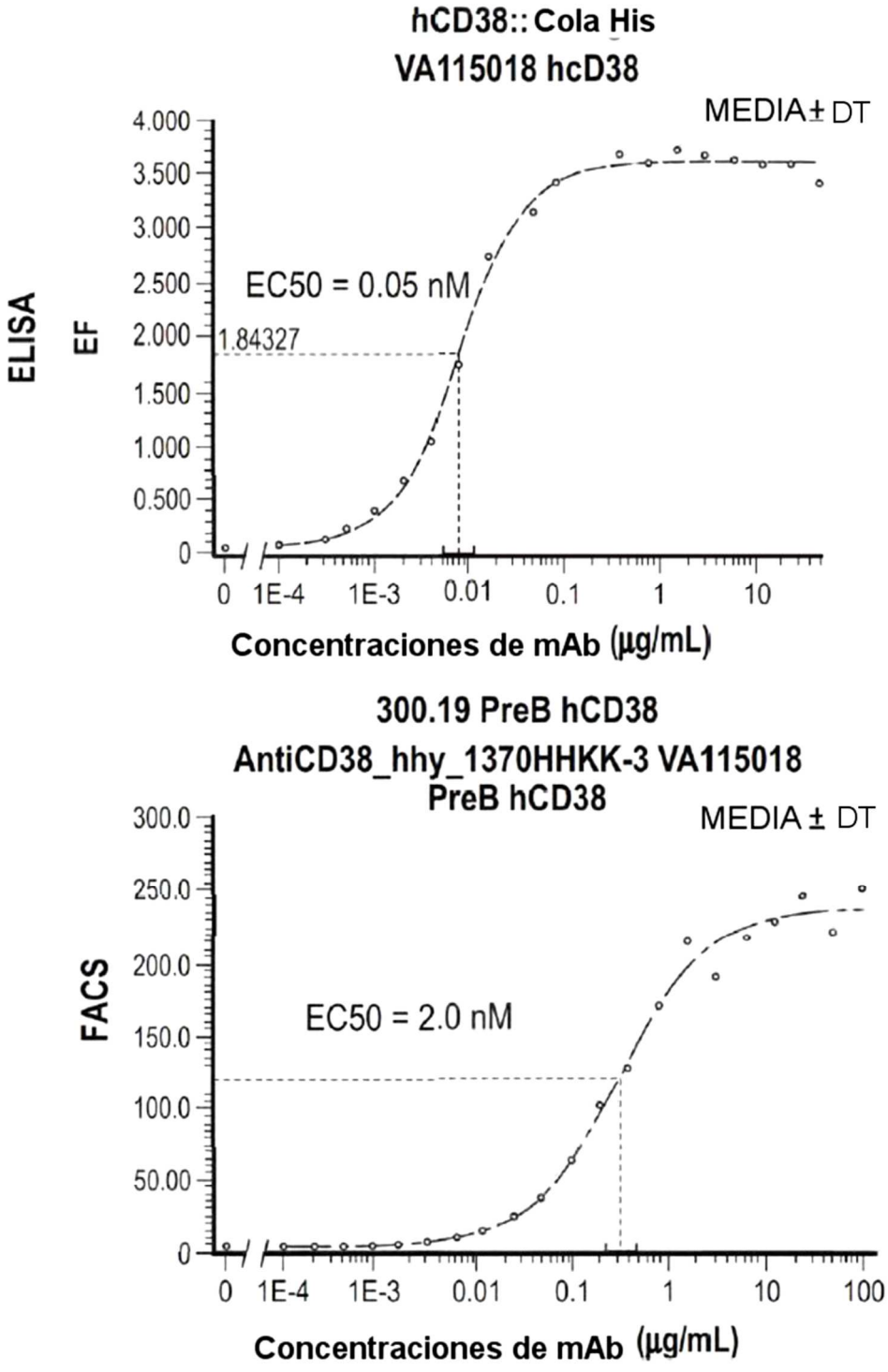

hCD38:: Cola His
VA115018 hcD38
MEDIA± DT
ELISA
EF
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.05 nM
1.84327
0
1E-4
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones de mAb (µg/mL)
300.19 PreB hCD38
AntiCD38_hhy_1370HHKK-3 VA115018
PreB hCD38
MEDIA ± DT
FACS
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.00
0
EC50 = 2.0 nM
0
1E-4
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2G

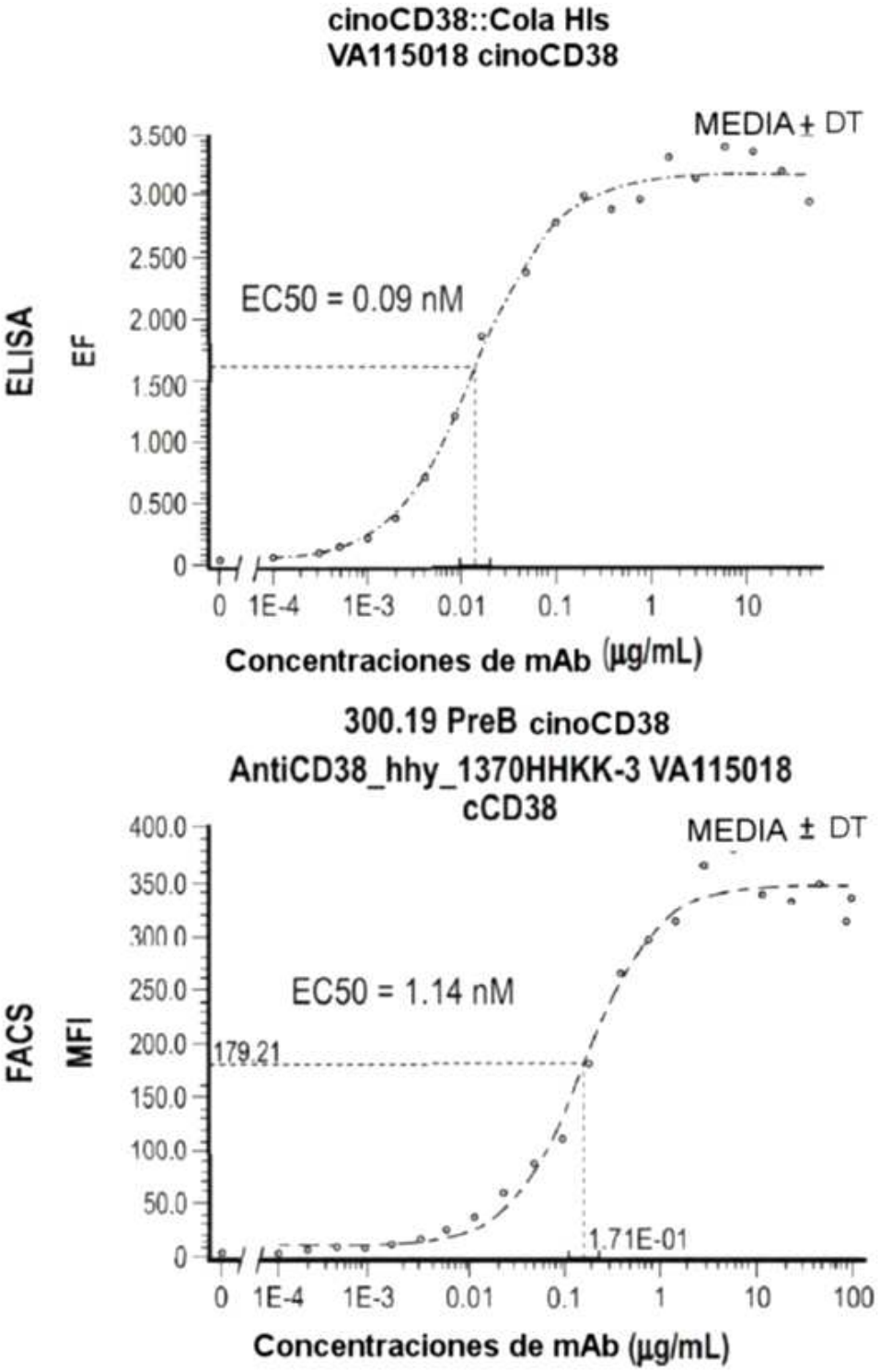
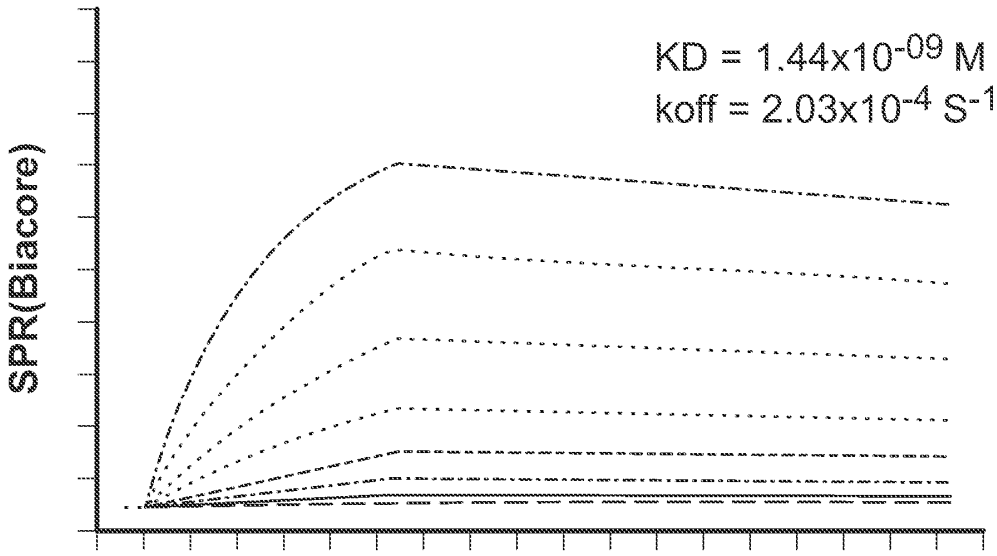

cinoCD38::Cola Hls
VA115018 cinoCD38
MEDIA ± DT
EC50 = 0.09 nM
ELISA
EF
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10
Concentraciones de mAb (µg/mL)
300.19 PreB cinoCD38
AntiCD38_hhy_1370HHKK-3 VA115018
cCD38
MEDIA ± DT
EC50 = 1.14 nM
FACS
MFI
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
179.21
1.71E-01
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 100
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2G (Cont.)

hCD38::colaHis



cinoCD38::colaHis

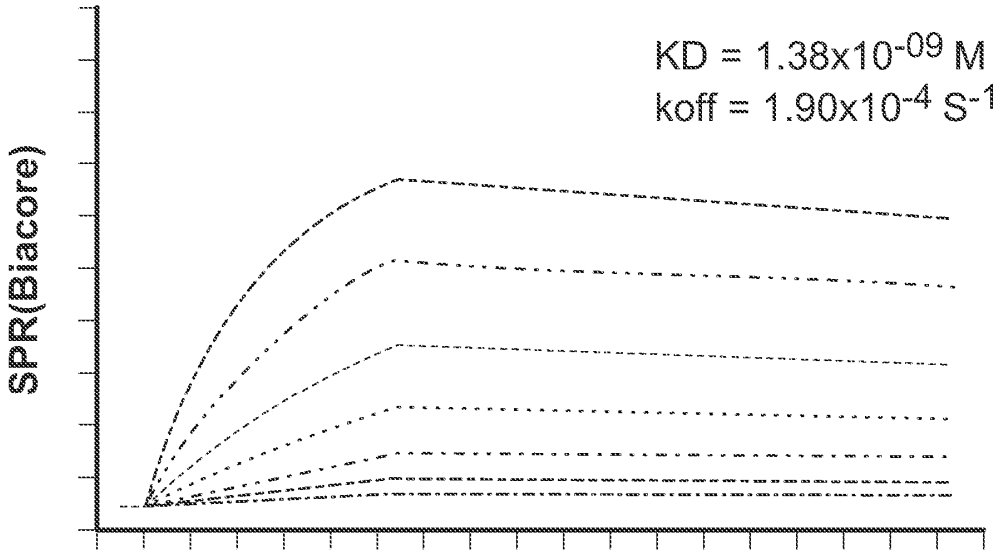


FIG. 2H

	Nomenclatura INN	ELISA EC50 nM		SPR KD nM		FACS EC50 nM		Identidad de región V humana	
		hu	cyno	hu	cyno	hu	cyno	H	L
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL1-VH1	**-zu**mAb	0.11	0.10	0.33	3.44	0.33	0.76	84.7%	87.1%
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL3-VH3	**-zu**mAb	0.16	0.15	0.48	0.71	0.78	1.31	83.7%	83.9%
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL3-VH5	**-zu**mAb	0.16	0.17	0.82	1.14	0.55	1.15	80.6%	83.9%
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL3-VH6	**-zu**mAb	0.14	0.14	0.31	0.56	0.68	1.06	81.6%	83.9%
AntiCD38_hhy_1370HHKK-3	**-u**mAb	0.05	0.09	1.44	1.38	2.00	1.14	99.0%	95.8%

FIG. 2I

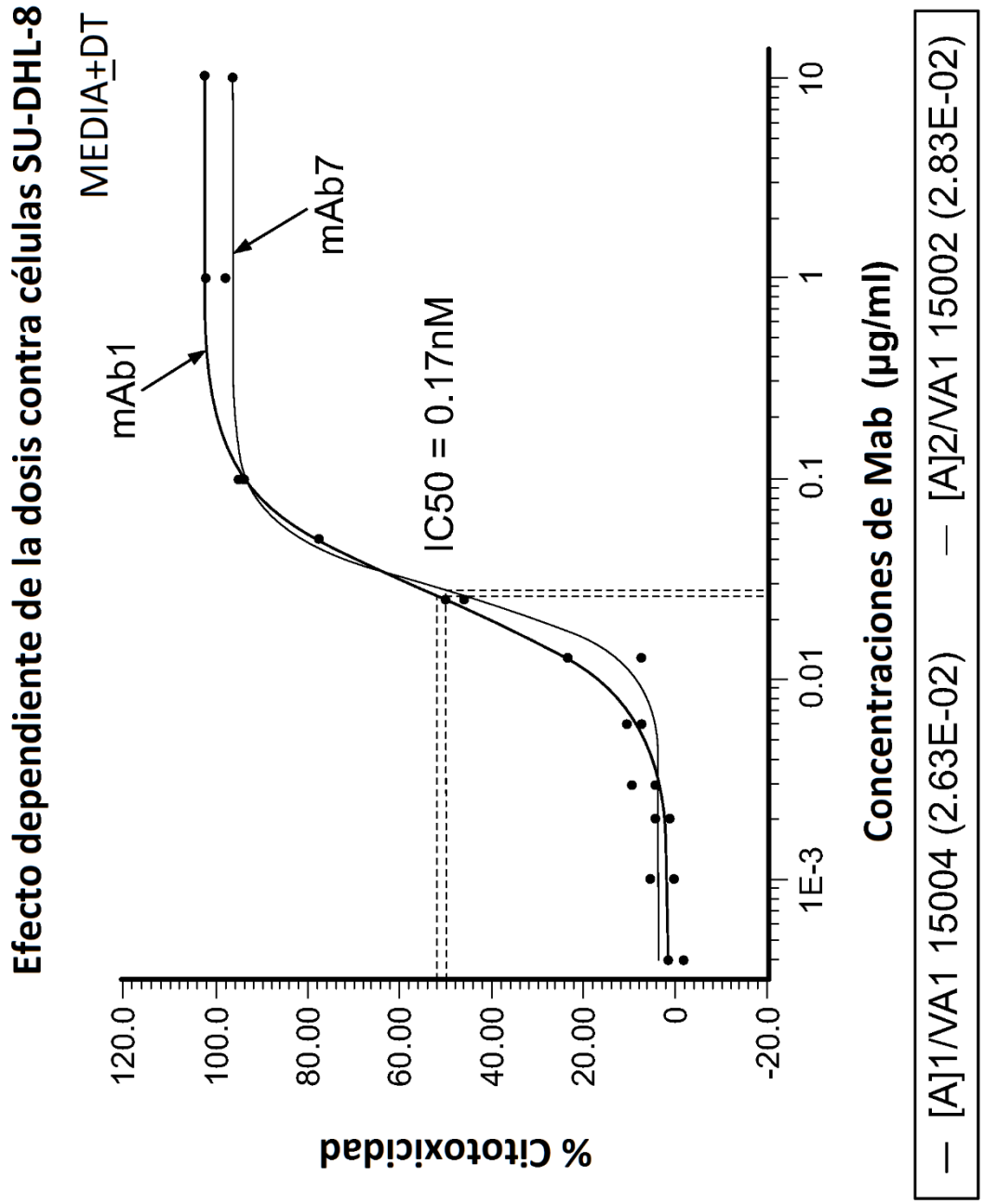

Efecto dependiente de la dosis contra células SU-DHL-8
MEDIA±DT
mAb1
mAb7
IC50 = 0.17nM
% Citotoxicidad
120.0
100.0
80.00
60.00
40.00
20.00
0
-20.0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones de Mab (µg/ml)
— [A]1/VA1 15004 (2.63E-02)
— [A]2/VA1 15002 (2.83E-02)

FIG. 2J

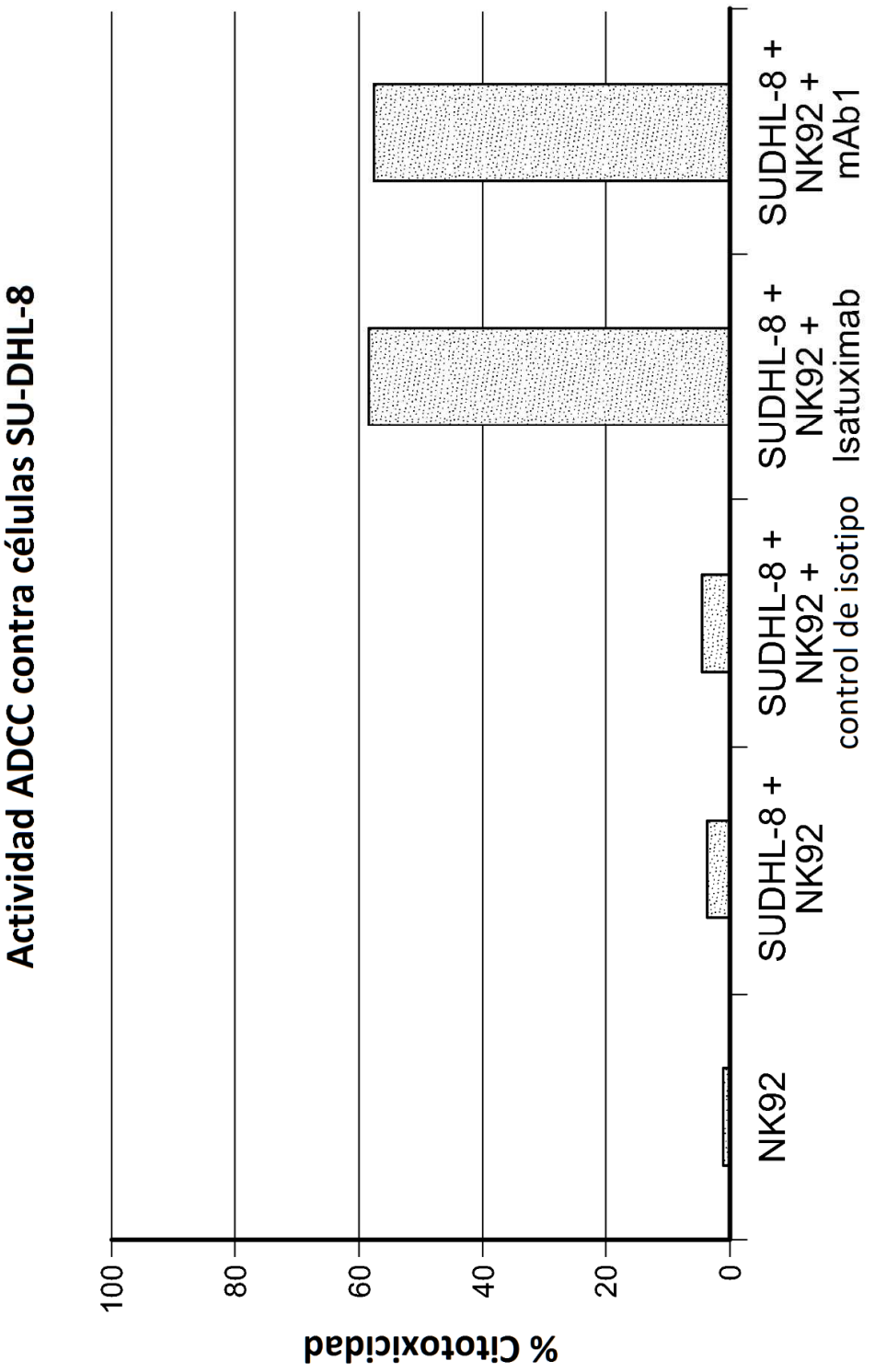

Actividad ADCC contra células SU-DHL-8
% Citotoxicidad
100
80
60
40
20
0
NK92
SUDHL-8 + NK92
SUDHL-8 + NK92 + control de isotipo
SUDHL-8 + NK92 + Isatuximab
SUDHL-8 + NK92 + mAb1

FIG. 2K

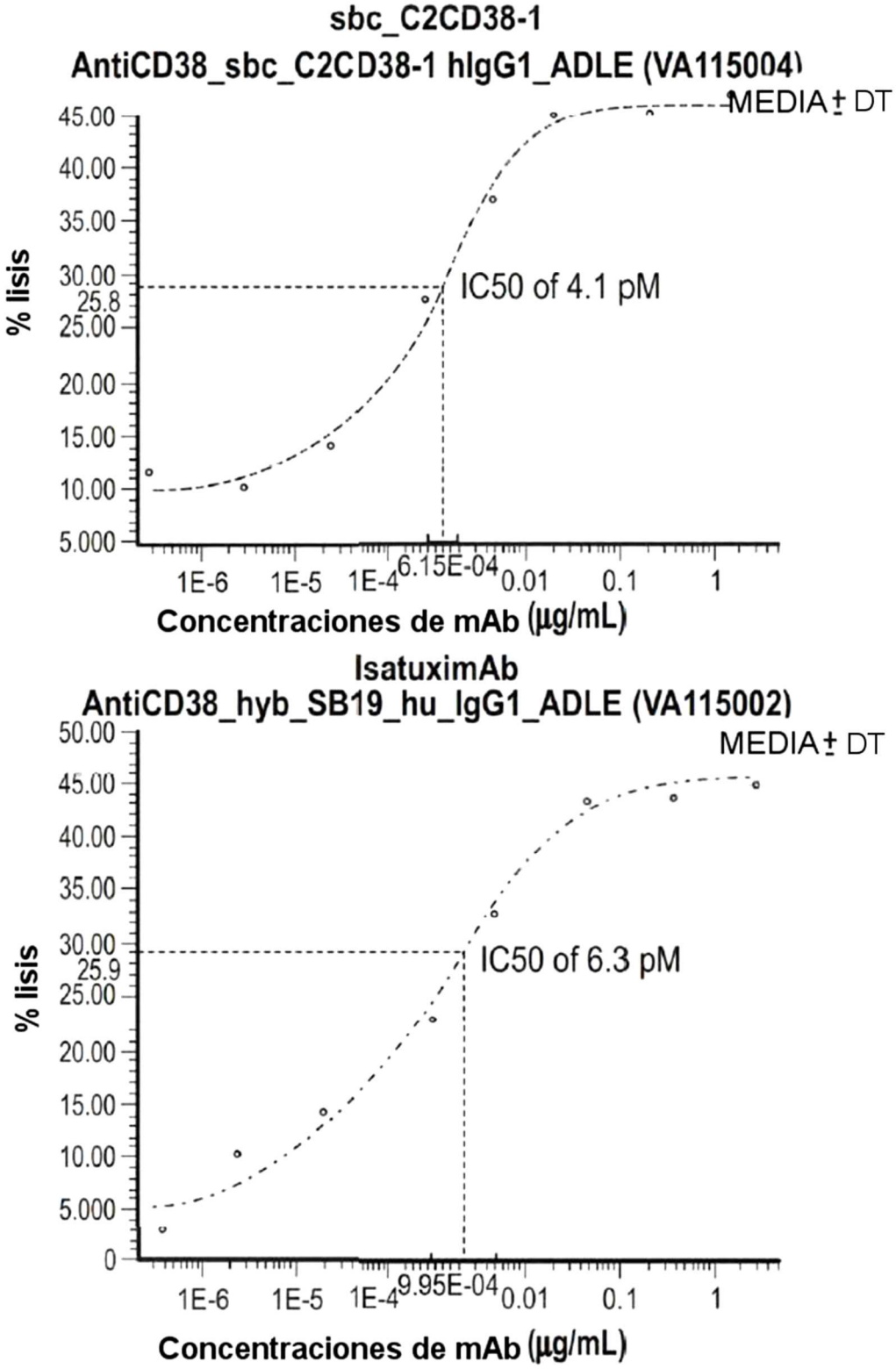

sbc_C2CD38-1
AntiCD38_sbc_C2CD38-1 hIgG1_ADLE (VA115004)
MEDIA ± DT
% lisis
45.00
40.00
35.00
30.00
25.8
25.00
20.00
15.00
10.00
5.000
IC50 of 4.1 pM
1E-6
1E-5
1E-4
6.15E-04
0.01
0.1
1
Concentraciones de mAb (µg/mL)
IsatuximAb
AntiCD38_hyb_SB19_hu_IgG1_ADLE (VA115002)
MEDIA ± DT
% lisis
50.00
45.00
40.00
35.00
30.00
25.9
25.00
20.00
15.00
10.00
5.000
0
IC50 of 6.3 pM
1E-6
1E-5
1E-4
9.95E-04
0.01
0.1
1
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 2L

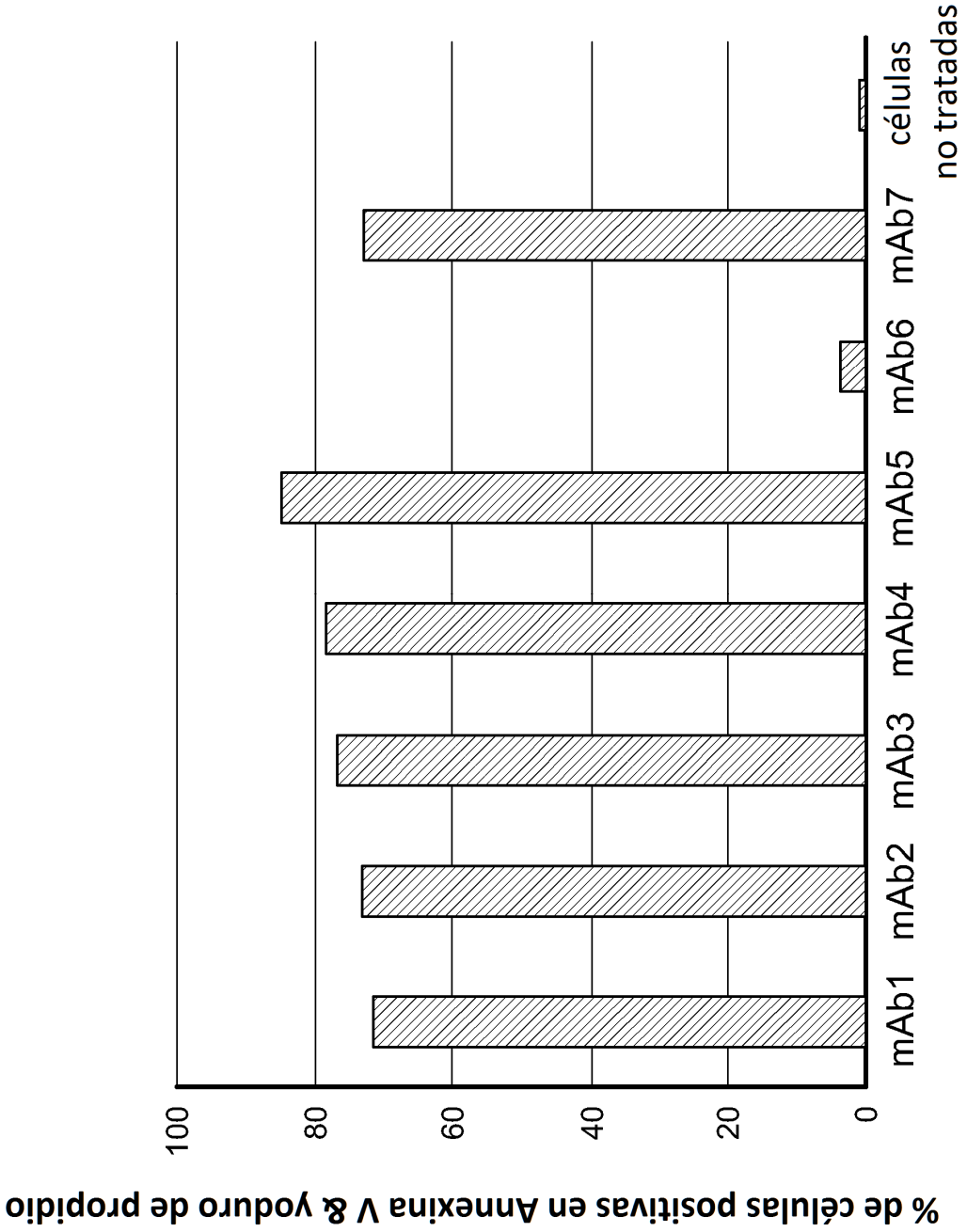

% de células positivas en Anexina V & yoduro de propidio
100
80
60
40
20
0
mAb1
mAb2
mAb3
mAb4
mAb5
mAb6
mAb7
células no tratadas

FIG. 2M

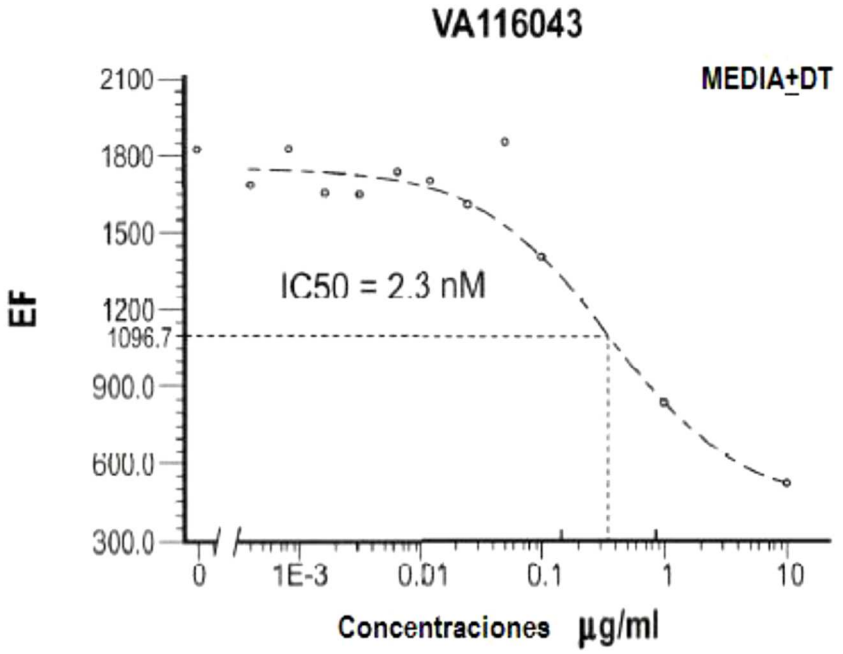

VA116043
MEDIA+DT
EF
2100
1800
1500
1200
1096.7
900.0
600.0
300.0
IC50 = 2.3 nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones µg/ml

FIG. 2N

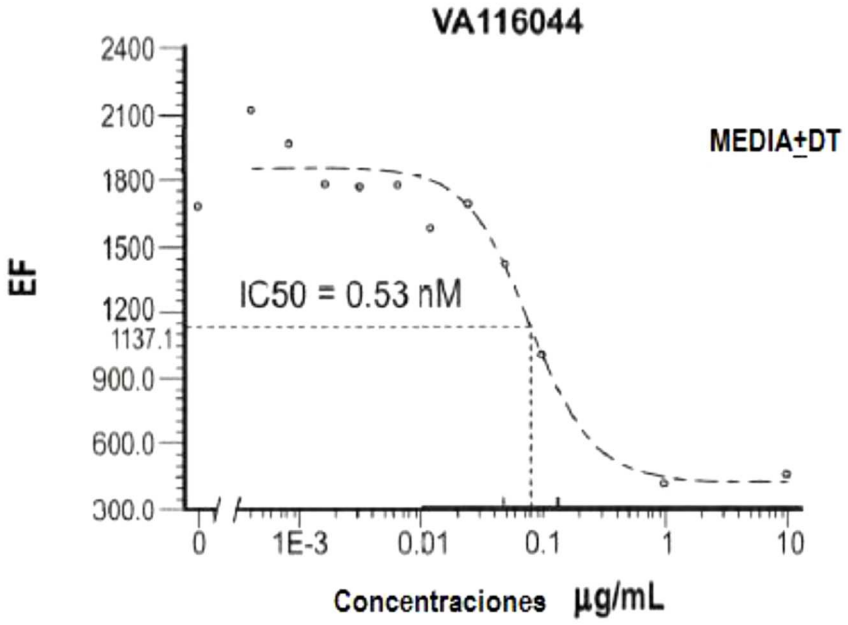

VA116044
MEDIA+DT
EF
2400
2100
1800
1500
1200
1137.1
900.0
600.0
300.0
IC50 = 0.53 nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones µg/mL

FIG. 2O

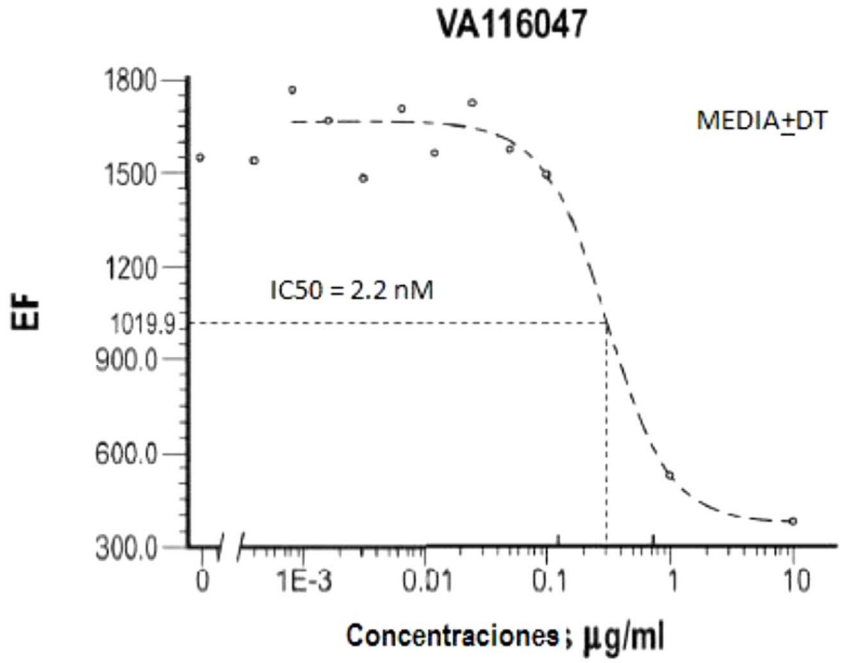

VA116047
1800
1500
1200
1019.9
900.0
600.0
300.0
EF
MEDIA±DT
IC50 = 2.2 nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones ; µg/ml

FIG. 2P

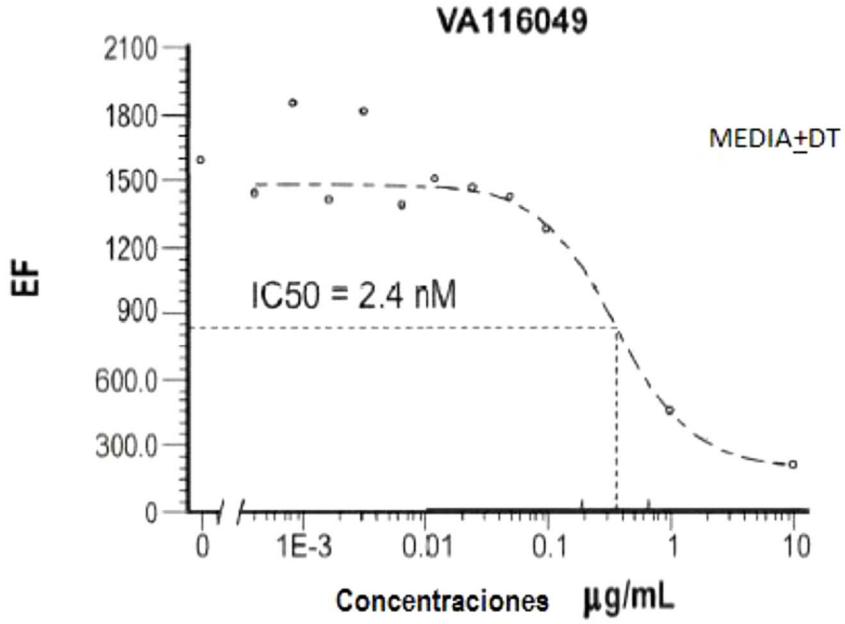

VA116049
2100
1800
1500
1200
900
600.0
300.0
0
EF
MEDIA±DT
IC50 = 2.4 nM
0
1E-3
0.01
0.1
1
10
Concentraciones µg/mL

FIG. 2Q

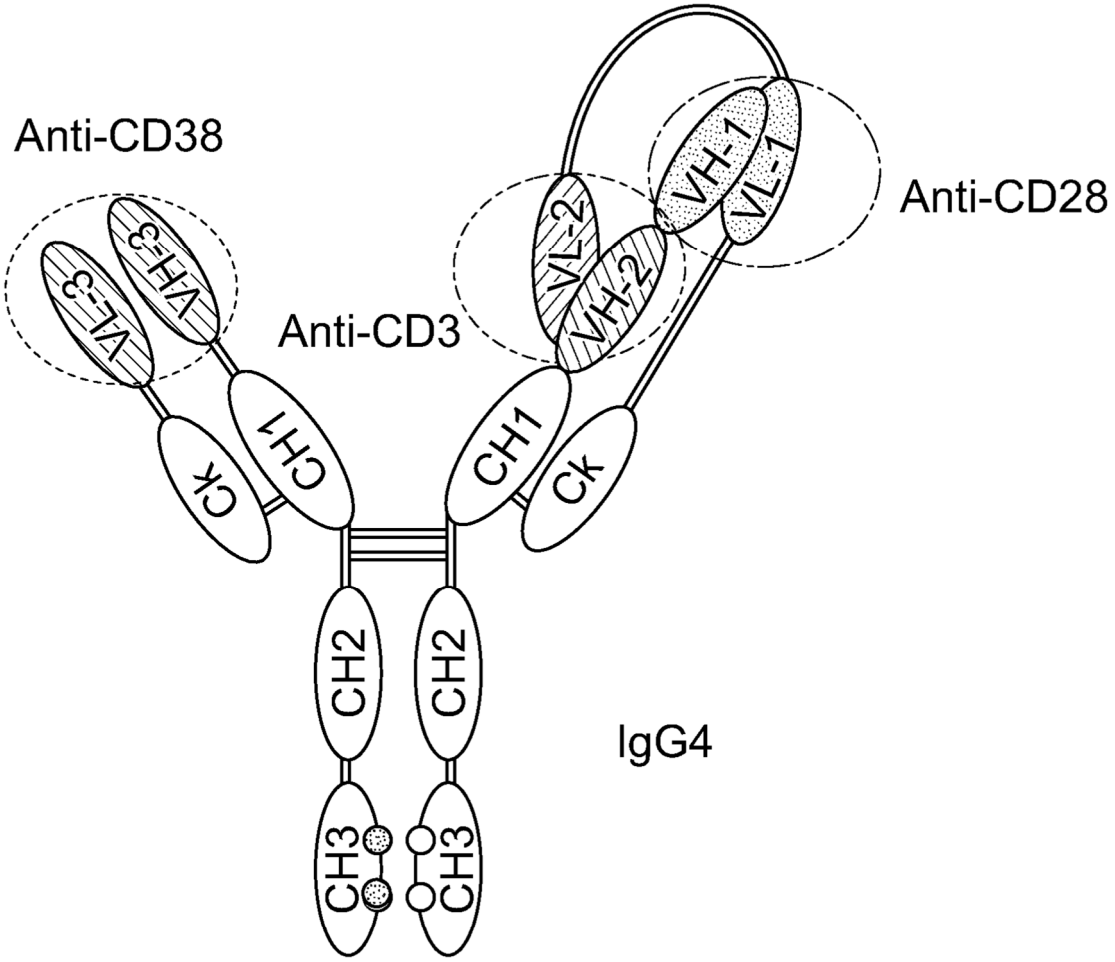
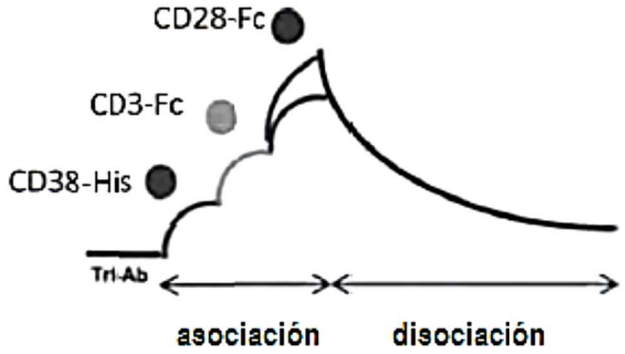
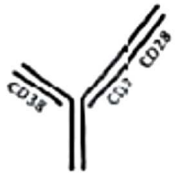
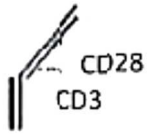

Anti-CD38
Anti-CD3
Anti-CD28
VH-3
VL-3
CK
CH1
VL-2
VH-2
VH-1
VL-1
CH1
Ck
CH2
CH2
CH3
CH3
IgG4

FIG. 3A





1) CD38→CD28→CD3
2) CD38→CD3→CD28
3) CD28→CD3→CD38
4) CD28→CD38→CD3
5) CD3→CD28→CD38
6) CD3→CD38→CD28



1) CD28→CD3
2) CD3→CD28

FIG. 3B

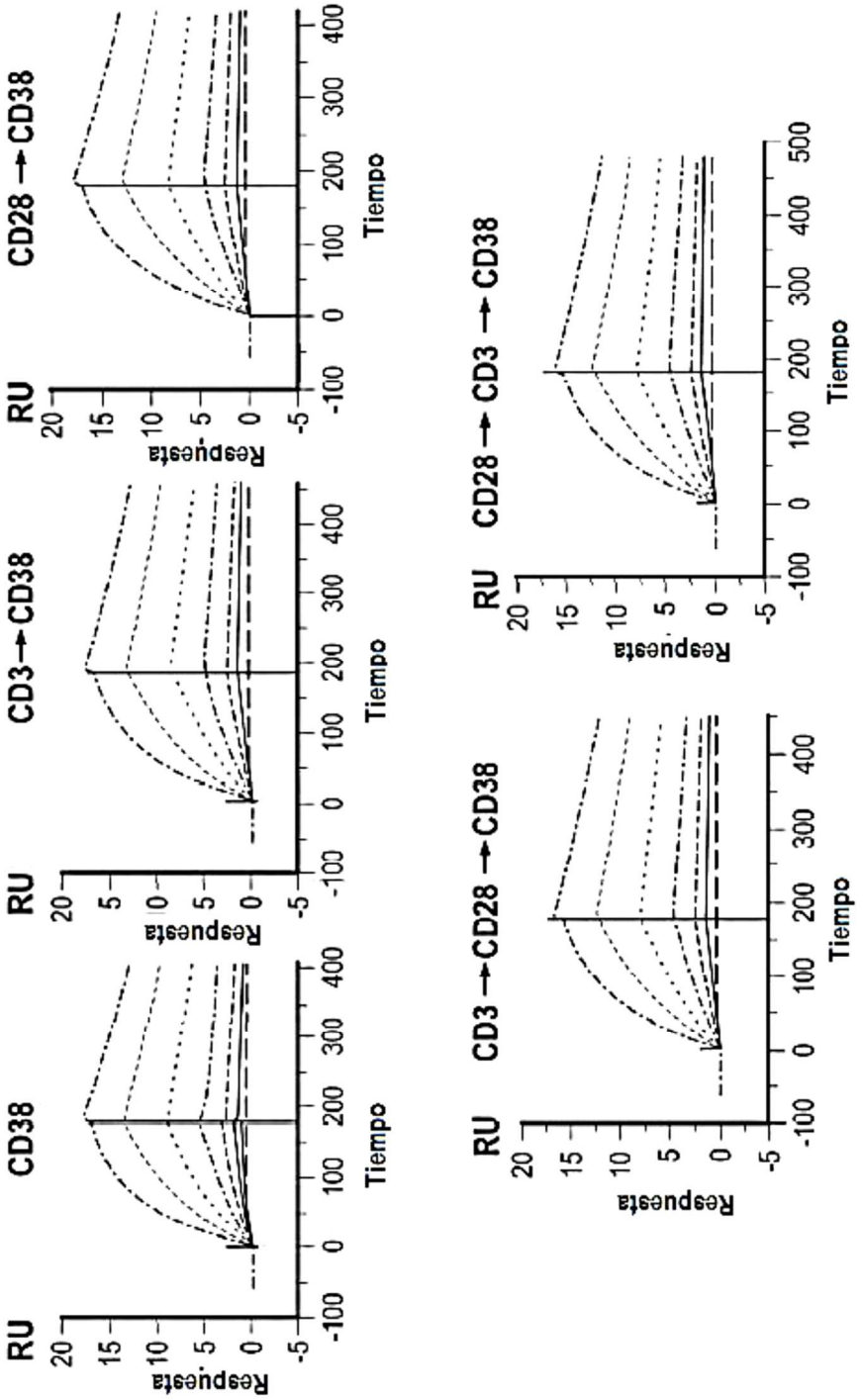

CD38
CD3→CD38
CD28→CD38
CD3→CD28→CD38
CD28→CD3→CD38
RU
Respuesta
Tiempo

FIG. 3C

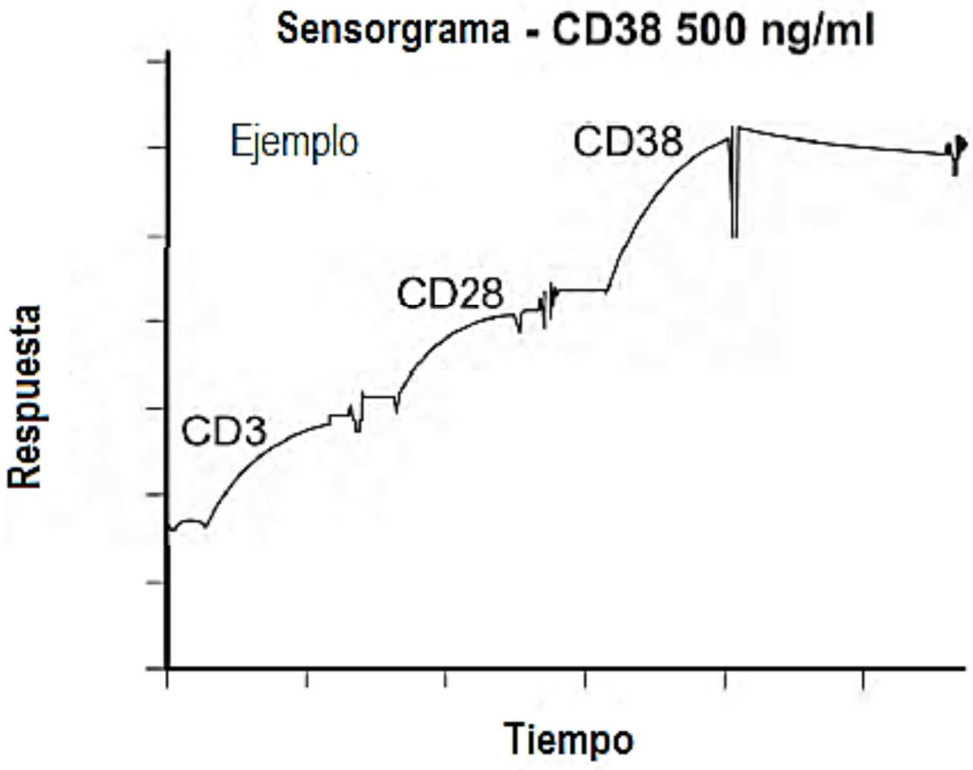

Sensorgrama - CD38 500 ng/ml
Ejemplo
CD38
CD28
CD3
Respuesta
Tiempo

FIG. 4

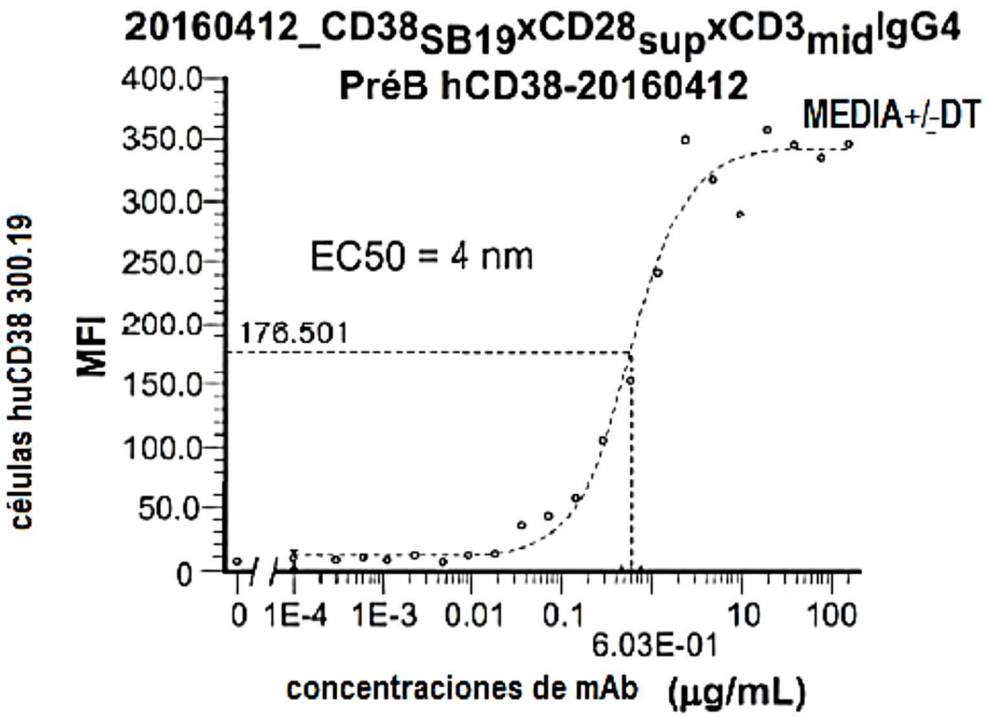
Afinidad de TsAbs WT por dianas individuales (KD redondeada a la unidad)

TsAbs	CD38	CD28	CD3	Clasific. orden afinidad
$CD38_{SB19}CD28_{sup}CD3_{mid}$	2 nM	3 nM	23 nM	• unión a CD38: MsAb ≈ TsAbs • unión a CD28: MsAb > TsAb ≥ BsAbs • unión a CD3: MsAb ≈ BsAb ≈ TsAb
$CD38_{SB19}CD28_{cvn}CD3_{mid}$	2 nM	17 nM	19 nM	
$CD38_{VH1}CD28_{sup}CD3_{mid/low}$	4/6 nM	2/4 nM	21/76 nM	
$CD38_{VH1}CD28_{cvn}CD3_{mid/low}$	4/6 nM	18/34 nM	23/59 nM	
$CD38_{HHY1370}CD28_{sup}CD3_{mid}$	1 nM	5 nM	48 nM	
$CD38_{HHY1370}CD28_{cvn}CD3_{mid}$	1 nM	19 nM	44 nM	

Impacto de la unión de varias dianas a $CD38_{SB19}$ $CD28_{sup}$ $CD3_{mid}$

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

FIG. 5



6.03E-01 [4.78E-0.1 ; 7.60E-01] µg/mL CV= 11.2%

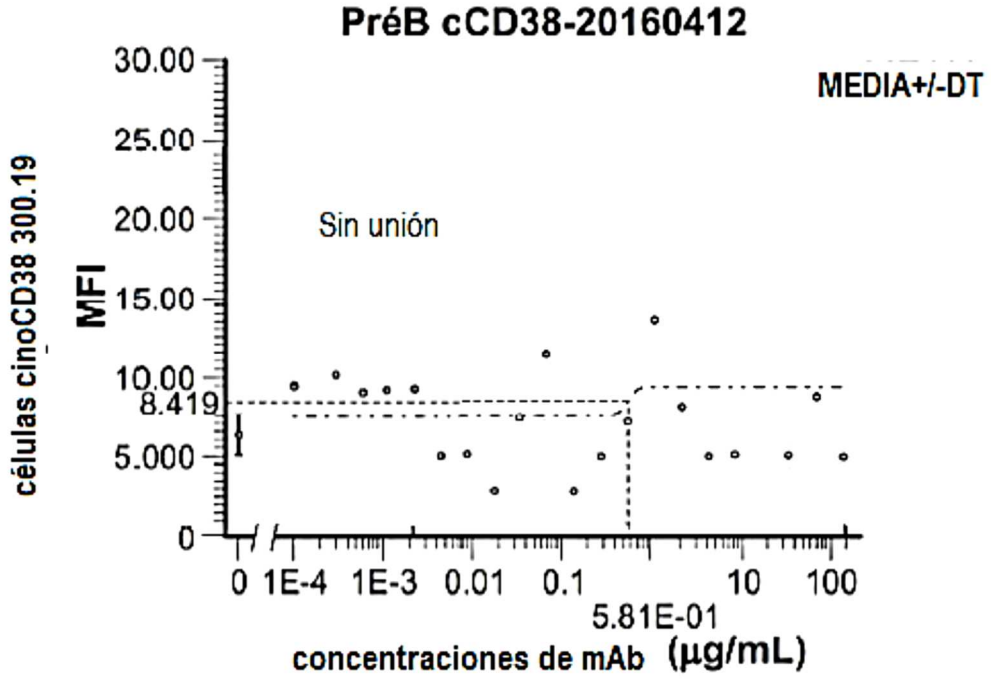


FIG. 6A

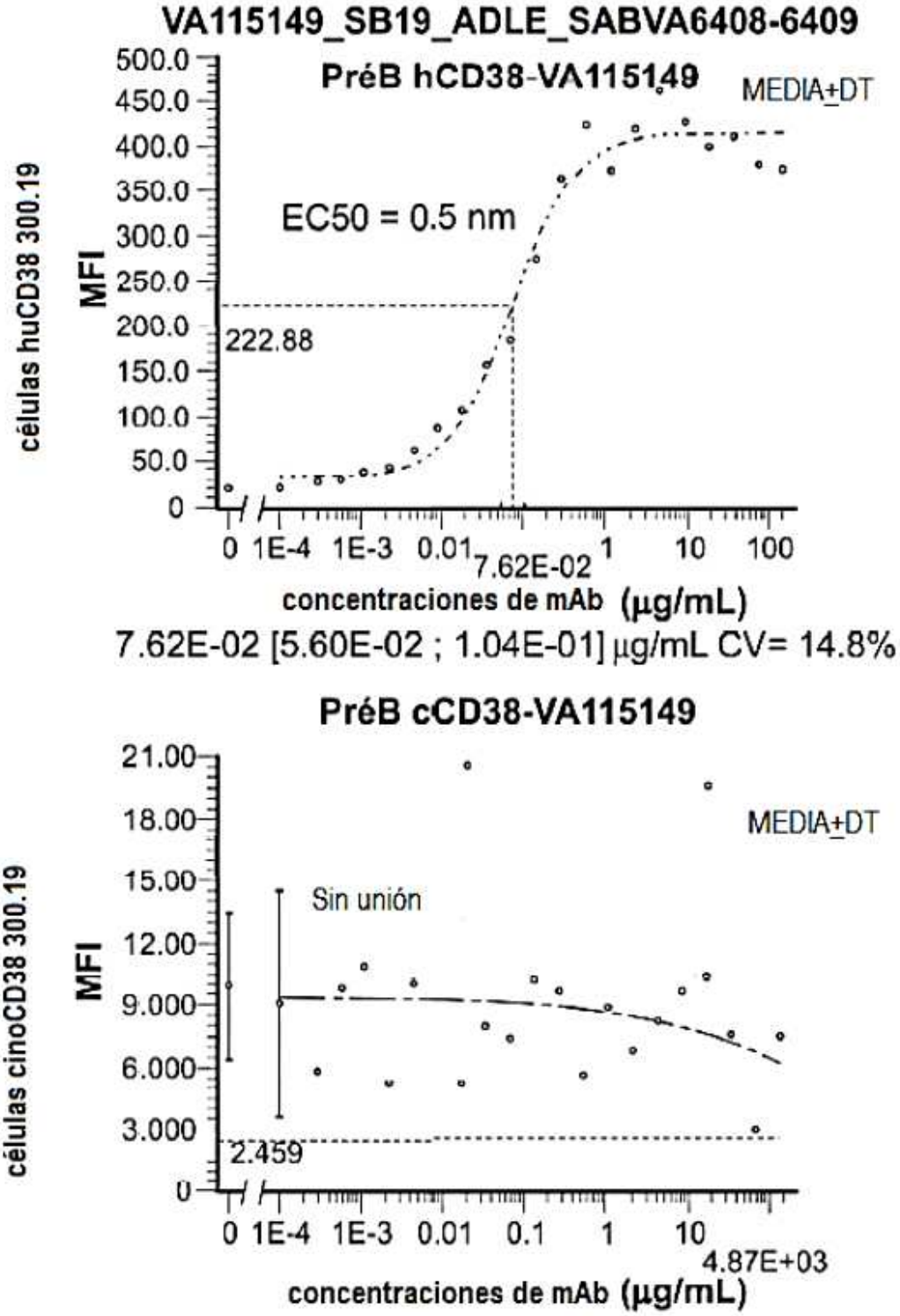

VA115149_SB19_ADLE_SABVA6408-6409
PréB hCD38-VA115149
MEDIA±DT
células huCD38 300.19
MFI
EC50 = 0.5 nm
222.88
500.0
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 7.62E-02 1 10 100
concentraciones de mAb (µg/mL)
7.62E-02 [5.60E-02 ; 1.04E-01] µg/mL CV= 14.8%
PréB cCD38-VA115149
MEDIA±DT
células cinoCD38 300.19
MFI
Sin unión
2.459
21.00
18.00
15.00
12.00
9.000
6.000
3.000
0
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 4.87E+03
concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 6A (Cont.)

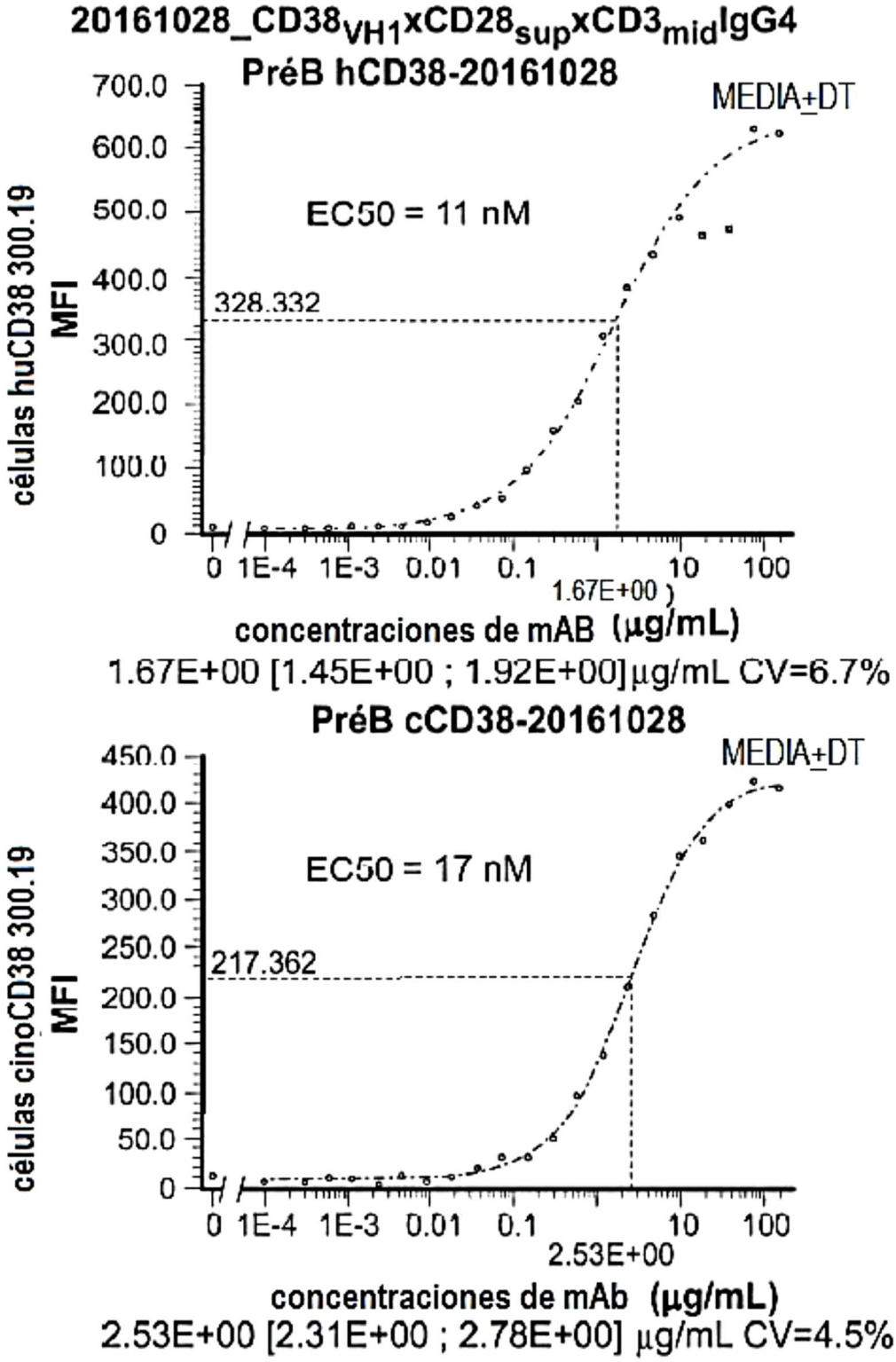
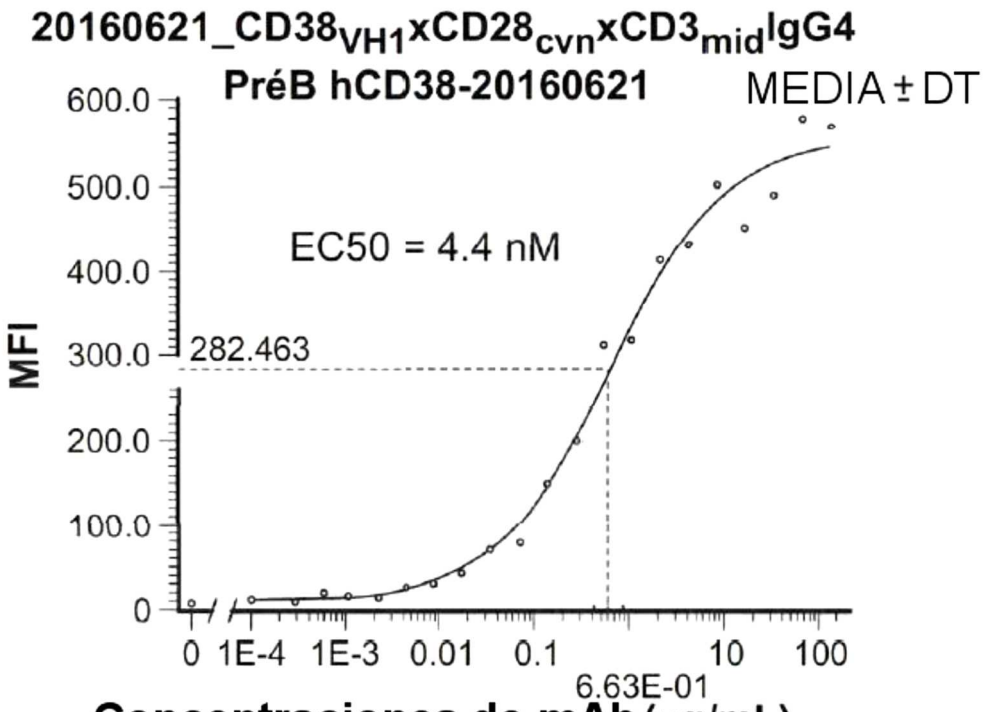

20161028_CD38VH1xCD28supxCD3midIgG4
PréB hCD38-20161028
MEDIA+DT
EC50 = 11 nM
328.332
células huCD38 300.19 MFI
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1.67E+00 10 100
concentraciones de mAB (µg/mL)
1.67E+00 [1.45E+00 ; 1.92E+00]µg/mL CV=6.7%
PréB cCD38-20161028
MEDIA+DT
EC50 = 17 nM
217.362
células cinoCD38 300.19 MFI
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 2.53E+00 10 100
concentraciones de mAb (µg/mL)
2.53E+00 [2.31E+00 ; 2.78E+00] µg/mL CV=4.5%

FIG. 6B


20160621_CD38VH1xCD28cvnxCD3midIgG4
PréB hCD38-20160621
MEDIA ± DT
EC50 = 4.4 nM
MFI
282.463
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 10 100
6.63E-01
Concentraciones de mAb (µg/mL)
6.63E-01[4.67E-01 ; 9.42E-01] µg/mL CV=16.9%

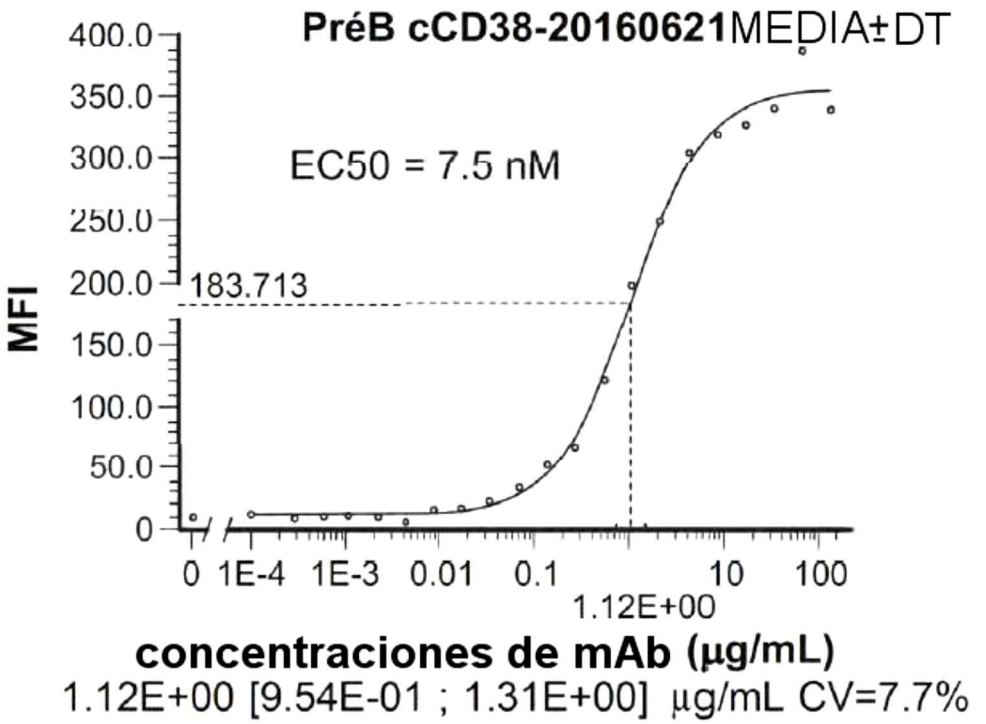

PréB cCD38-20160621MEDIA±DT
EC50 = 7.5 nM
MFI
183.713
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 10 100
1.12E+00
concentraciones de mAb (µg/mL)
1.12E+00 [9.54E-01 ; 1.31E+00] µg/mL CV=7.7%

FIG. 6C

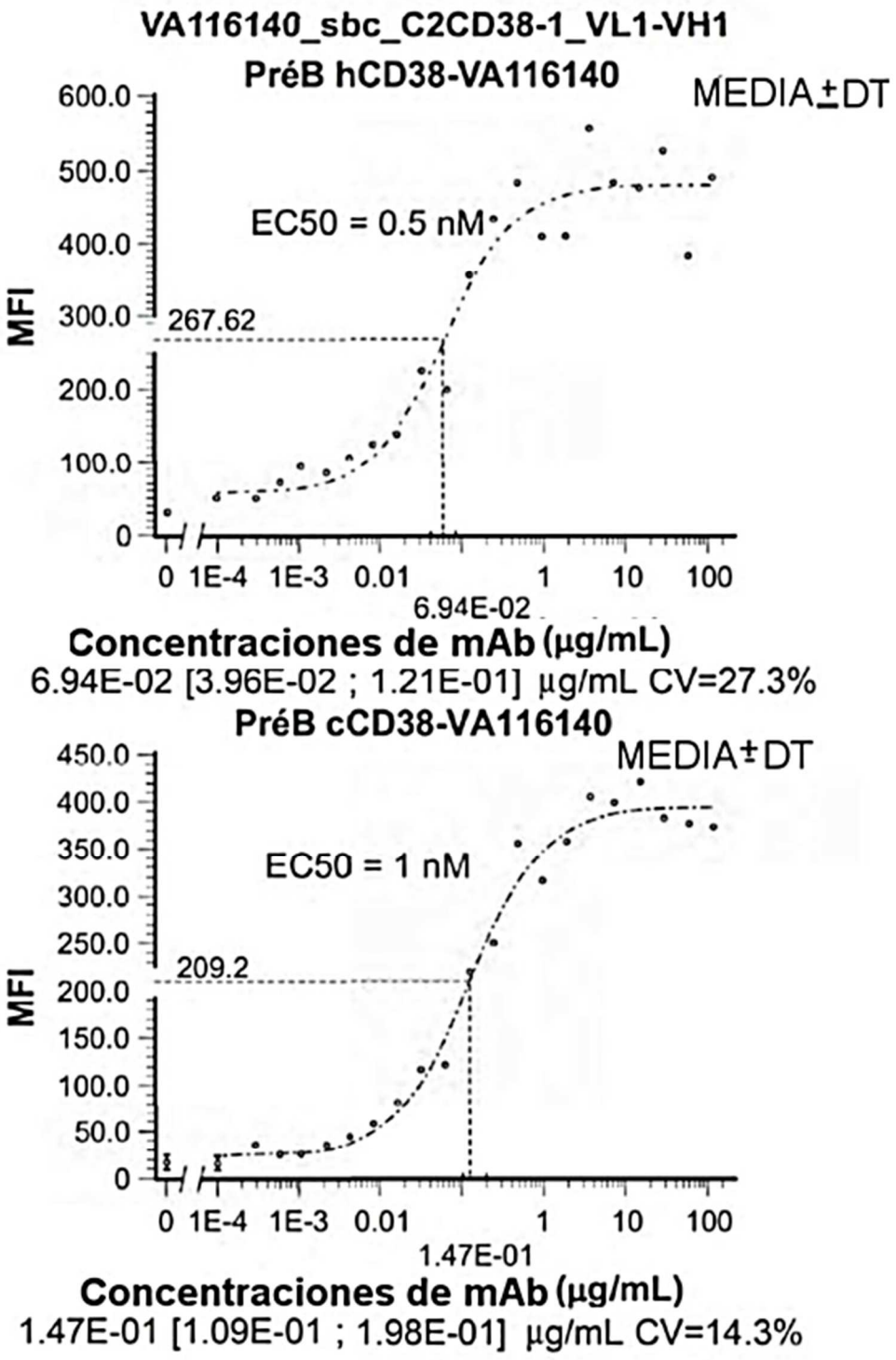

VA116140_sbc_C2CD38-1_VL1-VH1
PréB hCD38-VA116140
MEDIA±DT
EC50 = 0.5 nM
267.62
MFI
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 1 10 100
6.94E-02
Concentraciones de mAb (µg/mL)
6.94E-02 [3.96E-02 ; 1.21E-01] µg/mL CV=27.3%
PréB cCD38-VA116140
MEDIA±DT
EC50 = 1 nM
209.2
MFI
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
0 1E-4 1E-3 0.01 1 10 100
1.47E-01
Concentraciones de mAb (µg/mL)
1.47E-01 [1.09E-01 ; 1.98E-01] µg/mL CV=14.3%

FIG. 6D

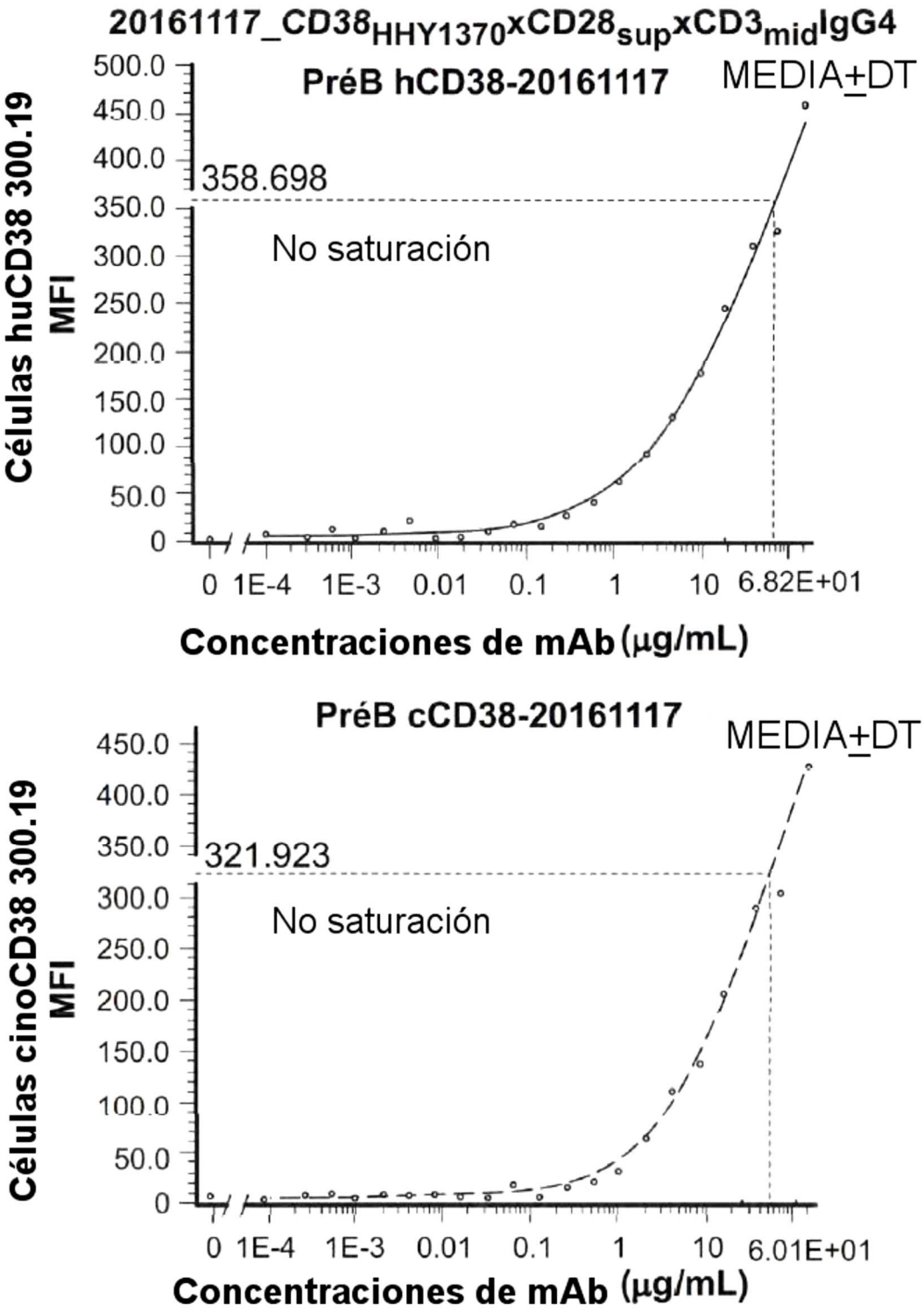
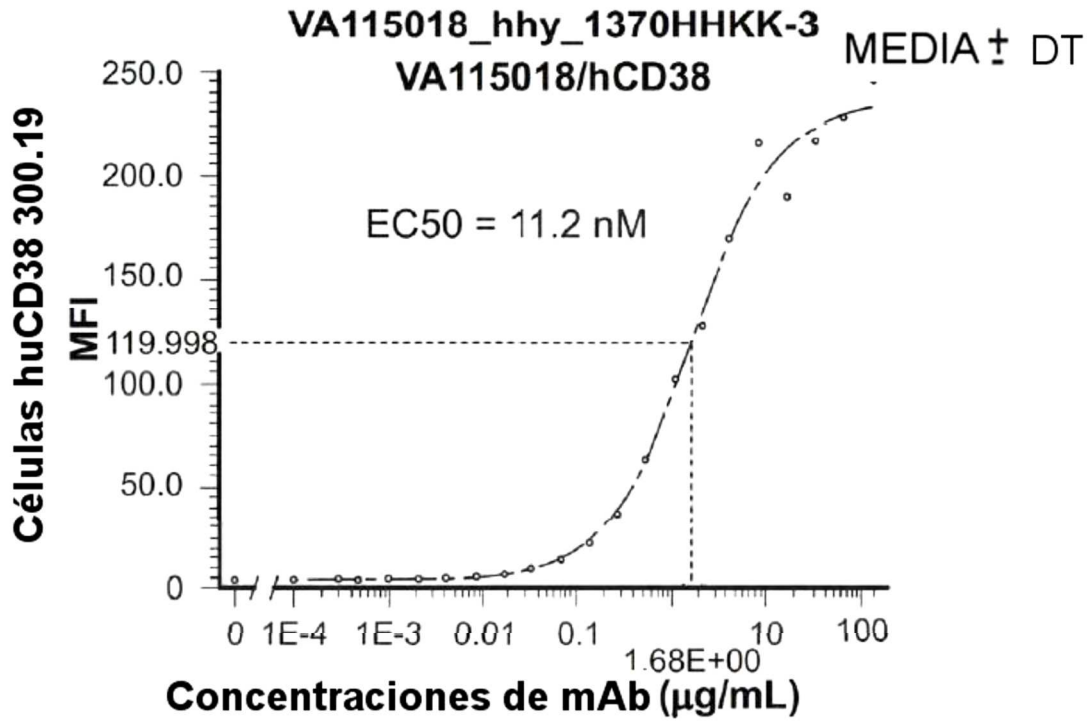
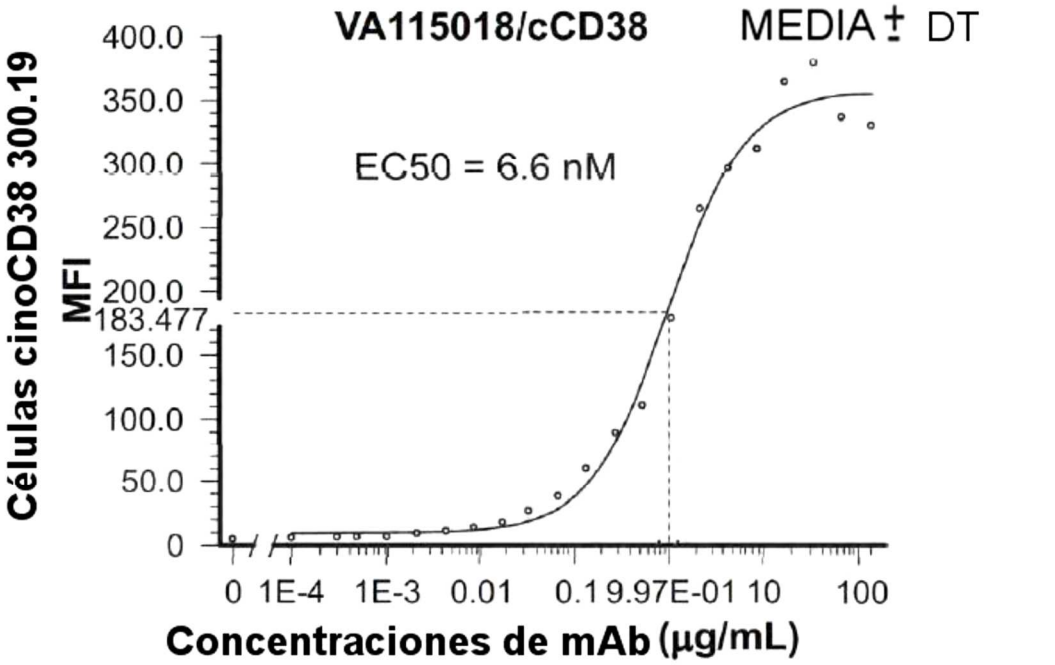

20161117_CD38HHY1370xCD28supxCD3midIgG4
PréB hCD38-20161117
MEDIA±DT
Células huCD38 300.19 MFI
500.0
450.0
400.0
358.698
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
No saturación
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 6.82E+01
Concentraciones de mAb (µg/mL)
PréB cCD38-20161117
MEDIA±DT
Células cinoCD38 300.19 MFI
450.0
400.0
350.0
321.923
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
No saturación
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 6.01E+01
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 6E



1.68E+00 [1.34E+00 ; 2.10E+00] µg/mL CV=10.7%



9.97E-01[7.99E-01 ; 1.24E+00] µg/mL CV=10.6%

FIG. 6E (Cont.)

TsAbs	[1] Valor KD frente a proteína rec. por SPR (nM)	[2] Valor KD aparente frente a células rec. por FACS (Nm)
$CD38_{SB19}CD28_{sup}CD3_{mid}$	2	4
$CD38_{VH1}CD28_{sup}CD3_{mid/low}$	4/6	11
$CD38_{VH1}CD28_{cvn}CD3_{mid/low}$	4/6	4.4
$CD38_{HHY1370}CD28_{sup}CD3_{mid}$	1	no se pudo estimar un valor de EC50 preciso (no saturación)

FIG. 6F

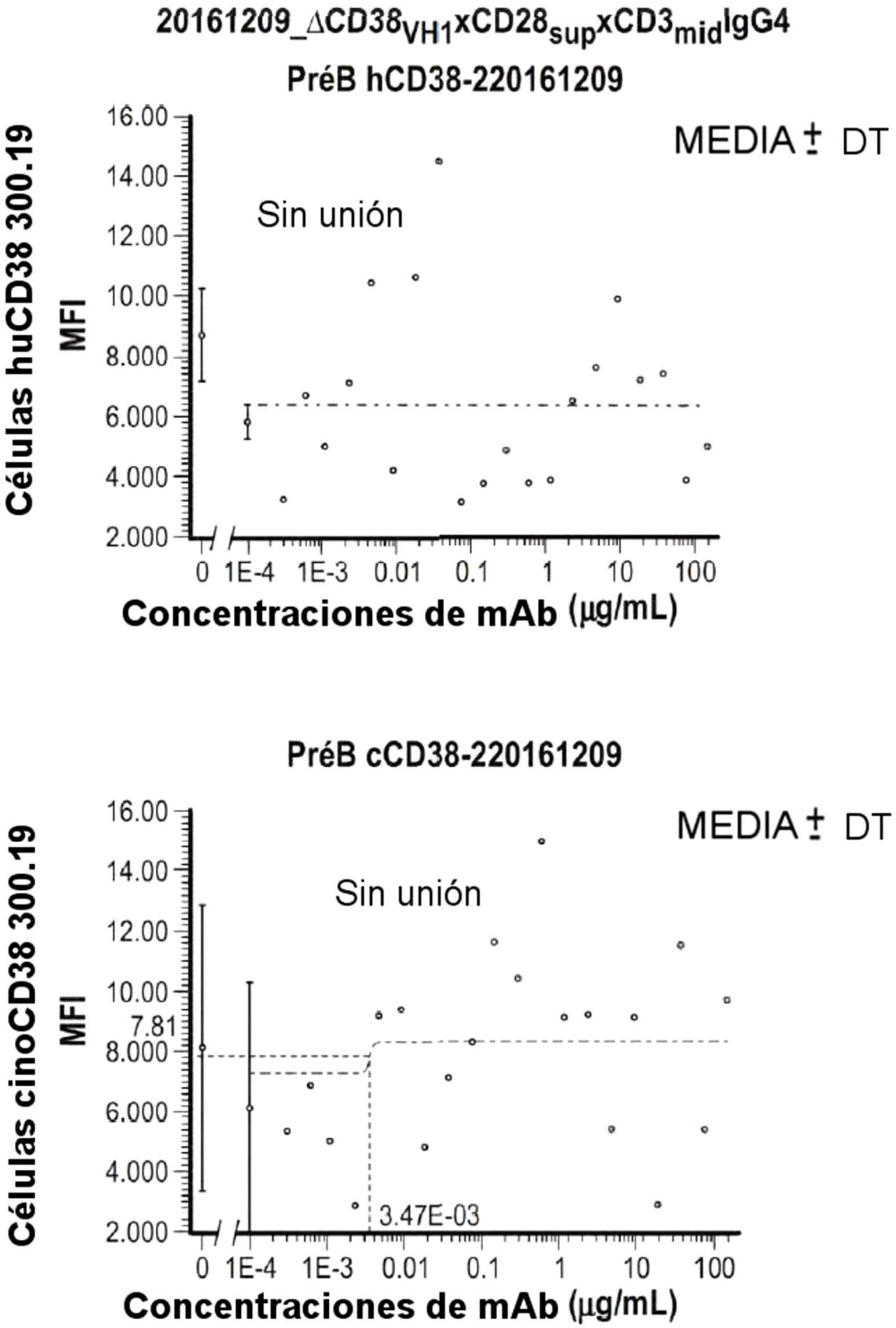

20161209_ΔCD38VH1xCD28supxCD3midIgG4
PréB hCD38-220161209
MEDIA ± DT
Sin unión
Células huCD38 300.19
MFI
16.00
14.00
12.00
10.00
8.000
6.000
4.000
2.000
0
1E-4
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
Concentraciones de mAb (µg/mL)
PréB cCD38-220161209
MEDIA ± DT
Sin unión
Células cinoCD38 300.19
MFI
7.81
3.47E-03
Concentraciones de mAb (µg/mL)

FIG. 6G

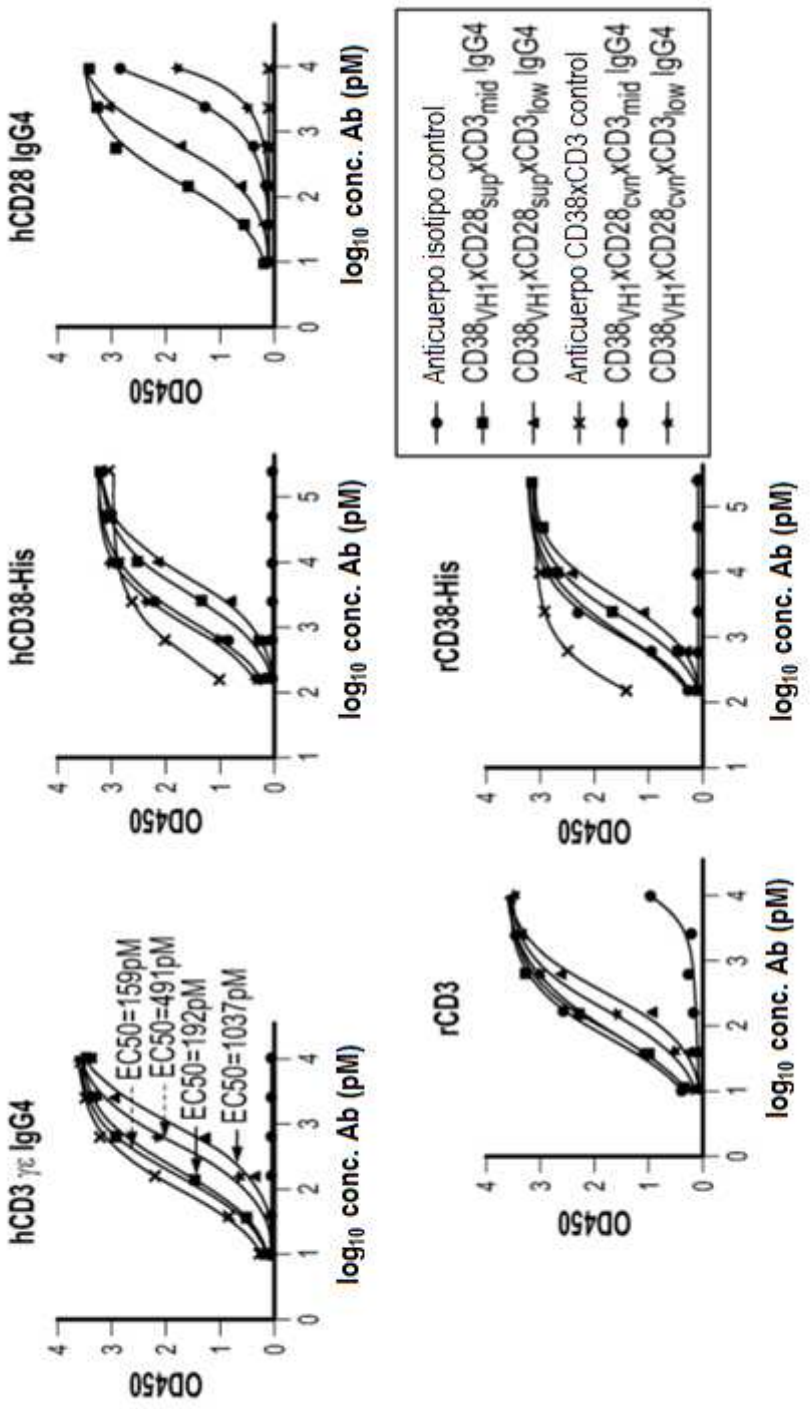

hCD3 γε IgG4
EC50=159pM
EC50=491pM
EC50=192pM
EC50=1037pM
hCD38-His
hCD28 IgG4
rCD3
rCD38-His
OD450
log10 conc. Ab (pM)
Anticuerpo isotipo control
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28supxCD3low IgG4
Anticuerpo CD38xCD3 control
CD38VH1xCD28cvnxCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cvnxCD3low IgG4

FIG. 7A

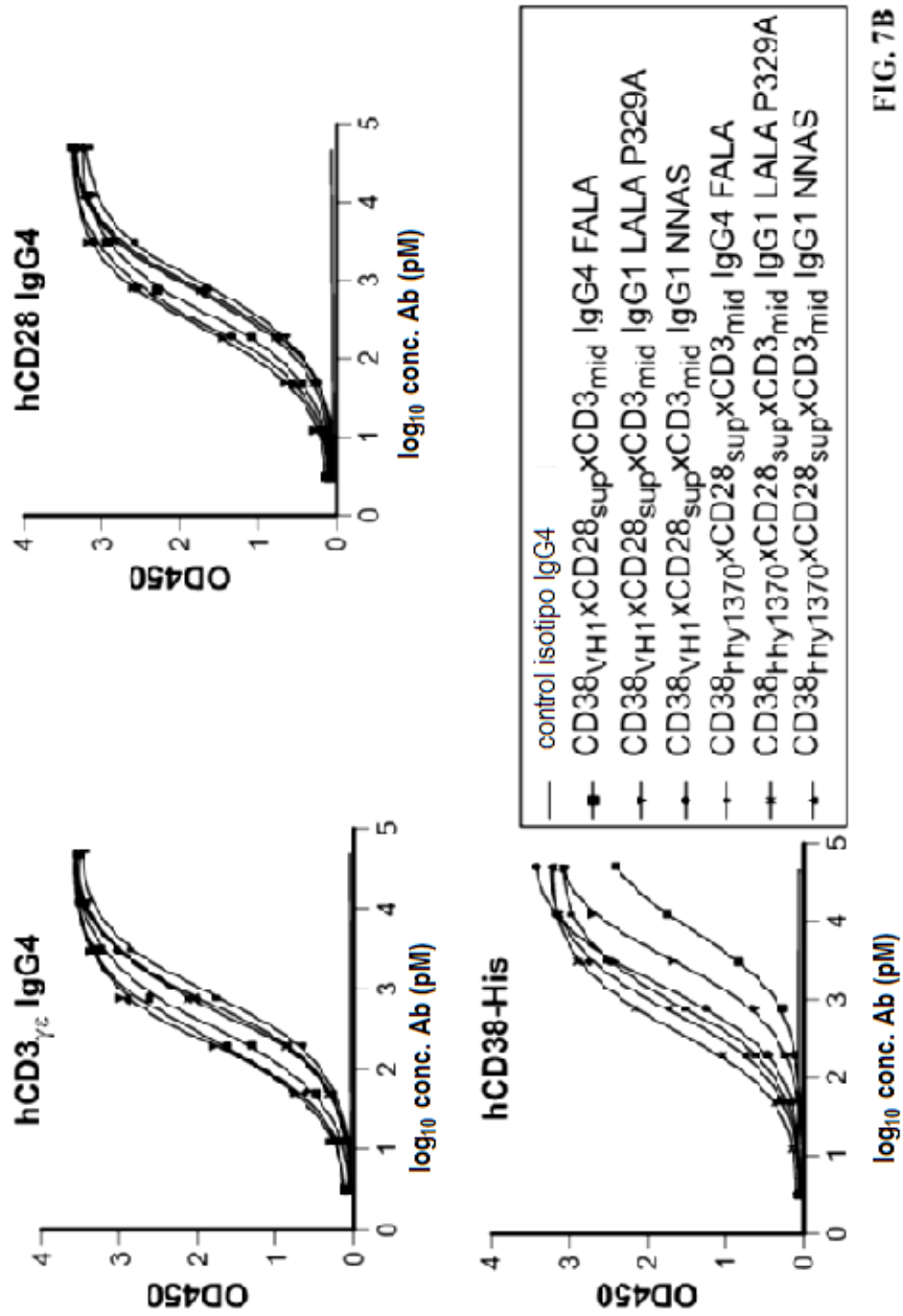

hCD28 IgG4
hCD3γε IgG4
hCD38-His
OD450
log10 conc. Ab (pM)
control isotipo IgG4
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS
CD38Hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38Hhy1370xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38Hhy1370xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS

FIG. 7B

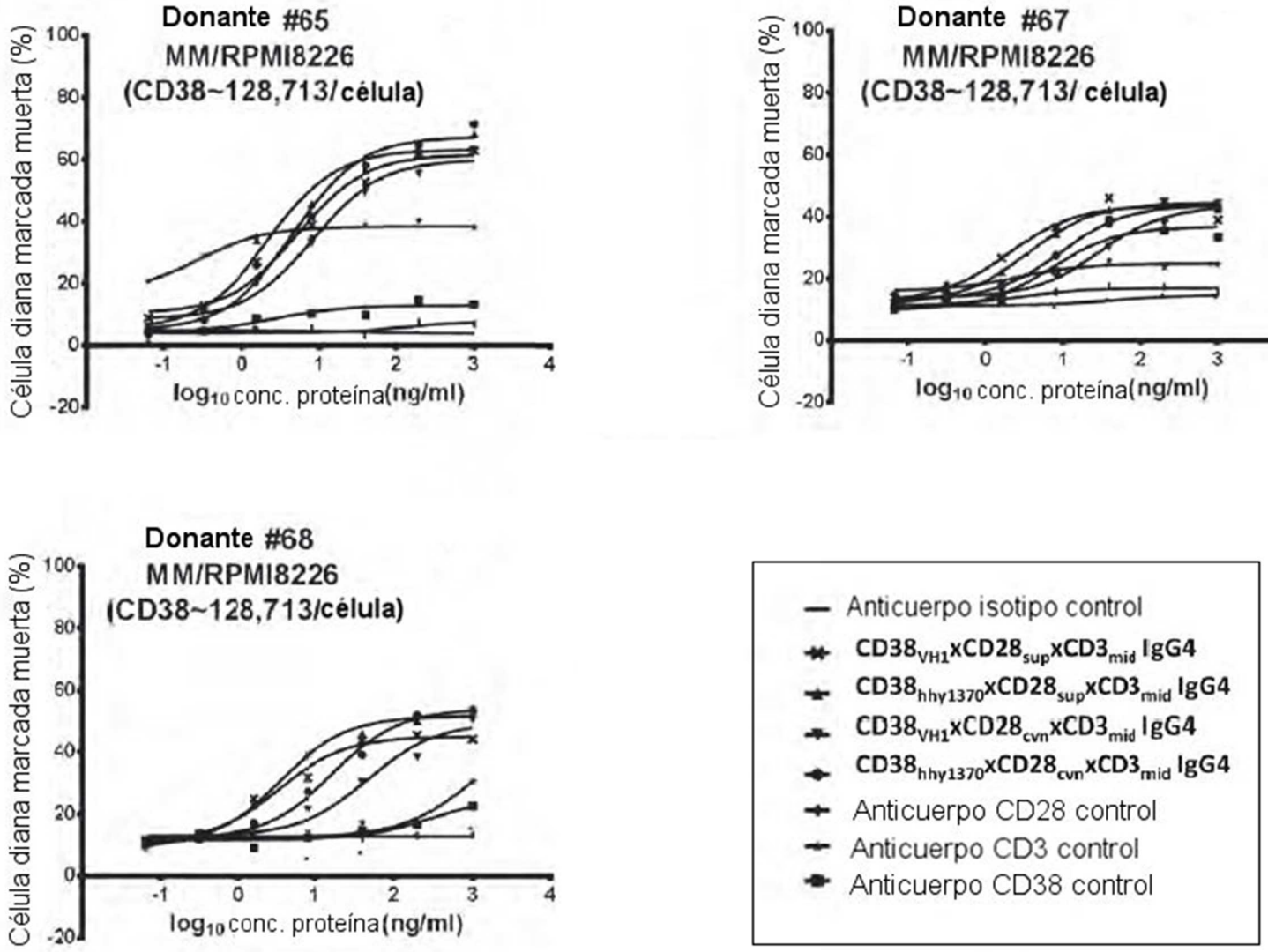

Donante #65
MM/RPMI8226
(CD38~128,713/célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(ng/ml)
Donante #67
MM/RPMI8226
(CD38~128,713/ célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(ng/ml)
Donante #68
MM/RPMI8226
(CD38~128,713/célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(ng/ml)
Anticuerpo isotipo control
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cvnxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28cvnxCD3mid IgG4
Anticuerpo CD28 control
Anticuerpo CD3 control
Anticuerpo CD38 control

FIG. 8A

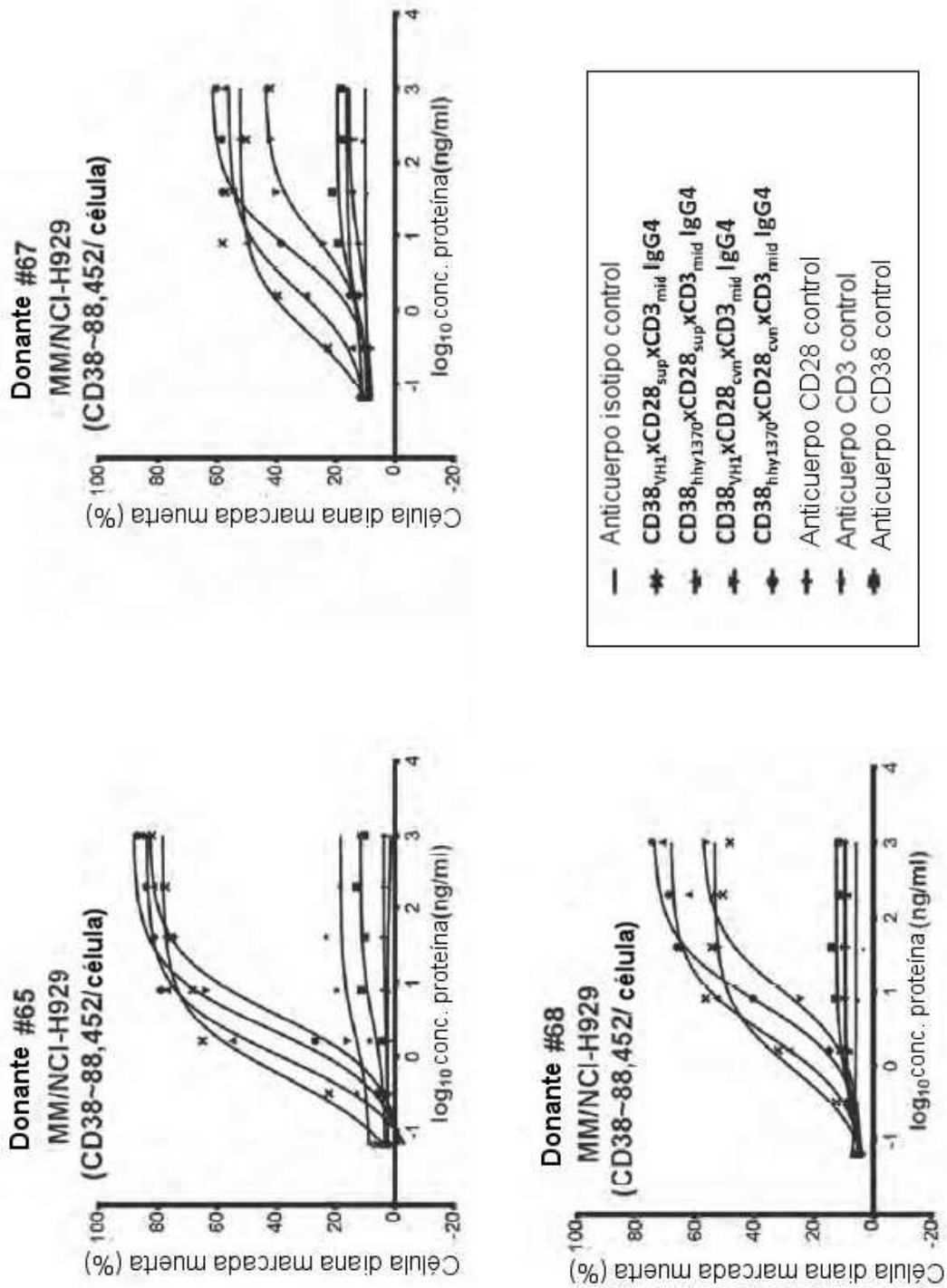

Donante #67
MM/NCI-H929
(CD38~88,452/ célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(ng/ml)
Donante #65
MM/NCI-H929
(CD38~88,452/célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(ng/ml)
Donante #68
MM/NCI-H929
(CD38~88,452/ célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína (ng/ml)
Anticuerpo isotipo control
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cvnxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28cvnxCD3mid IgG4
Anticuerpo CD28 control
Anticuerpo CD3 control
Anticuerpo CD38 control

FIG. 8B

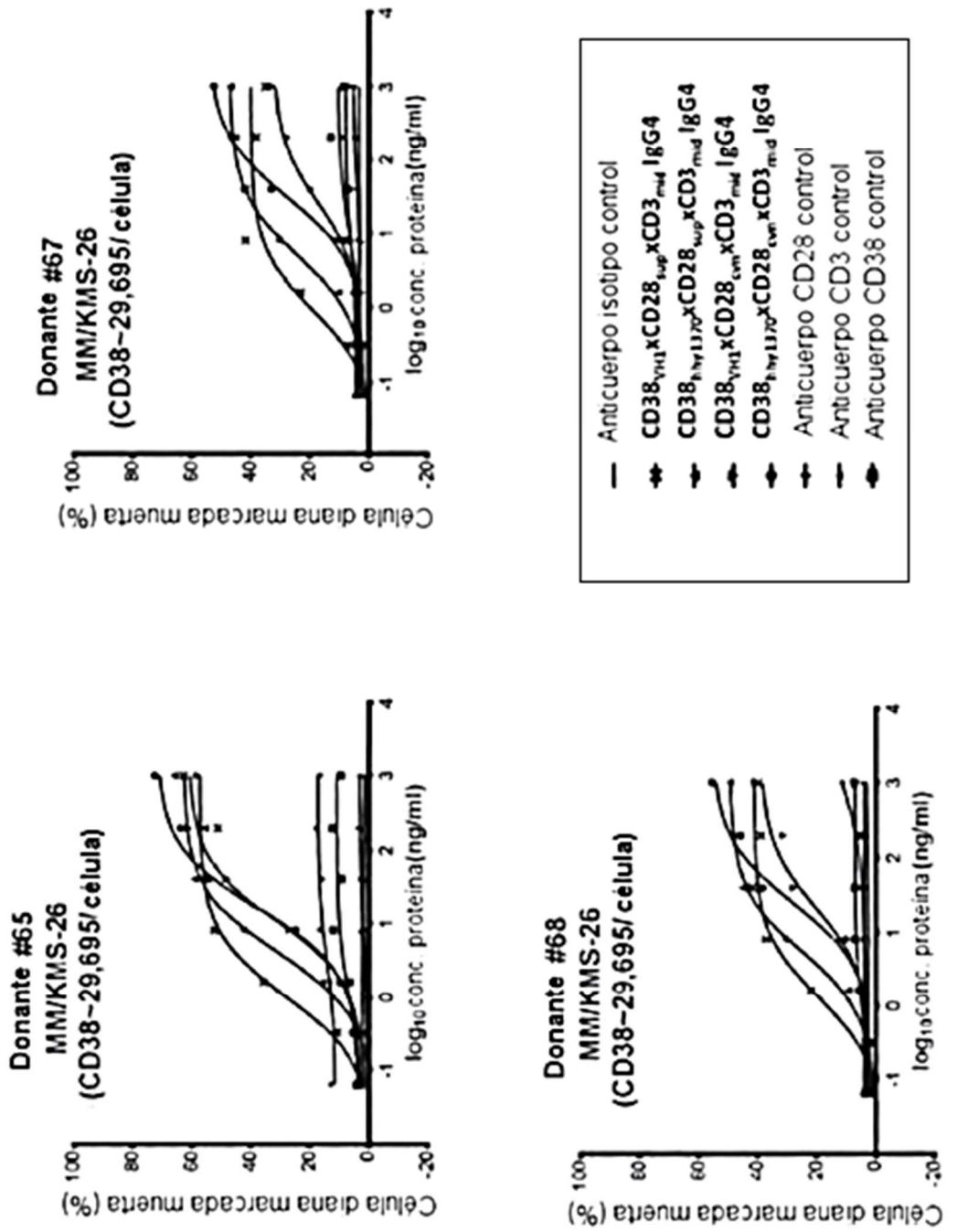

Donante #65
MM/KMS-26
(CD38~29,695/ célula)
Donante #67
MM/KMS-26
(CD38~29,695/ célula)
Donante #68
MM/KMS-26
(CD38~29,695/ célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10conc. proteína(ng/ml)
Anticuerpo isotipo control
CD38VH1xCD28sup xCD3mid IgG4
CD38hyU32xCD28sup xCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cen xCD3mid IgG4
CD38hyU32xCD28cen xCD3mid IgG4
Anticuerpo CD28 control
Anticuerpo CD3 control
Anticuerpo CD38 control

FIG. 8C

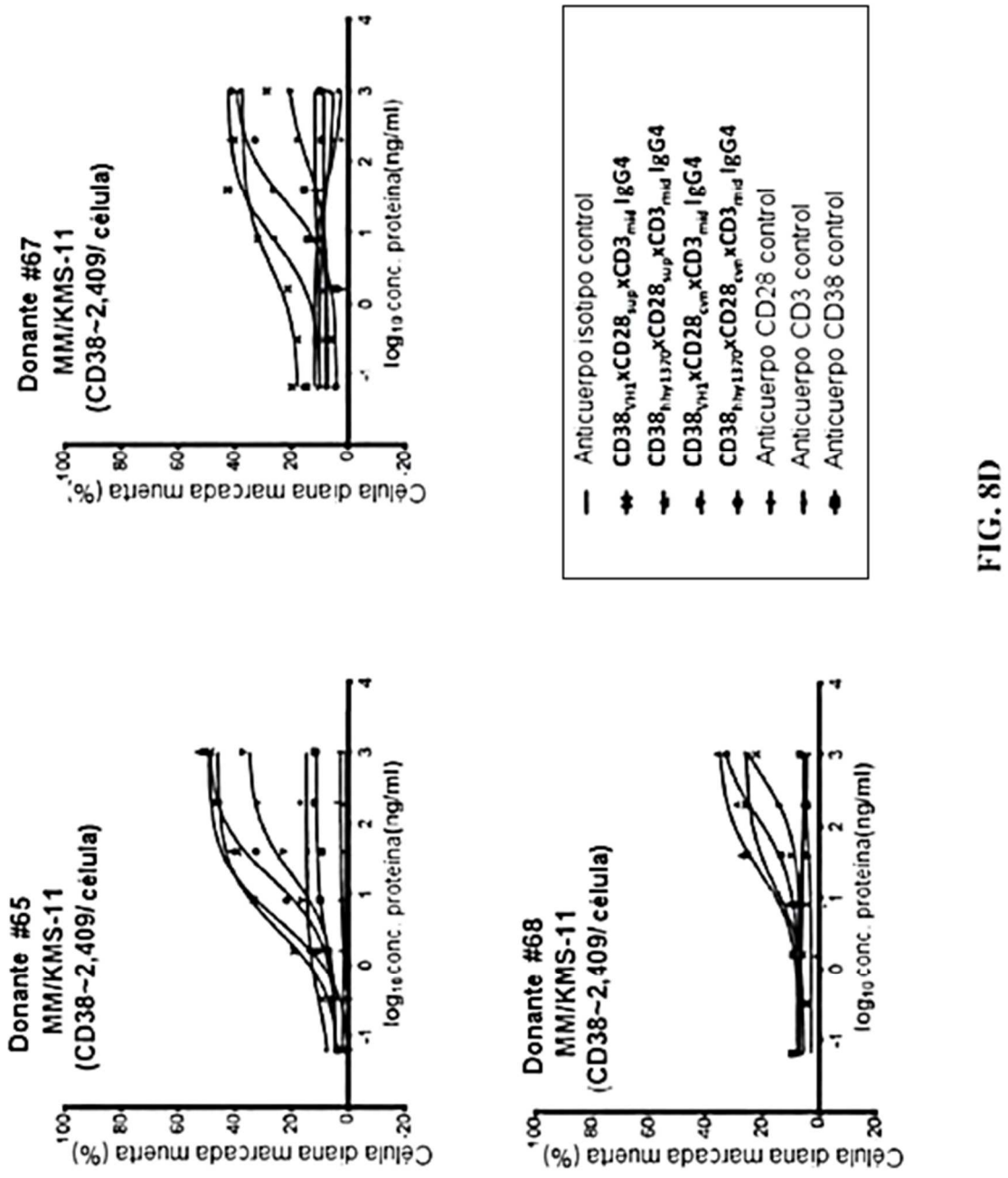

Donante #65
MM/KMS-11
(CD38~2,409/ célula)
Donante #67
MM/KMS-11
(CD38~2,409/ célula)
Donante #68
MM/KMS-11
(CD38~2,409/ célula)
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(ng/ml)
Anticuerpo isotipo control
CD38VH1xCD28sup xCD3mid IgG4
CD38hu11B7xCD28sup xCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cen xCD3mid IgG4
CD38hu11B7xCD28cen xCD3mid IgG4
Anticuerpo CD28 control
Anticuerpo CD3 control
Anticuerpo CD38 control

FIG. 8D

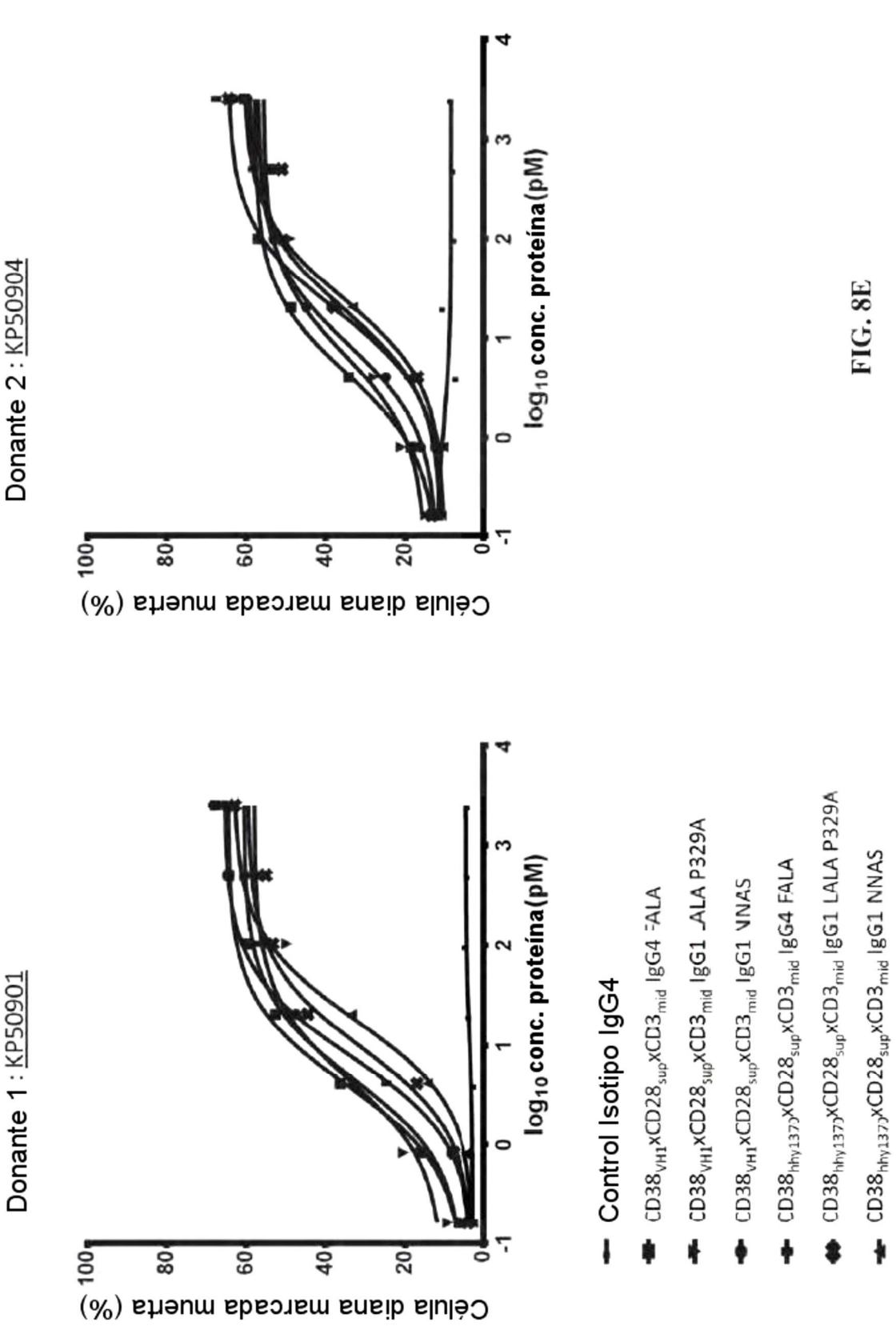

Donante 1 : KP50901
Donante 2 : KP50904
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína(pM)
Control Isotipo IgG4
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS
CD38hhy1377xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38hhy1377xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38hhy1377xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS

FIG. 8E

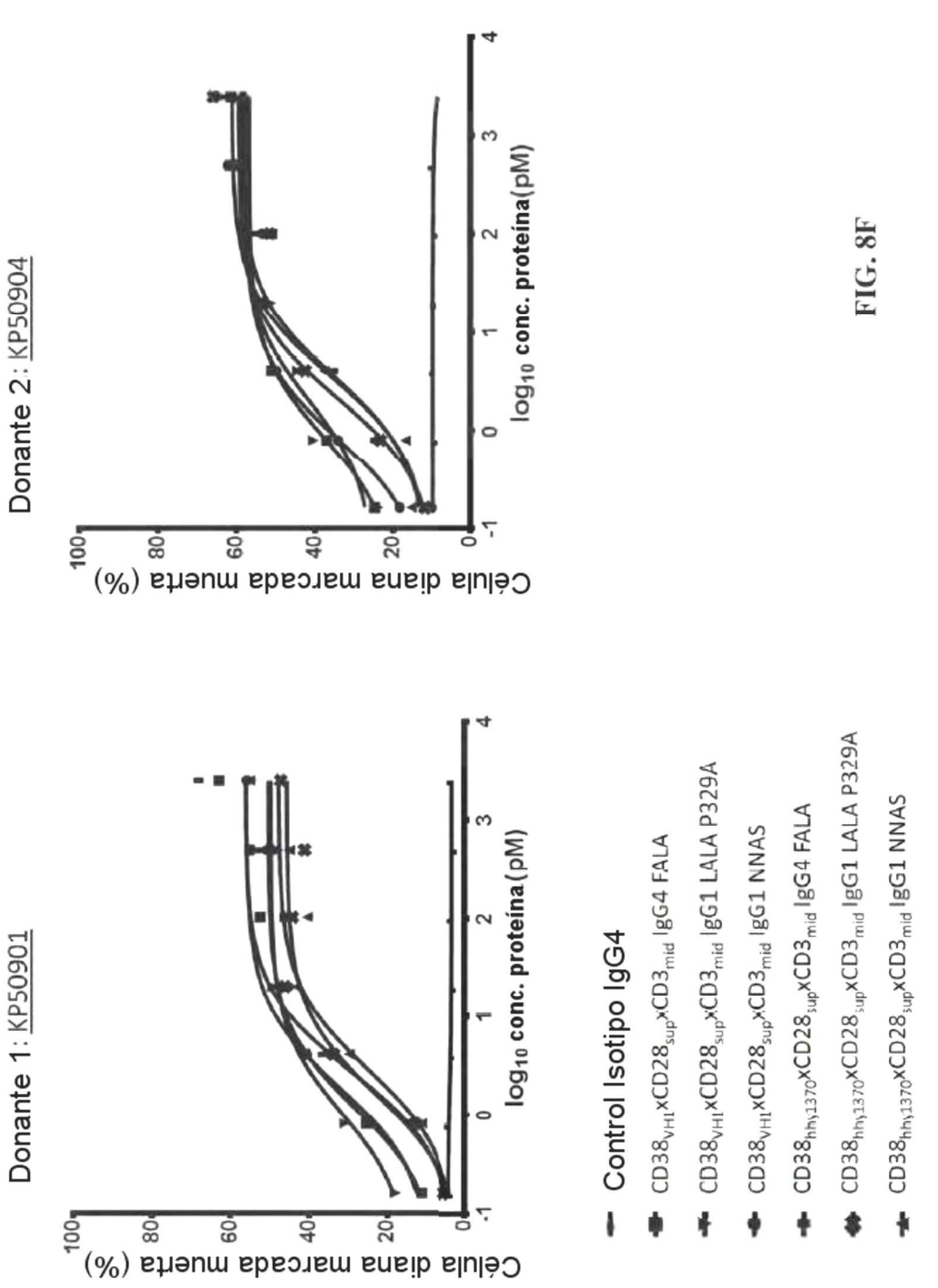

Donante 1: KP50901
Donante 2: KP50904
Célula diana marcada muerta (%)
log10 conc. proteína (pM)
Control Isotipo IgG4
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS
CD38hh1370xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38hh1370xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38hh1370xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS

FIG. 8F

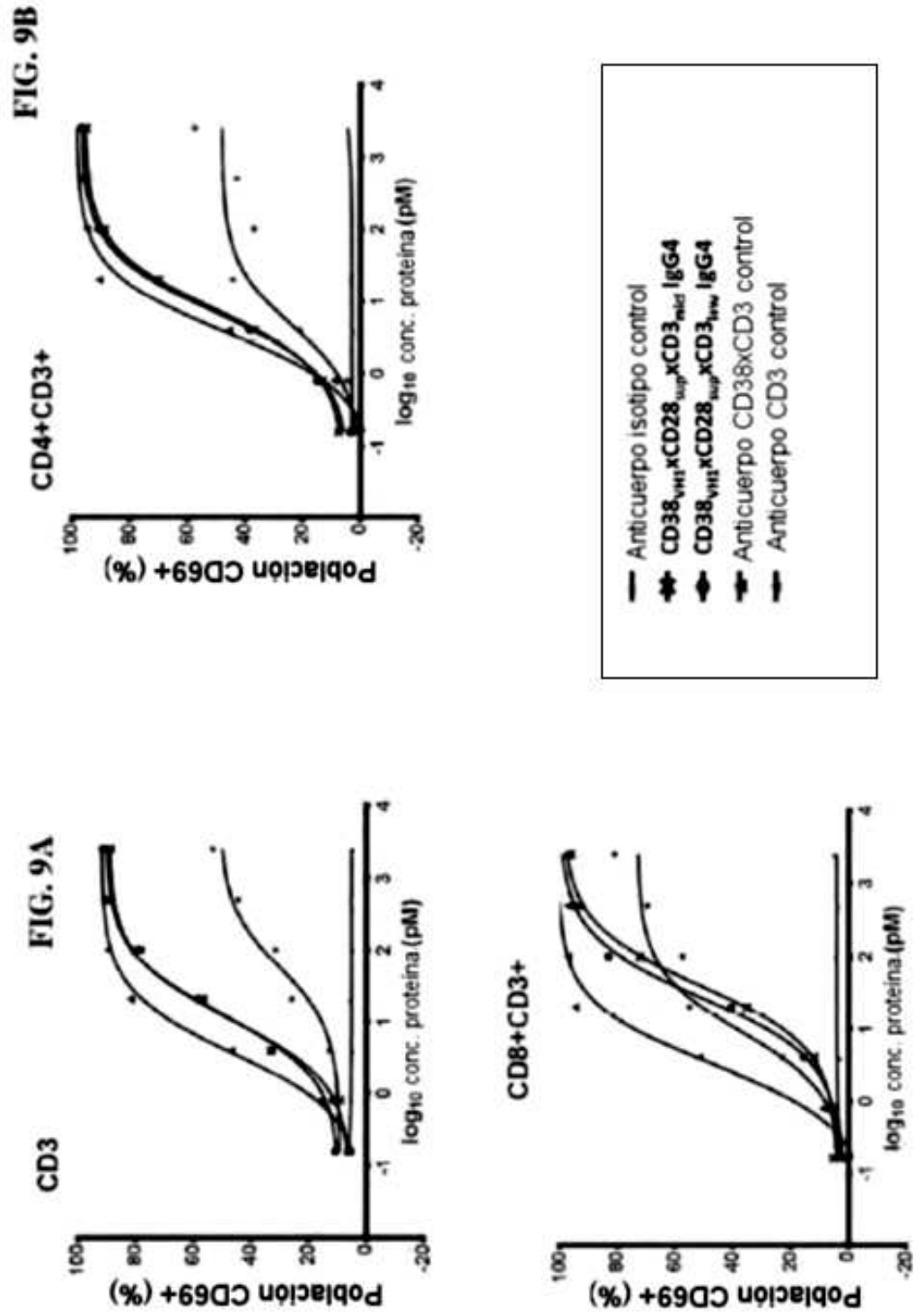

FIG. 9B
CD4+CD3+
Población CD69+ (%)
log10 conc. proteína (pM)
FIG. 9A
CD3
Población CD69+ (%)
log10 conc. proteína (pM)
CD8+CD3+
Población CD69+ (%)
log10 conc. proteína (pM)
Anticuerpo isotipo control
CD38VH3xCD28sup xCD3mAb IgG4
CD38VH3xCD28sup xCD3low IgG4
Anticuerpo CD38xCD3 control
Anticuerpo CD3 control

FIG. 10

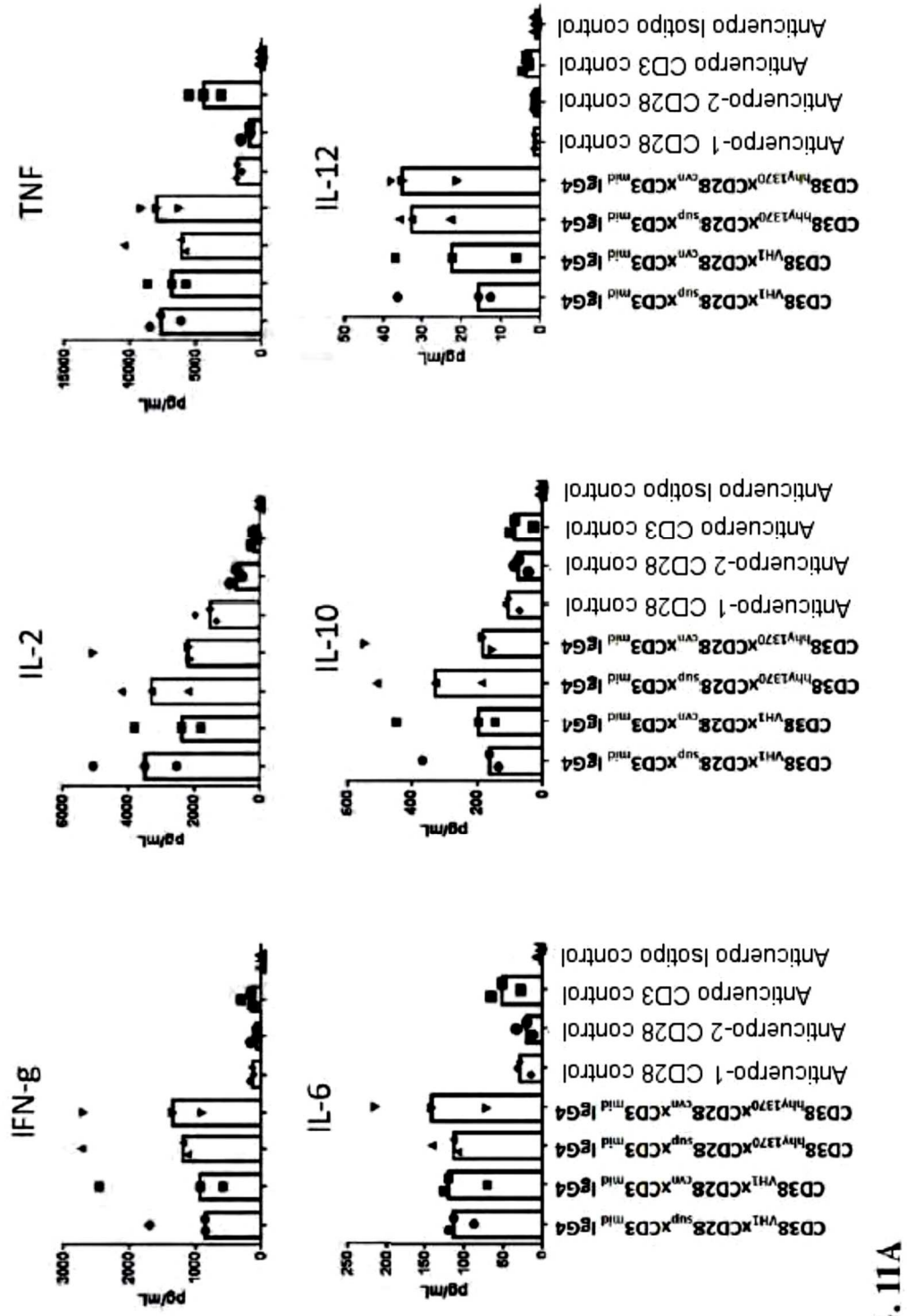

IFN-g
IL-2
IL-10
IL-6
IL-12
TNF
pg/mL
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cynxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28cynxCD3mid IgG4
Anticuerpo-1 CD28 control
Anticuerpo-2 CD28 control
Anticuerpo CD3 control
Anticuerpo Isotipo control

FIG. 11A

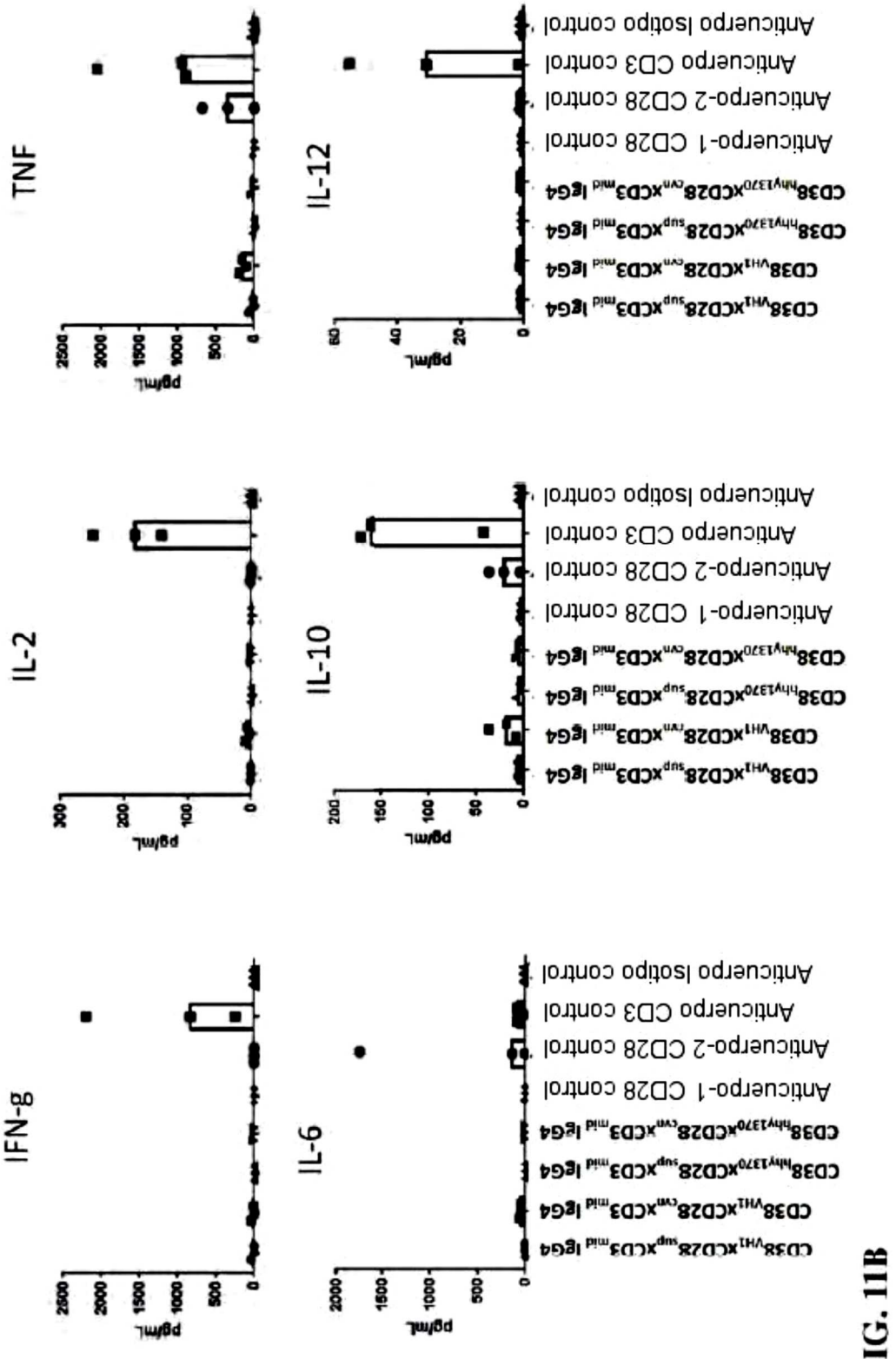

IFN-g
IL-6
IL-2
IL-10
TNF
IL-12
pg/mL
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cynxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28cynxCD3mid IgG4
Anticuerpo-1 CD28 control
Anticuerpo-2 CD28 control
Anticuerpo CD3 control
Anticuerpo Isotipo control

FIG. 11B

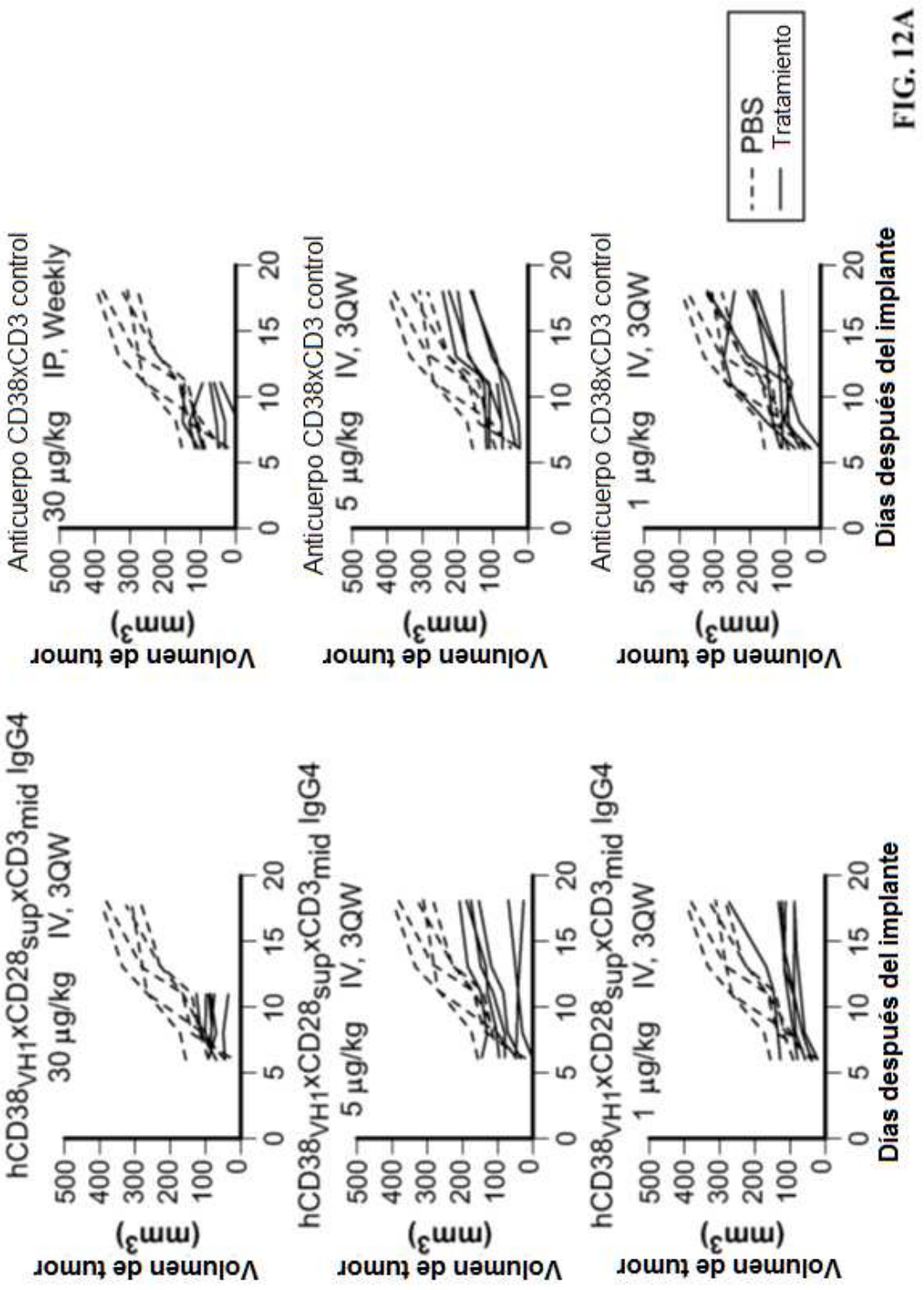

Anticuerpo CD38xCD3 control
30 µg/kg IP, Weekly
Anticuerpo CD38xCD3 control
5 µg/kg IV, 3QW
Anticuerpo CD38xCD3 control
1 µg/kg IV, 3QW
hCD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
30 µg/kg IV, 3QW
hCD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
5 µg/kg IV, 3QW
hCD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4
1 µg/kg IV, 3QW
Volumen de tumor (mm3)
0
100
200
300
400
500
0
5
10
15
20
Días después del implante
PBS
Tratamiento

FIG. 12A

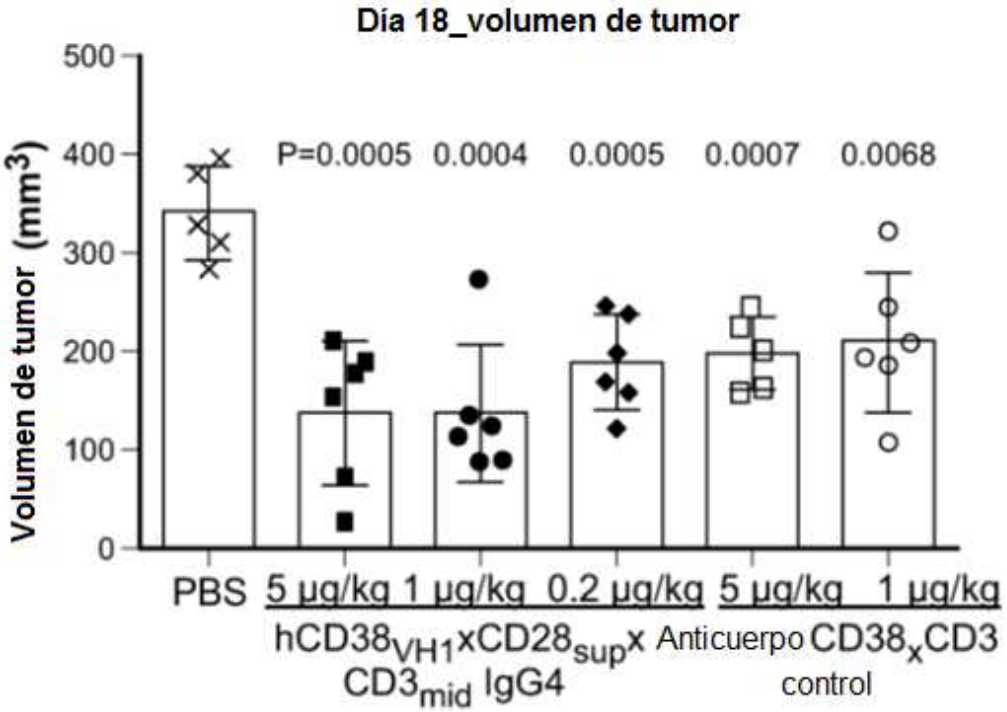


FIG. 12B

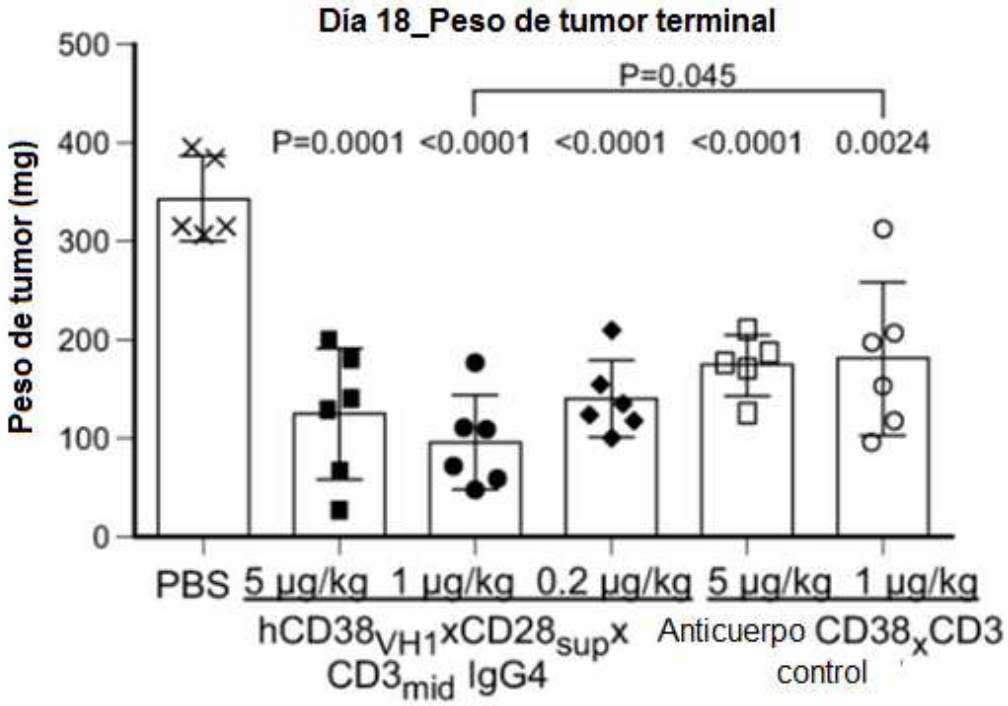


FIG. 12C

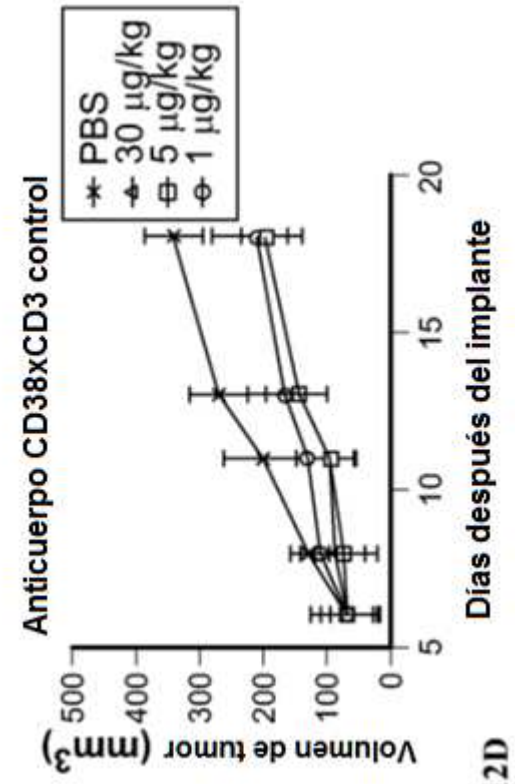
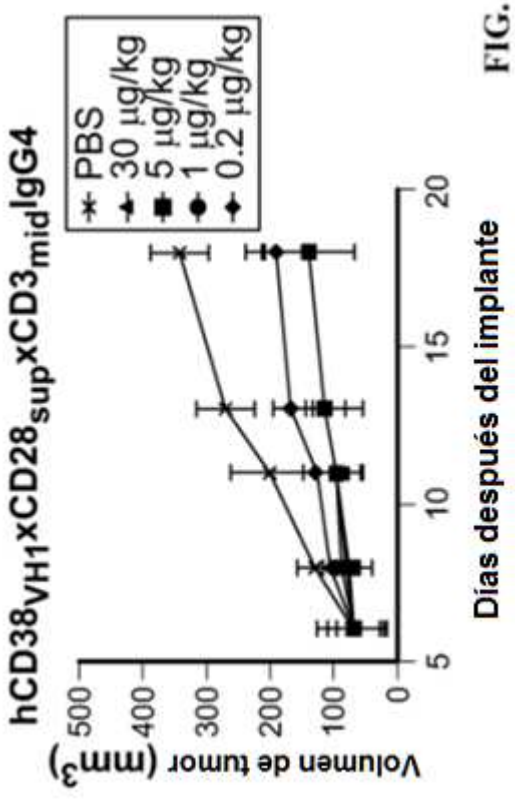
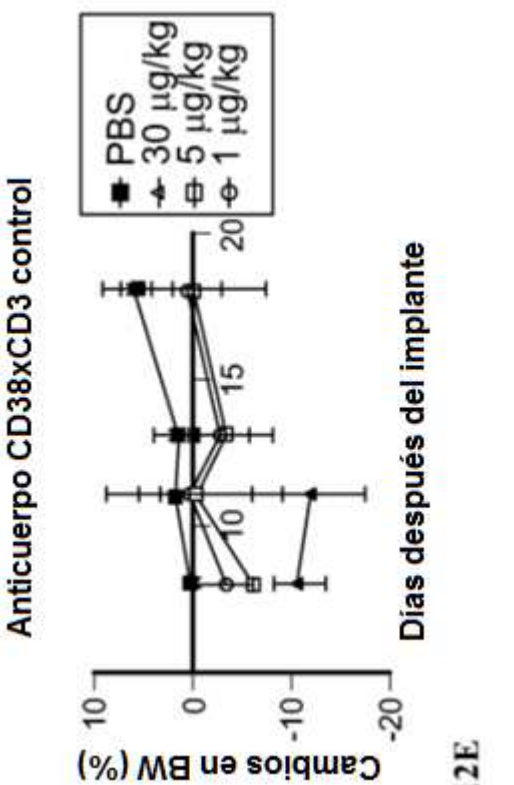


FIG. 12D





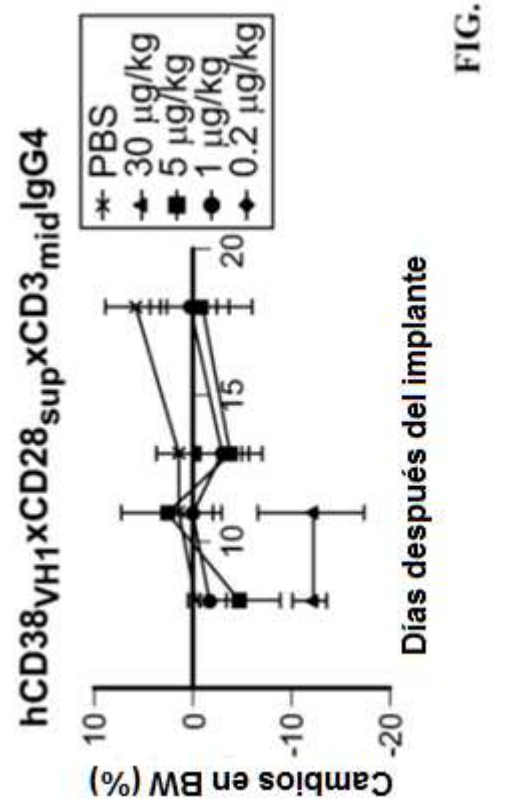


FIG. 12E

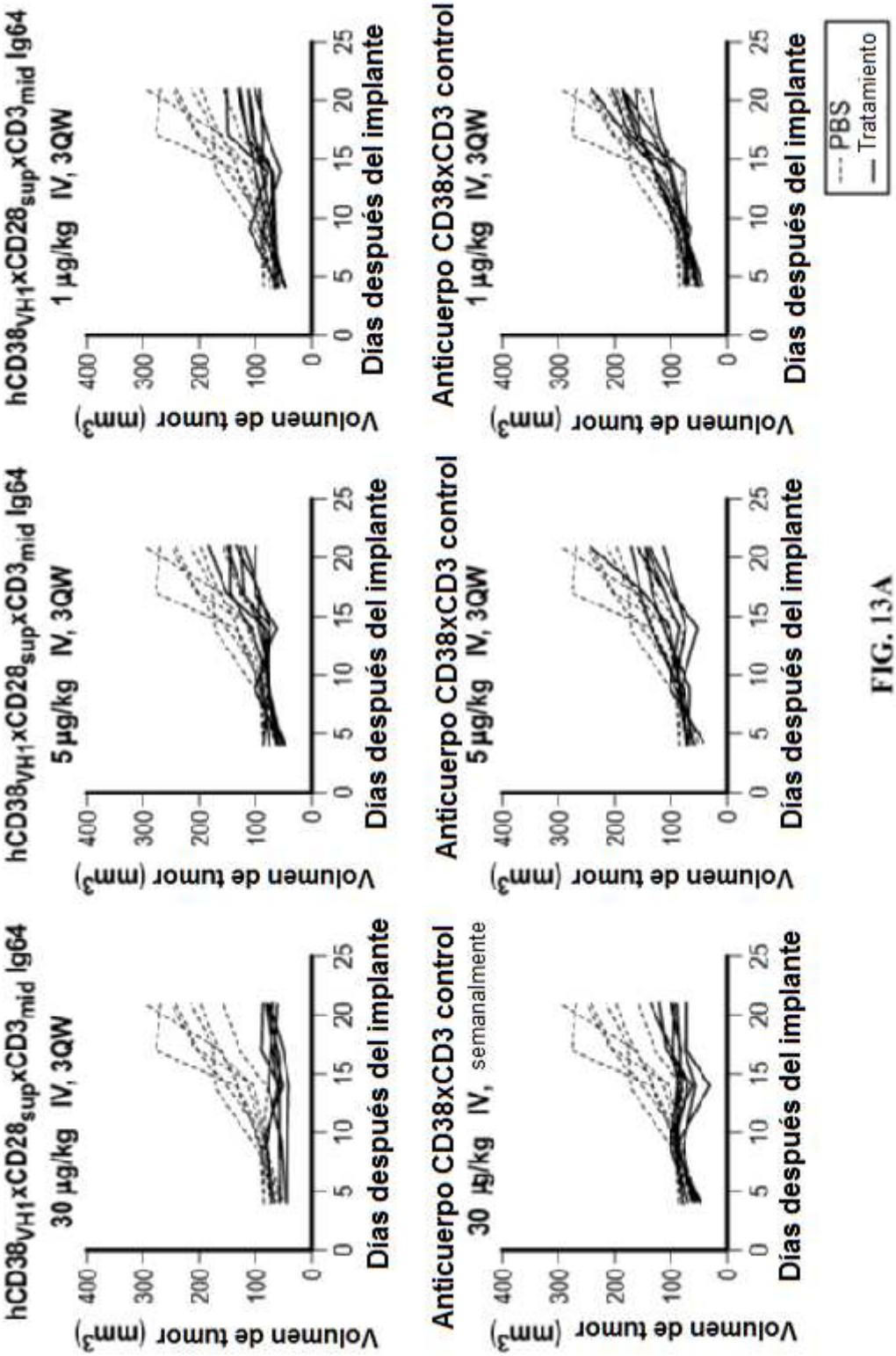

hCD38VH1xCD28supxCD3mid Ig64
30 µg/kg IV, 3QW
hCD38VH1xCD28supxCD3mid Ig64
5 µg/kg IV, 3QW
hCD38VH1xCD28supxCD3mid Ig64
1 µg/kg IV, 3QW
Anticuerpo CD38xCD3 control
30 µg/kg IV, semanalmente
Anticuerpo CD38xCD3 control
5 µg/kg IV, 3QW
Anticuerpo CD38xCD3 control
1 µg/kg IV, 3QW
Volumen de tumor (mm3)
Días después del implante
0
100
200
300
400
0
5
10
15
20
25
PBS
Tratamiento

FIG. 13A

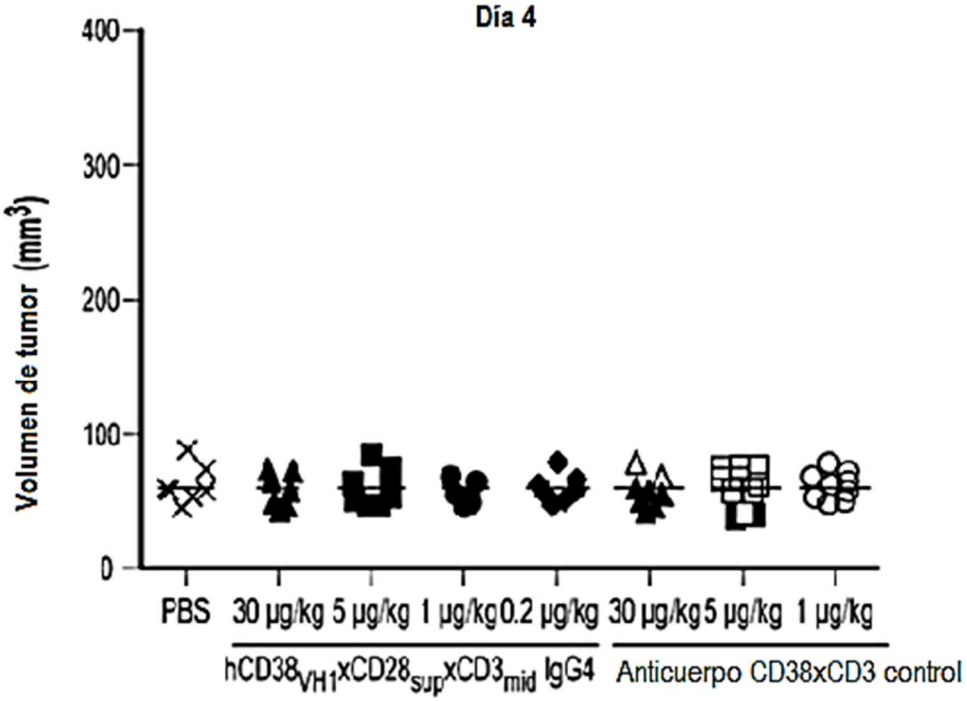


FIG. 13B

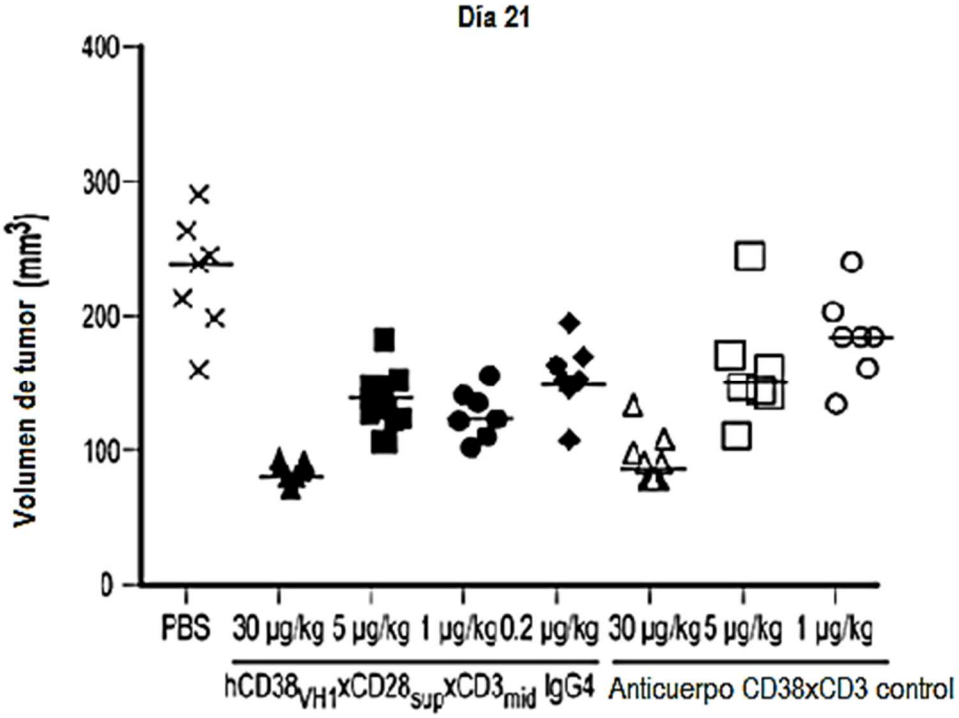


FIG. 13C

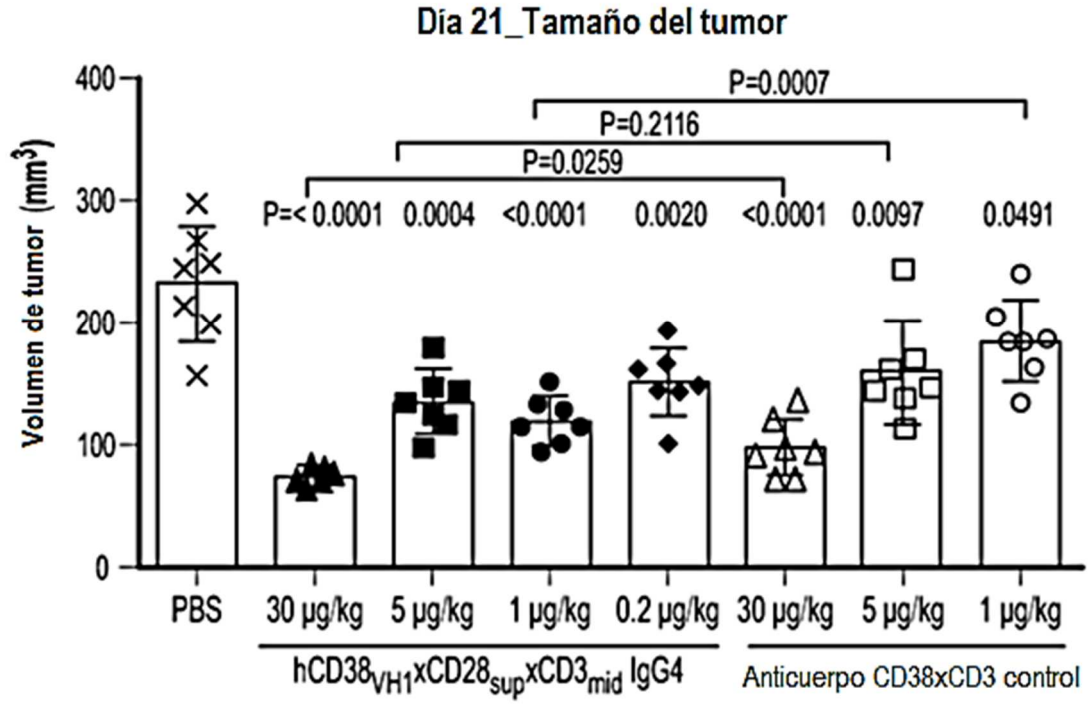


FIG. 13D

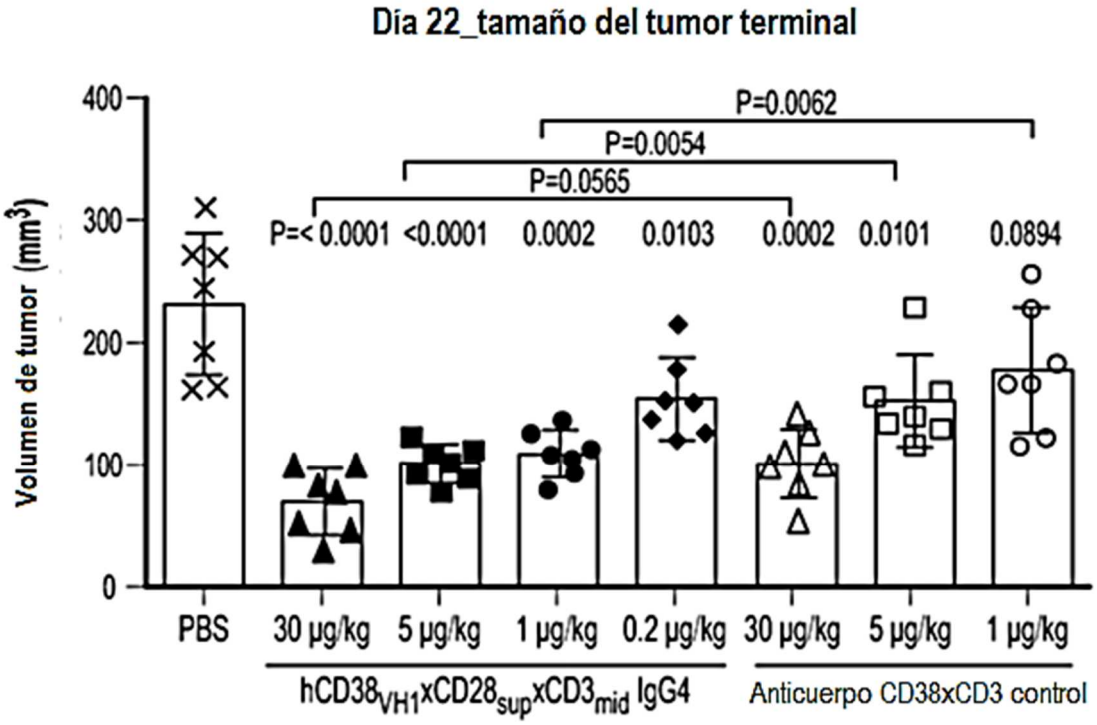


FIG. 13E

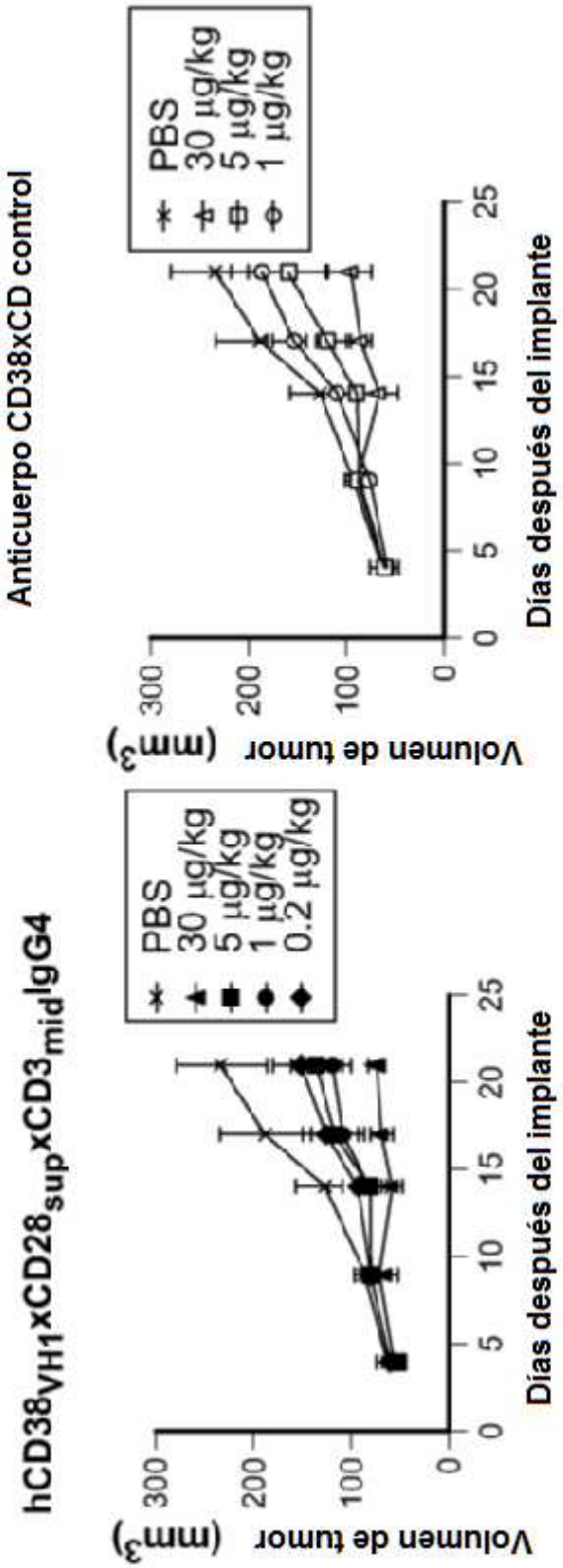

hCD38VH1xCD28supxCD3midIgG4
Anticuerpo CD38xCD control
Volumen de tumor (mm3)
Días después del implante
PBS
30 µg/kg
5 µg/kg
1 µg/kg
0.2 µg/kg
0
100
200
300
0
5
10
15
20
25

FIG. 13F

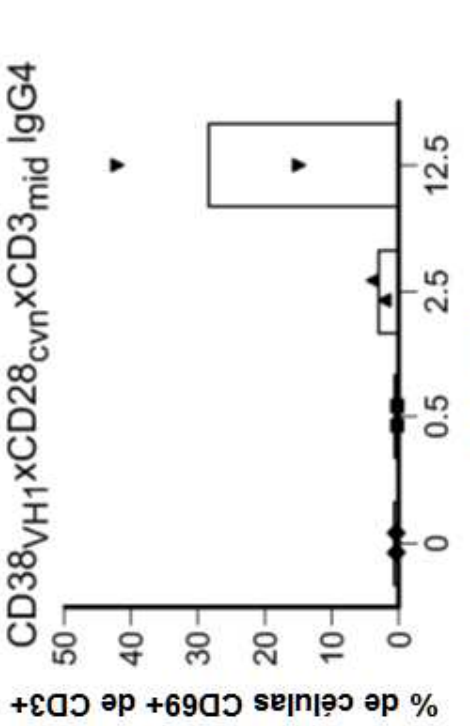


FIG. 14B

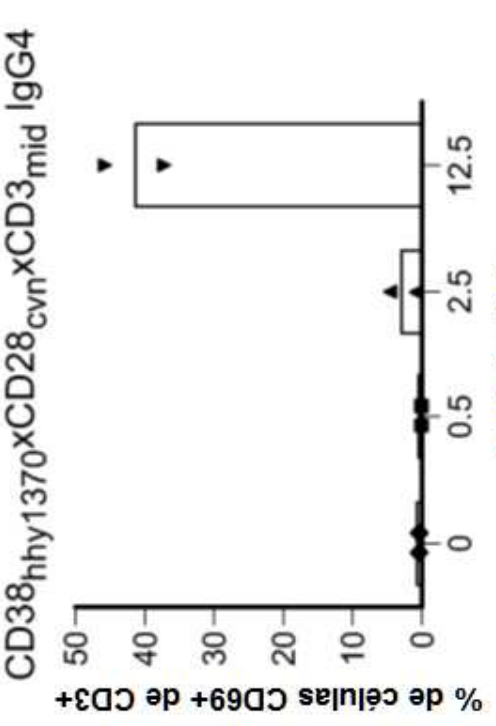


FIG. 14D

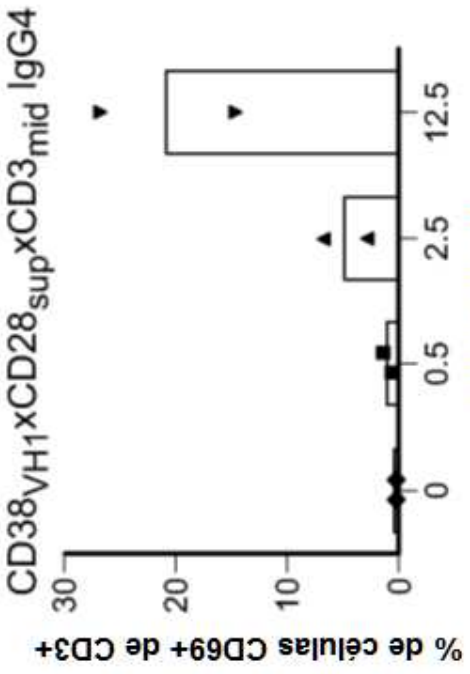


FIG. 14A

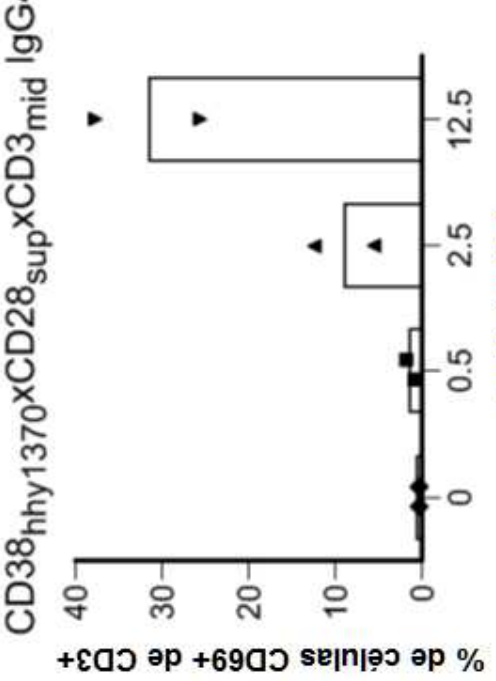


FIG. 14C

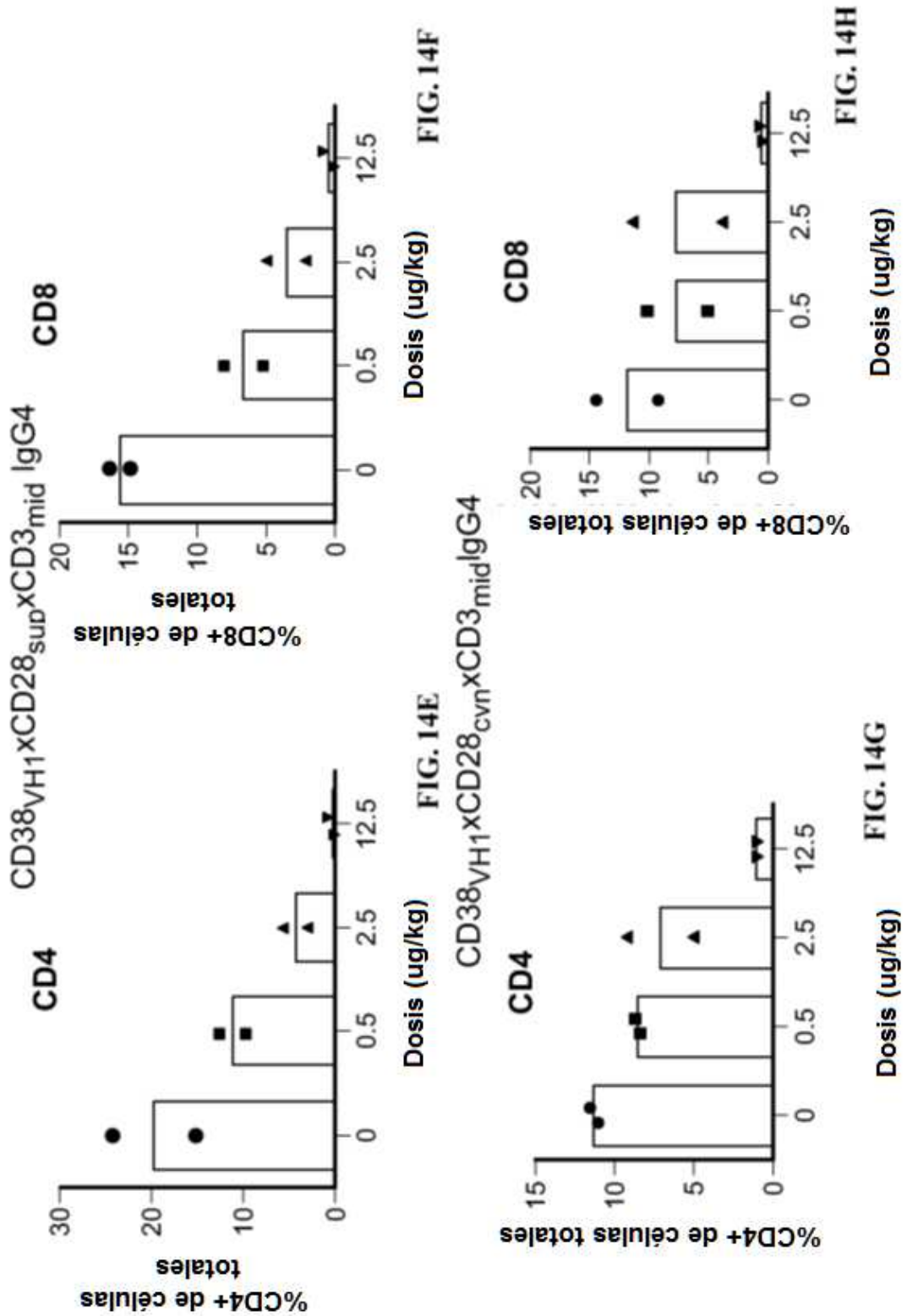


FIG. 14E

FIG. 14F

FIG. 14G

FIG. 14H

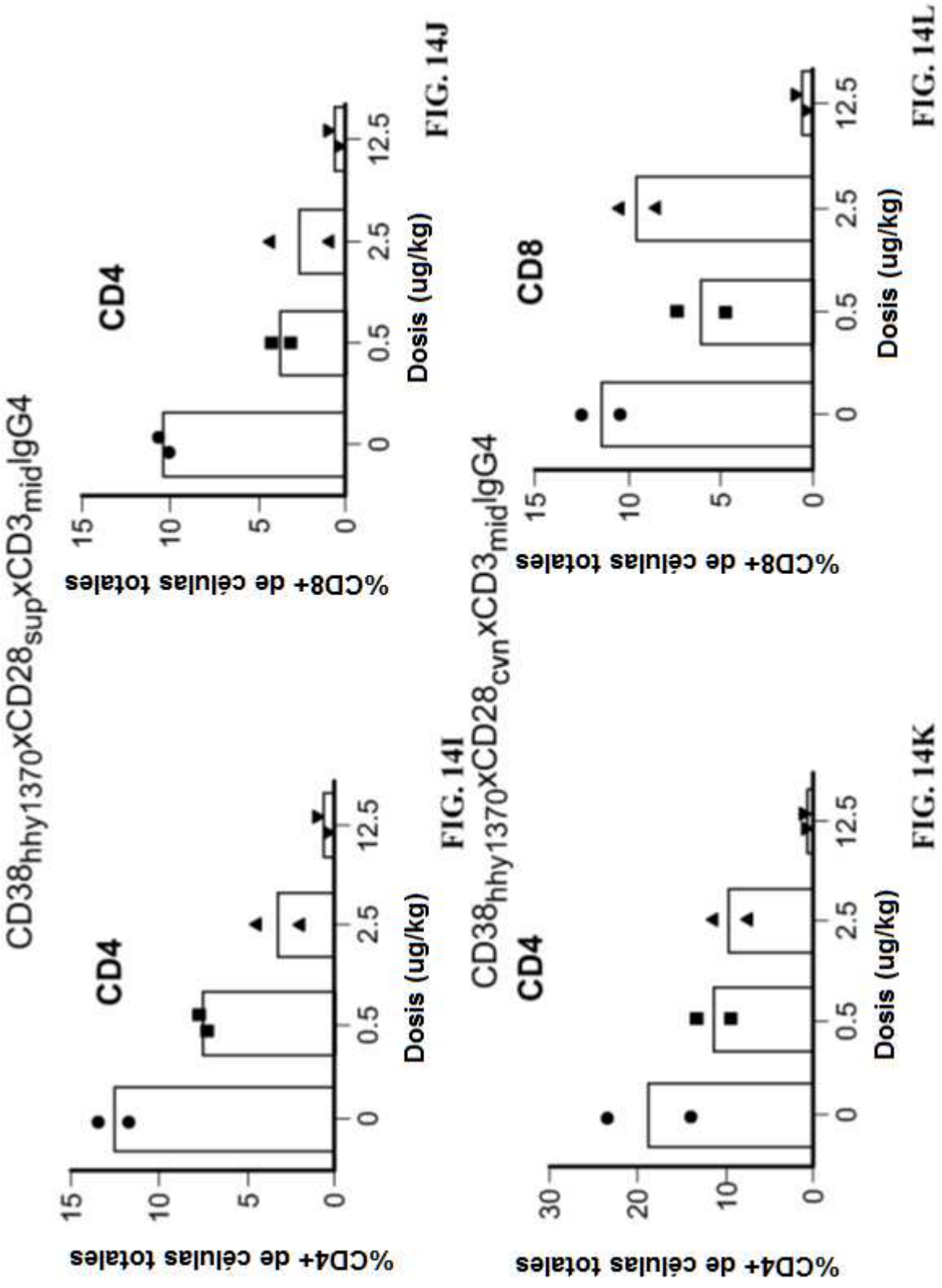
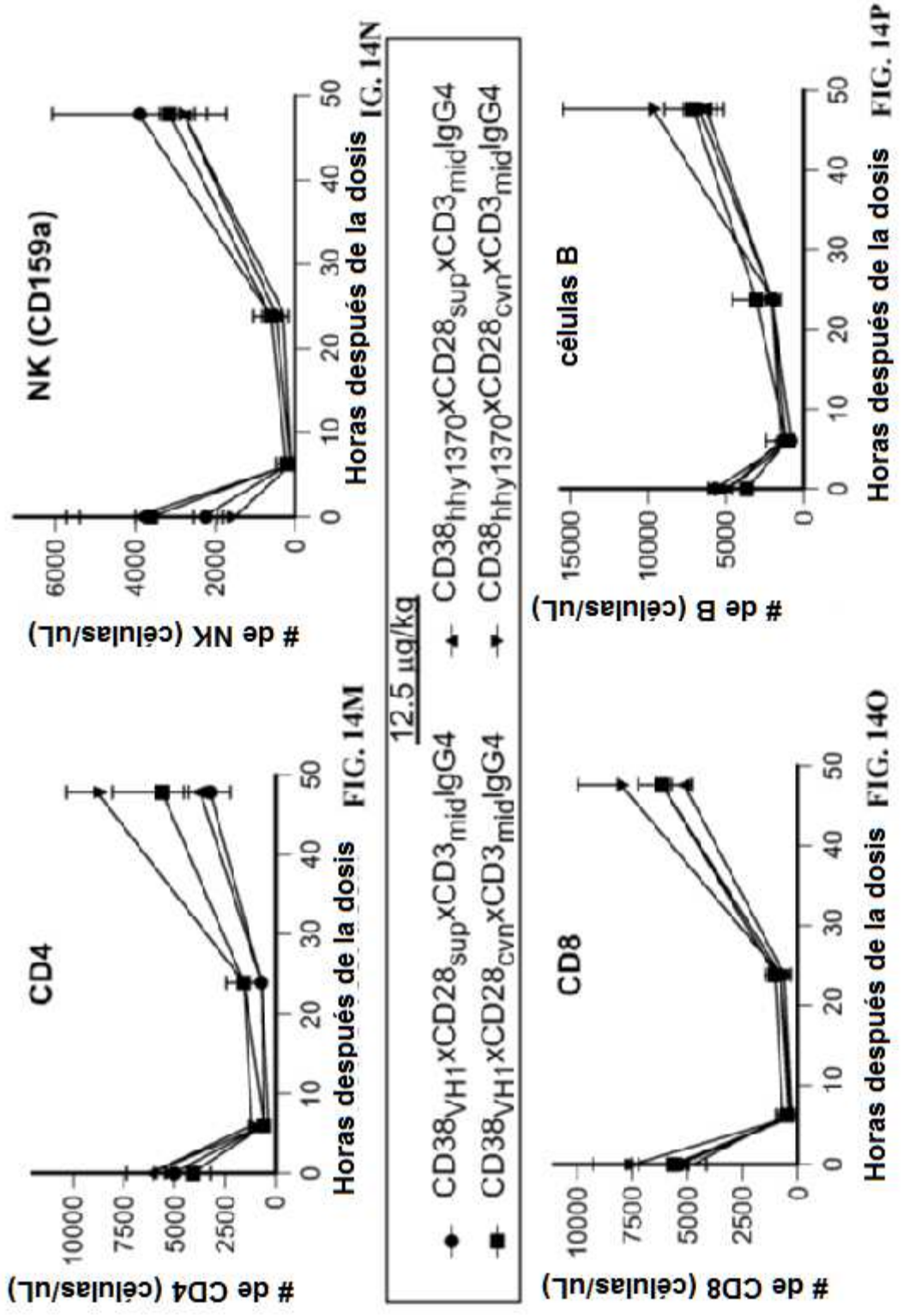


FIG. 14J

FIG. 14I

FIG. 14K

FIG. 14L


CD4
de CD4 (células/uL)
Horas después de la dosis
FIG. 14M
NK (CD159a)
de NK (células/uL)
Horas después de la dosis
FIG. 14N
12.5 µg/kg
CD38VH1xCD28sup xCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28sup xCD3mid IgG4
CD38VH1xCD28cvn xCD3mid IgG4
CD38hhy1370xCD28cvn xCD3mid IgG4
CD8
de CD8 (células/uL)
Horas después de la dosis
FIG. 14O
células B
de B (células/uL)
Horas después de la dosis
FIG. 14P

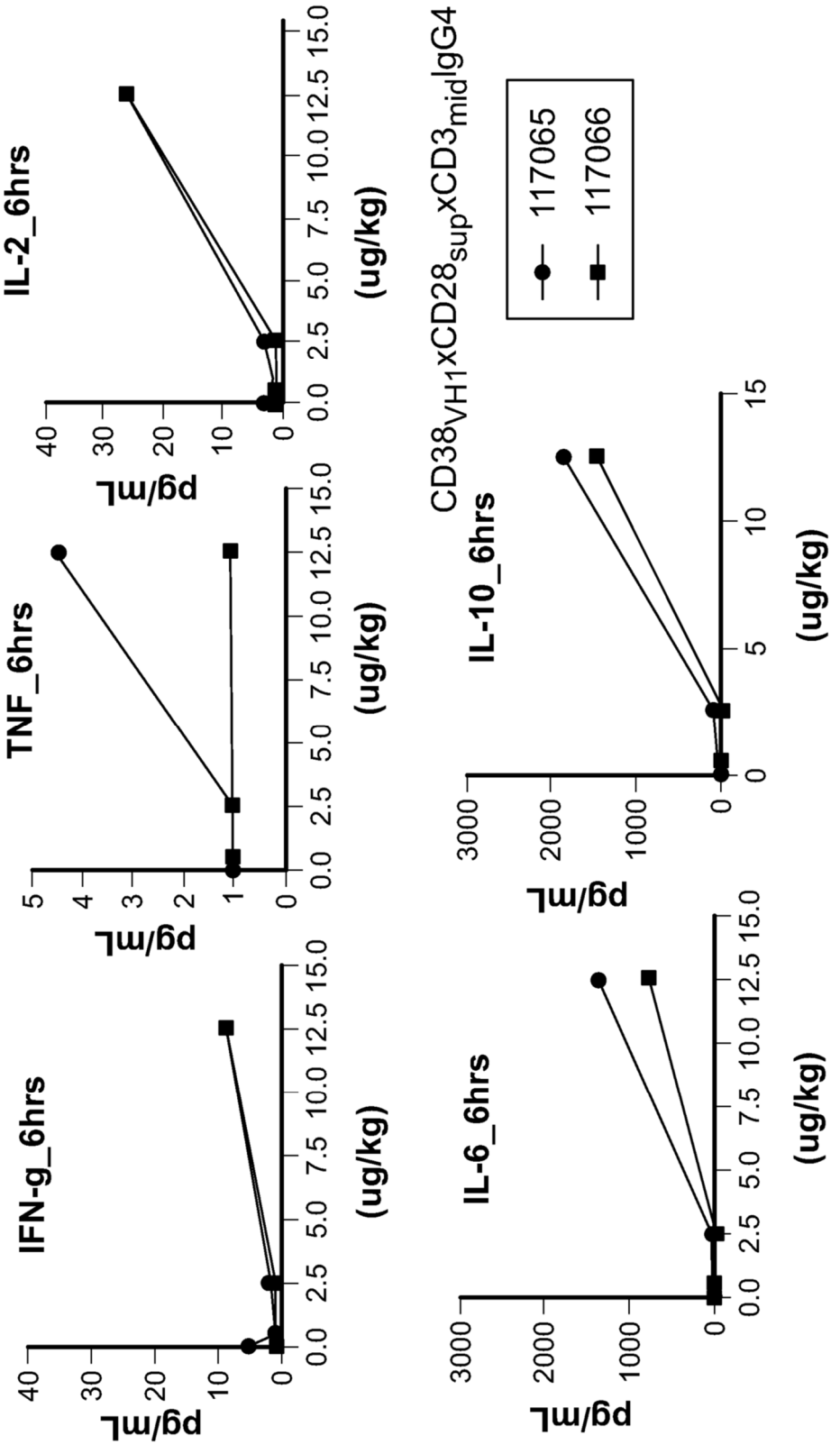

IL-2_6hrs
TNF_6hrs
IFN-g_6hrs
IL-10_6hrs
IL-6_6hrs
pg/mL
(ug/kg)
CD38VH1xCD28supxCD3midIgG4
117065
117066

FIG. 14Q

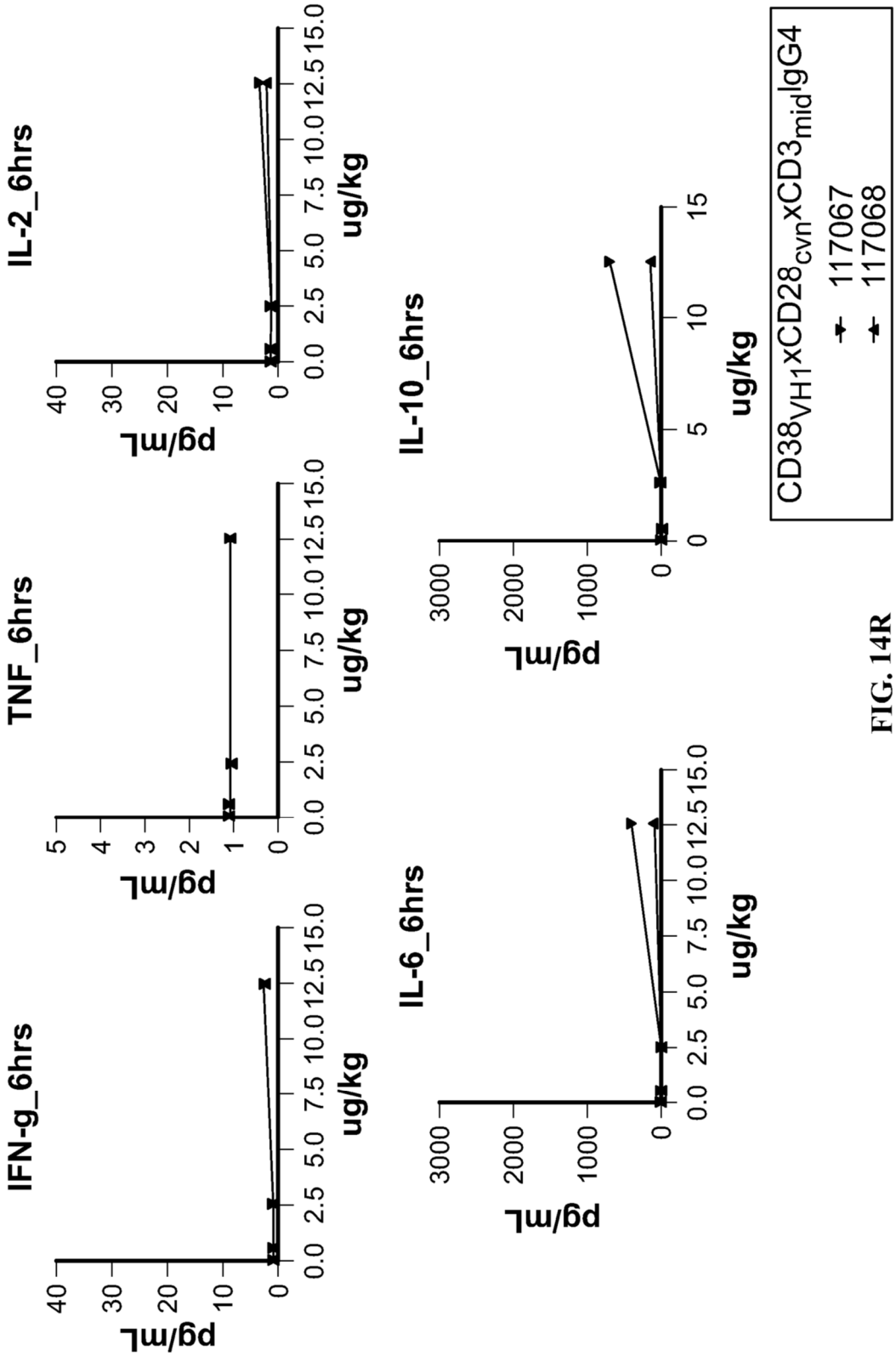

IL-2_6hrs
TNF_6hrs
IFN-g_6hrs
IL-10_6hrs
IL-6_6hrs
pg/mL
ug/kg
0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0
0 10 20 30 40
0 1 2 3 4 5
0 1000 2000 3000
0 5 10 15
CD38VH1xCD28cvnxCD3midIgG4
117067
117068

FIG. 14R

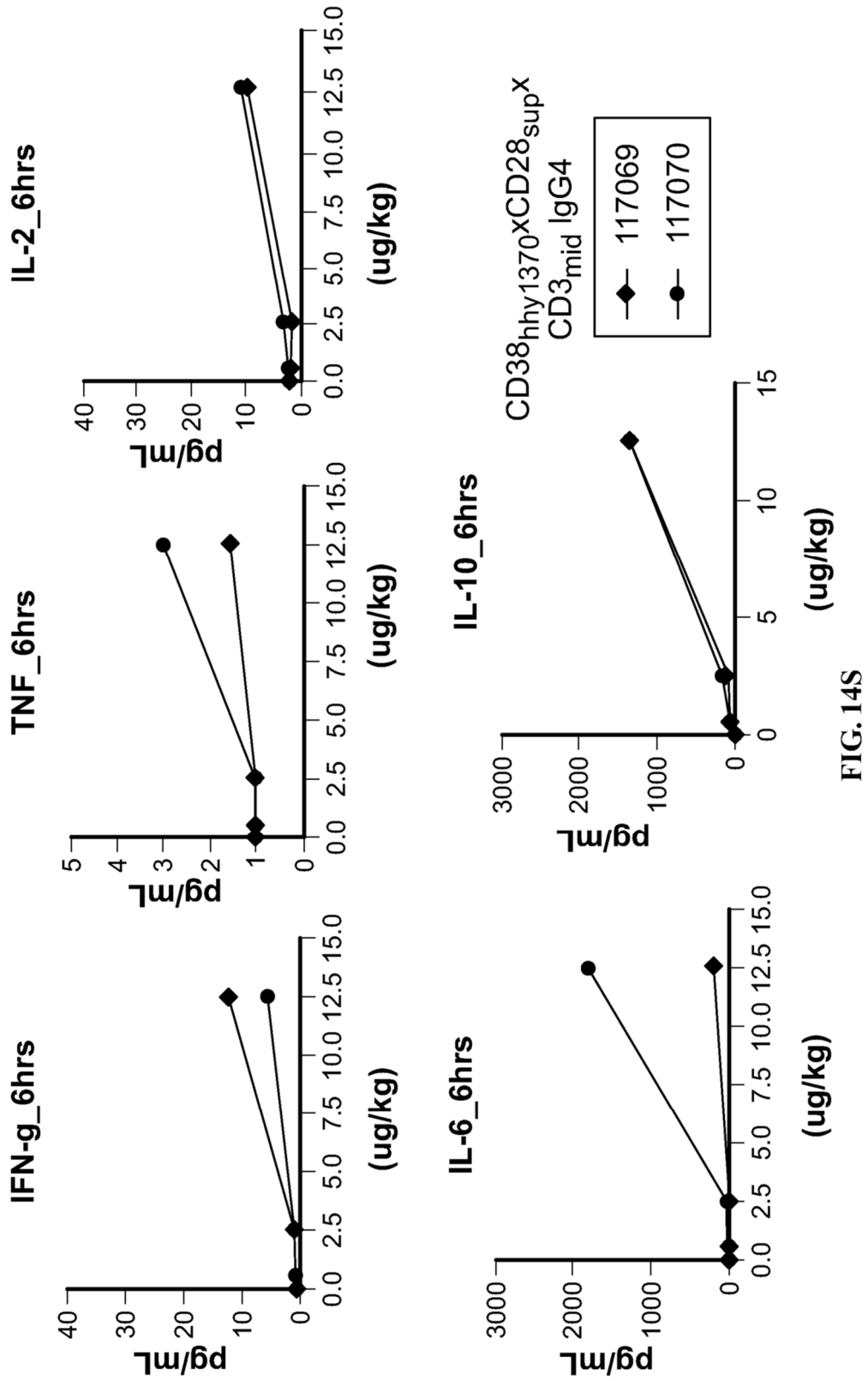

IL-2_6hrs
TNF_6hrs
IFN-g_6hrs
IL-10_6hrs
IL-6_6hrs
pg/mL
(ug/kg)
0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0
0 10 20 30 40
0 1 2 3 4 5
0 5 10 15
0 1000 2000 3000
CD38hhy1370xCD28supx
CD3mid lgG4
117069
117070

FIG. 14S

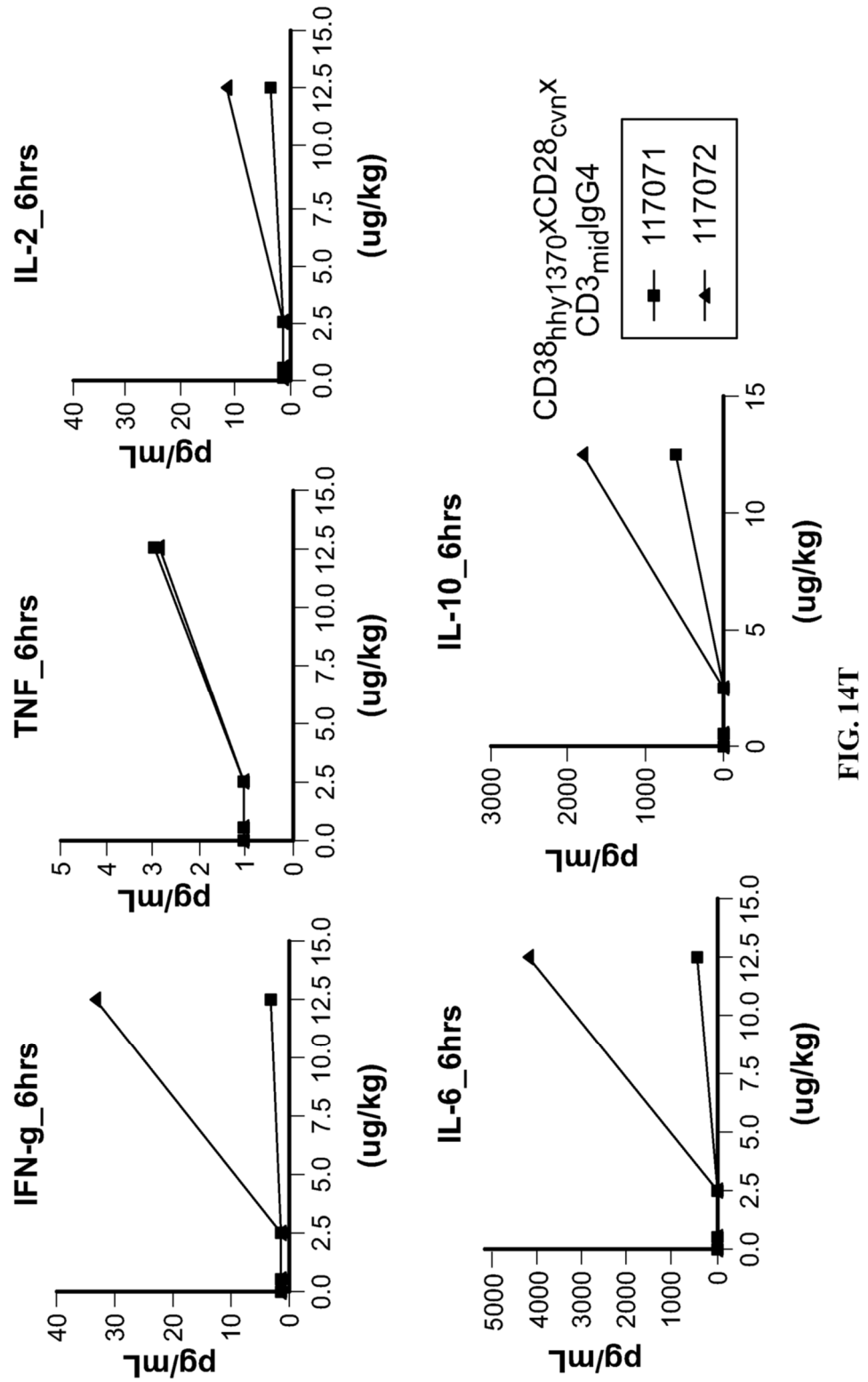

IL-2_6hrs
TNF_6hrs
IFN-g_6hrs
IL-6_6hrs
IL-10_6hrs
pg/mL
(ug/kg)
CD38hhy1370xCD28cvnx
CD3midIgG4
117071
117072

FIG. 14T

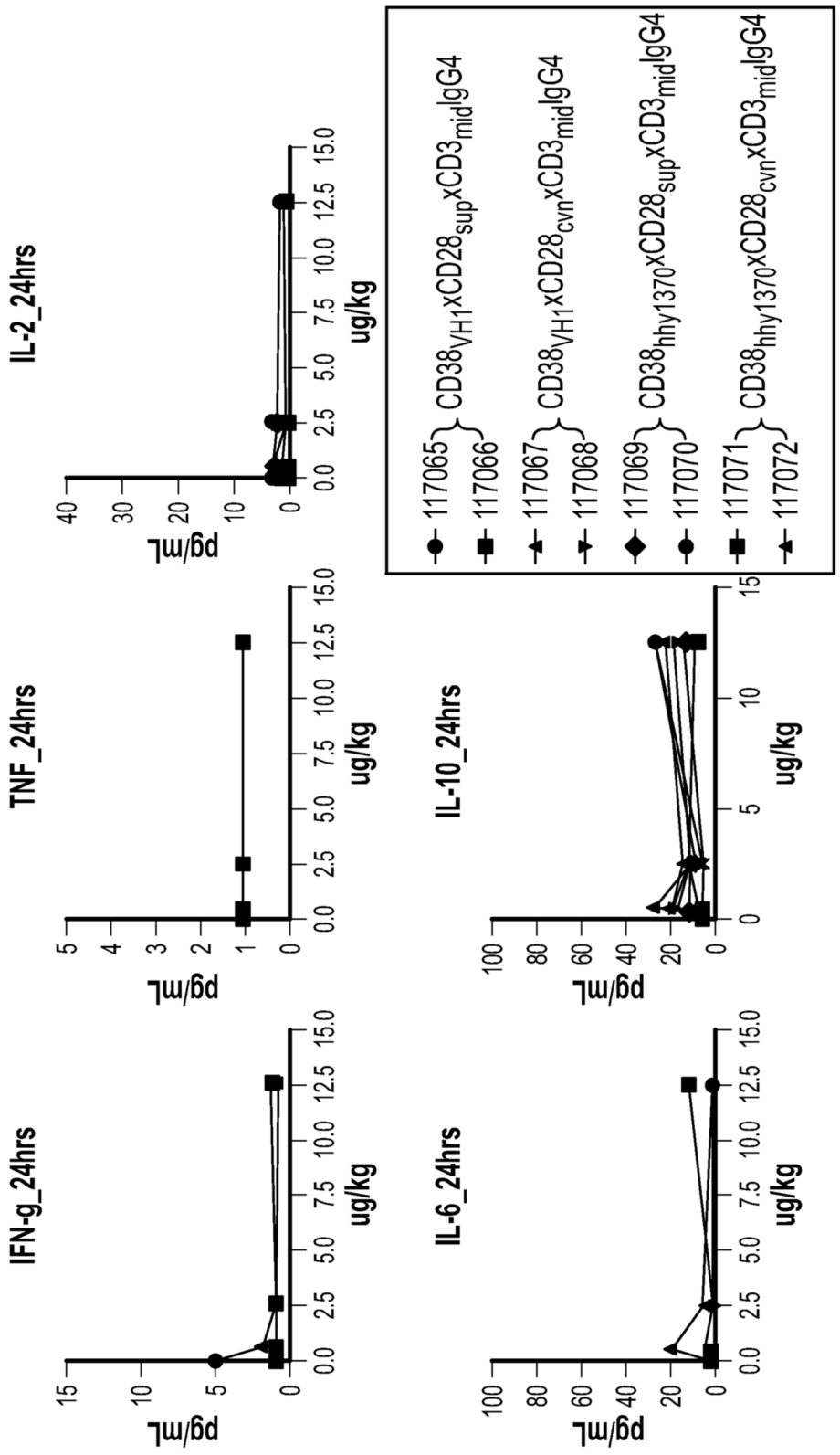

IFN-g_24hrs
TNF_24hrs
IL-2_24hrs
IL-6_24hrs
IL-10_24hrs
pg/mL
ug/kg
117065 CD38VH1xCD28supxCD3midIgG4
117066
117067 CD38VH1xCD28cvnxCD3midIgG4
117068
117069 CD38hhy1370xCD28supxCD3midIgG4
117070
117071 CD38hhy1370xCD28cvnxCD3midIgG4
117072

FIG. 14U

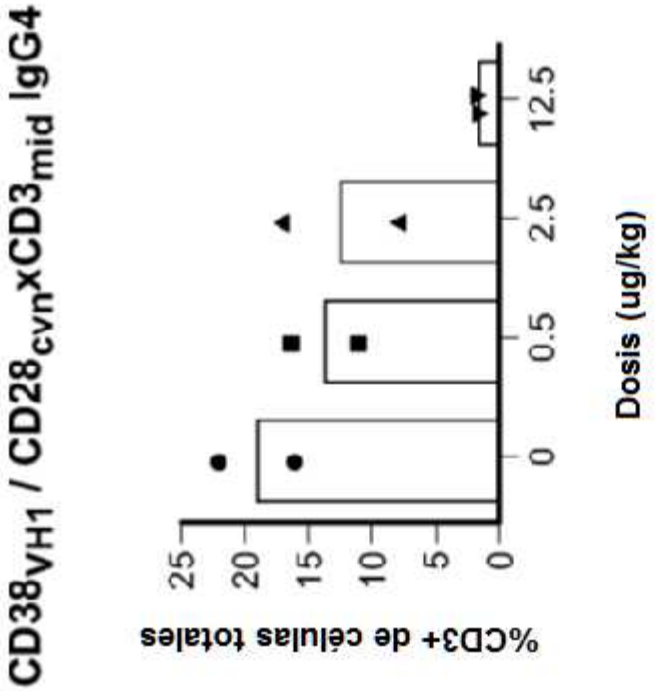


FIG. 14W

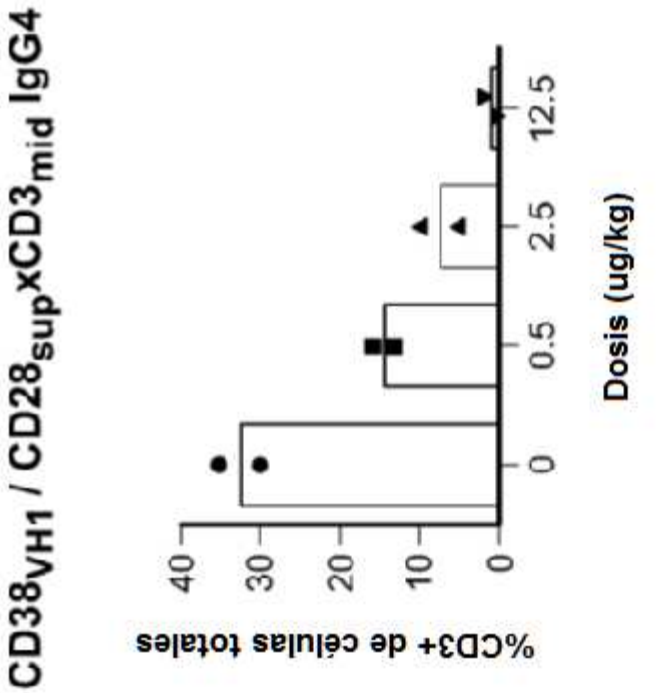


FIG. 14V

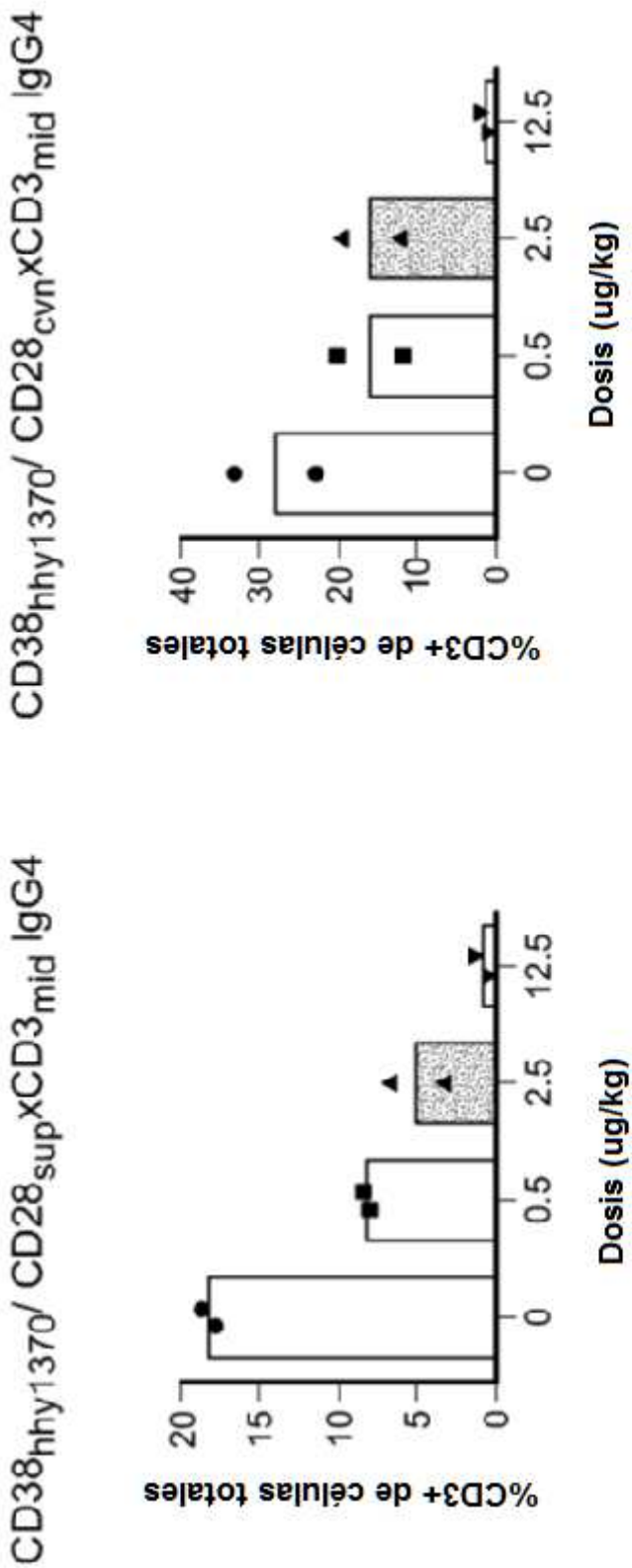


FIG. 14X

FIG. 14Y

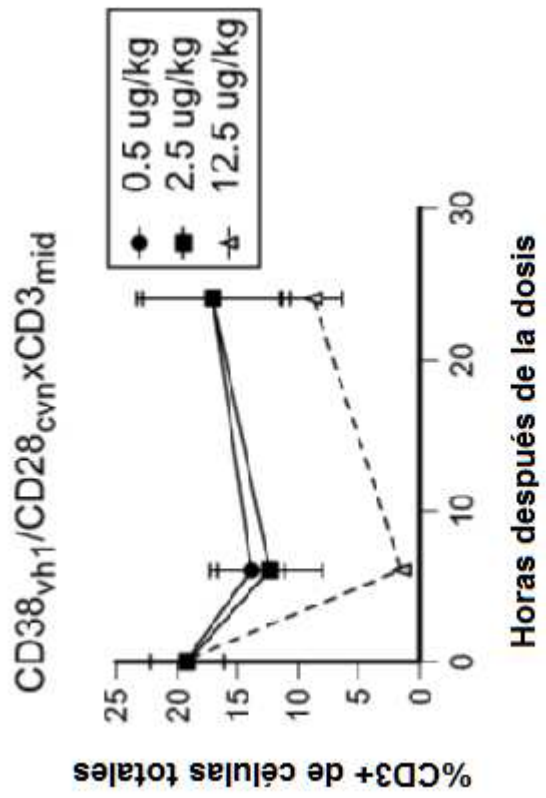


FIG. 14AA

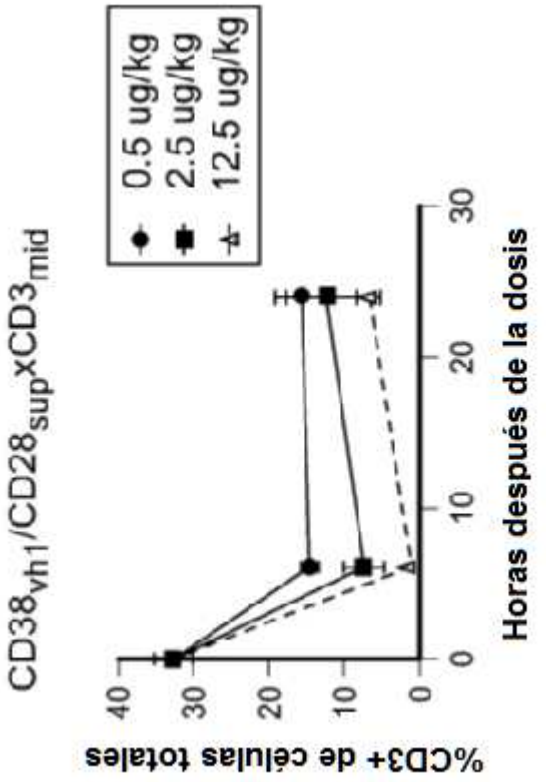


FIG. 14Z

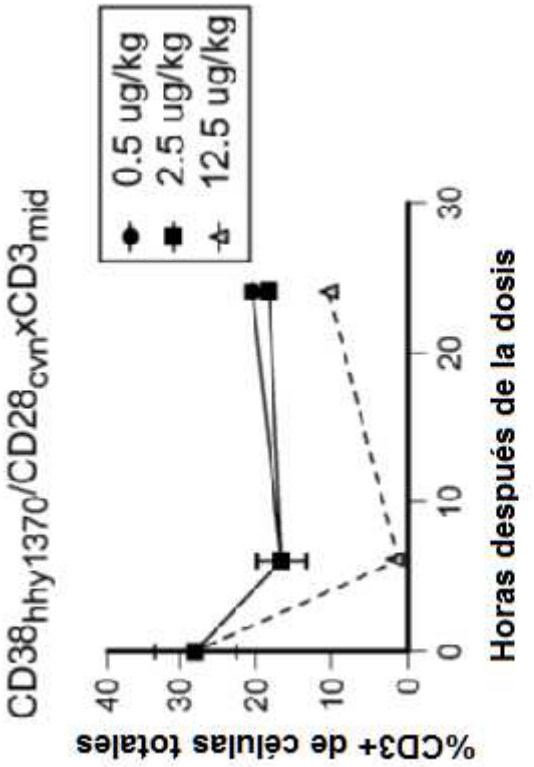


FIG. 14AC

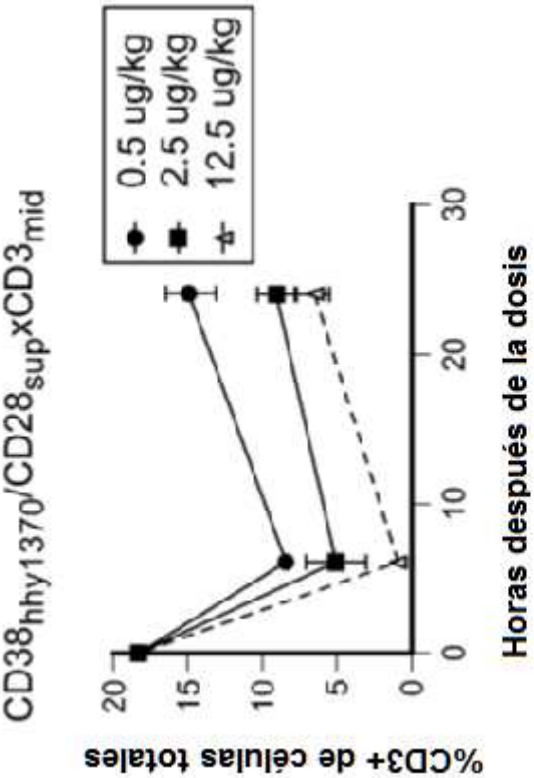


FIG. 14AB

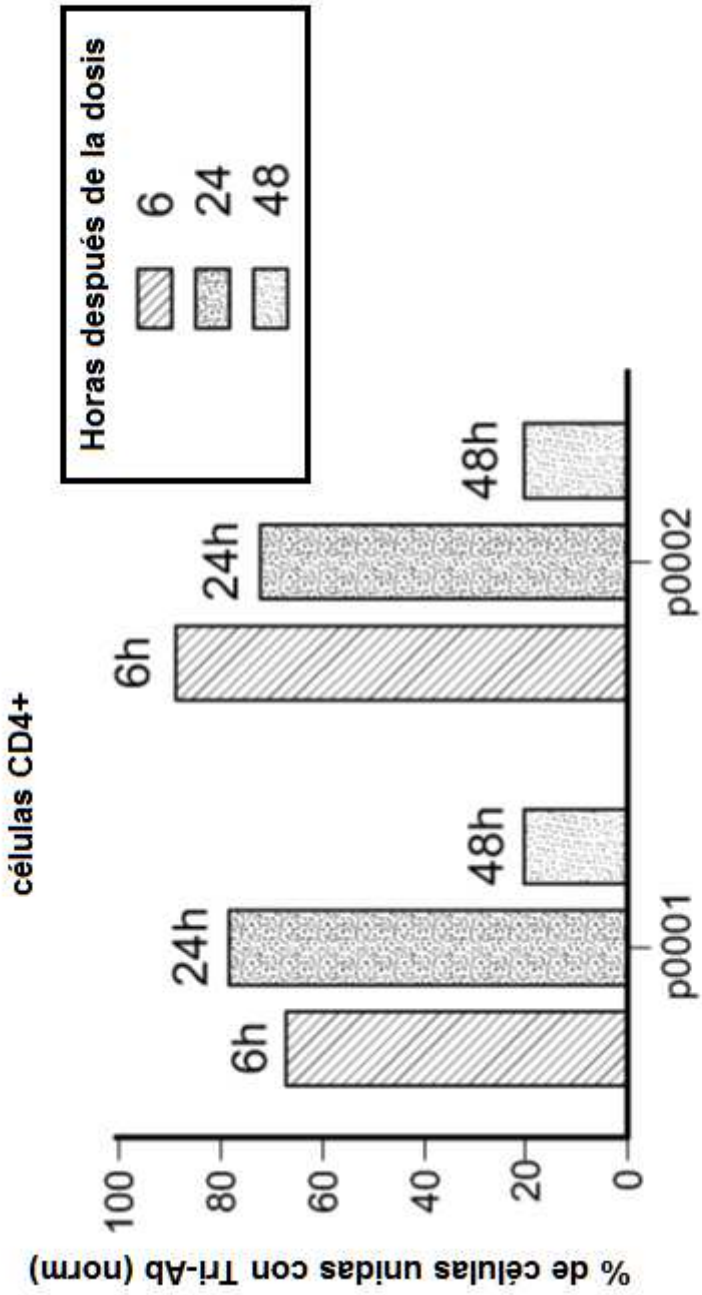

células CD4+
% de células unidas con Tri-Ab (norm)
100
80
60
40
20
0
6h
24h
48h
6h
24h
48h
p0001
p0002
Mono #
Horas después de la dosis
6
24
48

FIG. 14AD

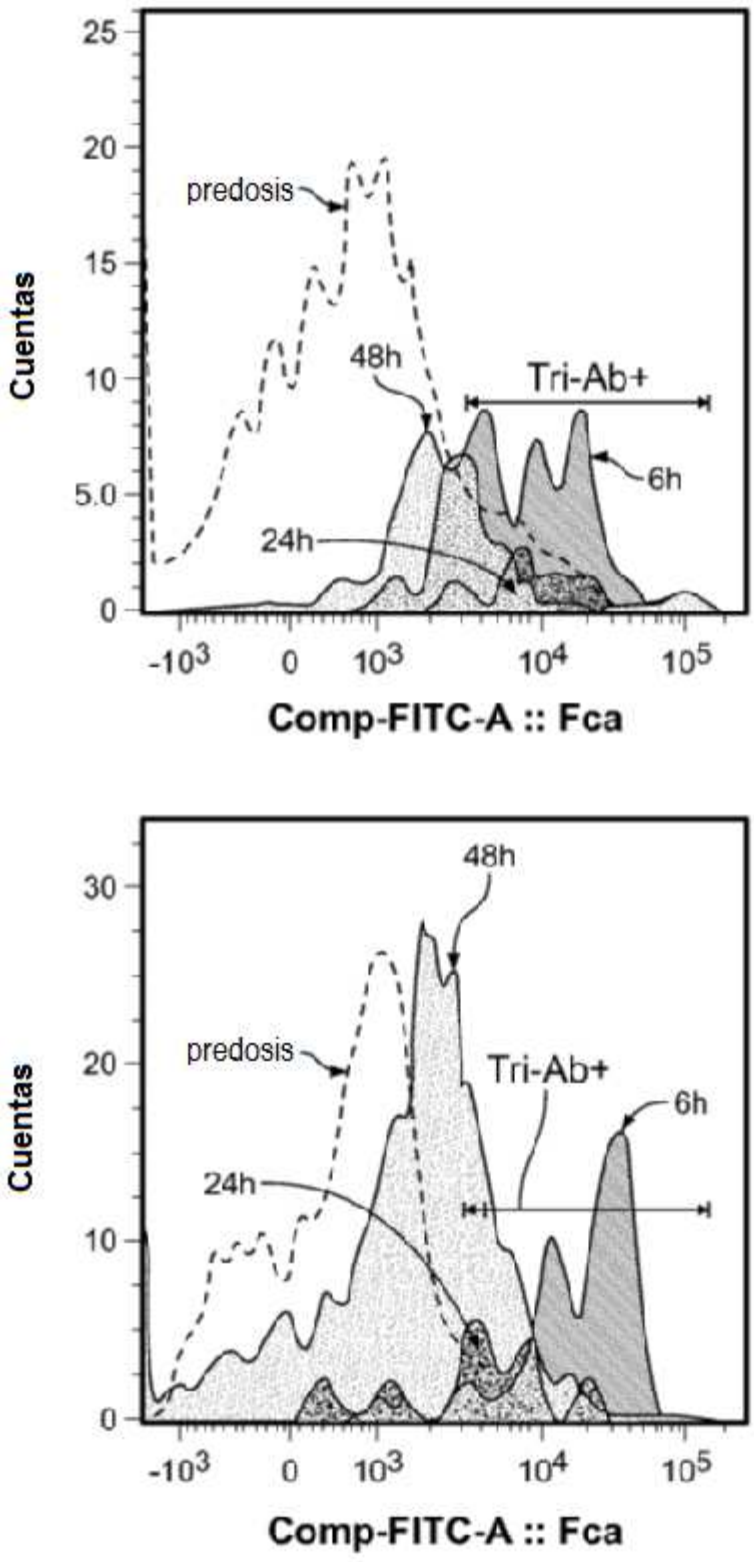

Cuentas
25
20
15
10
5.0
0
predosis
48h
Tri-Ab+
6h
24h
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
Comp-FITC-A :: Fca
Cuentas
30
20
10
0
48h
predosis
Tri-Ab+
6h
24h
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
Comp-FITC-A :: Fca

FIG. 14AE

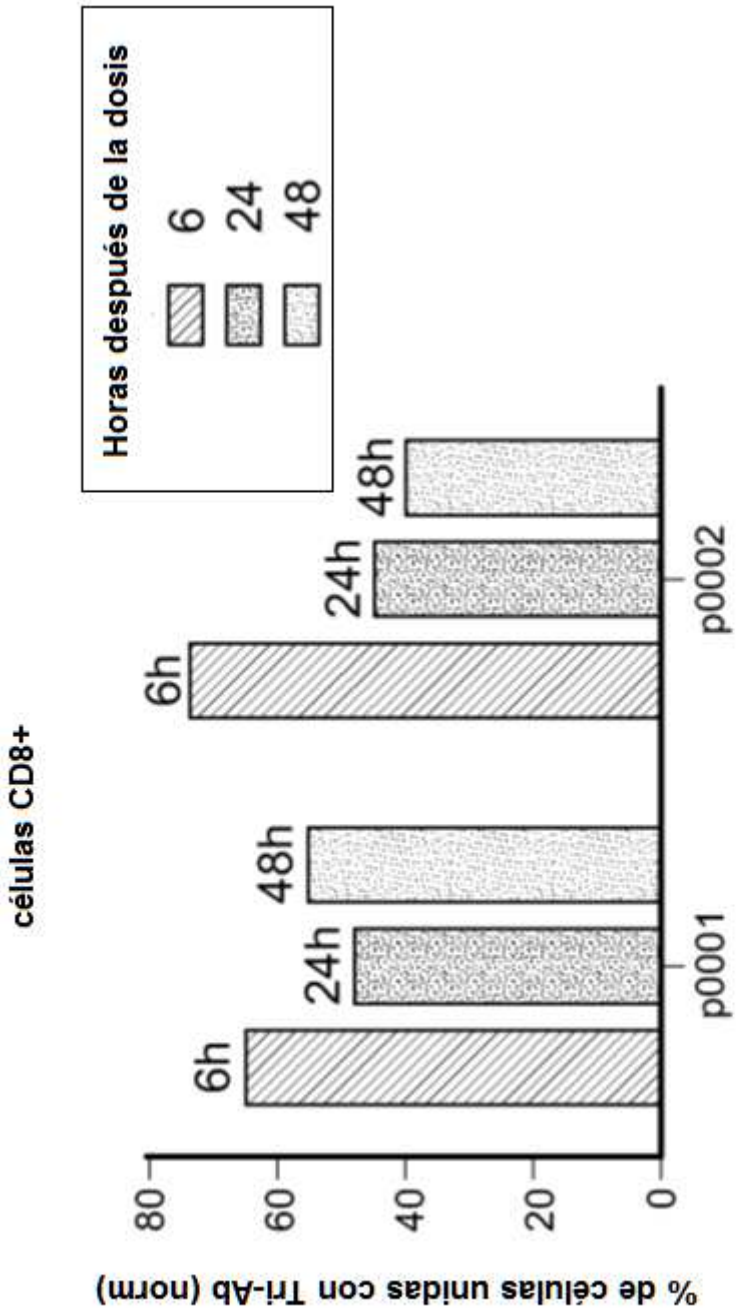
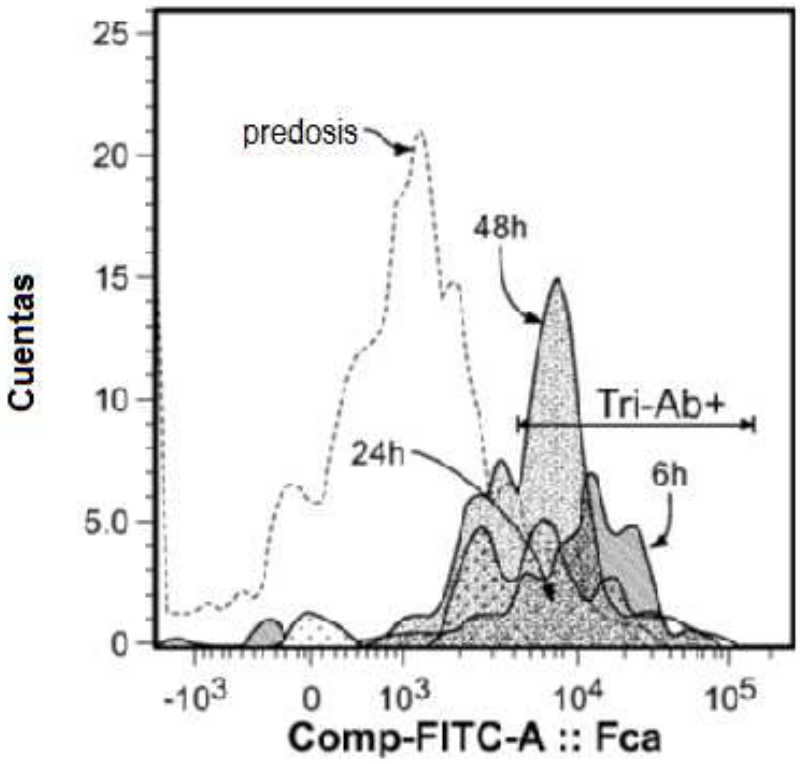

Horas después de la dosis
6
24
48
células CD8+
% de células unidas con Tri-Ab (norm)
0
20
40
60
80
6h
24h
48h
p0001
6h
24h
48h
p0002
Mono #

FIG. 14AF


25
20
15
10
5.0
0
Cuentas
predosis
48h
Tri-Ab+
24h
6h
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
Comp-FITC-A :: Fca

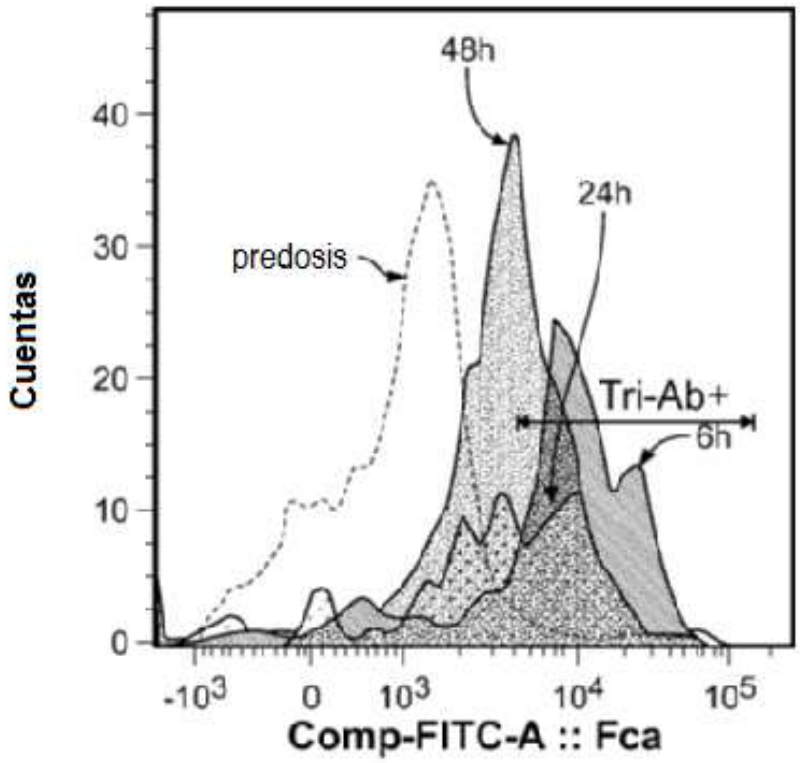

40
30
20
10
0
Cuentas
48h
24h
predosis
Tri-Ab+
6h
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
Comp-FITC-A :: Fca

FIG. 14AG

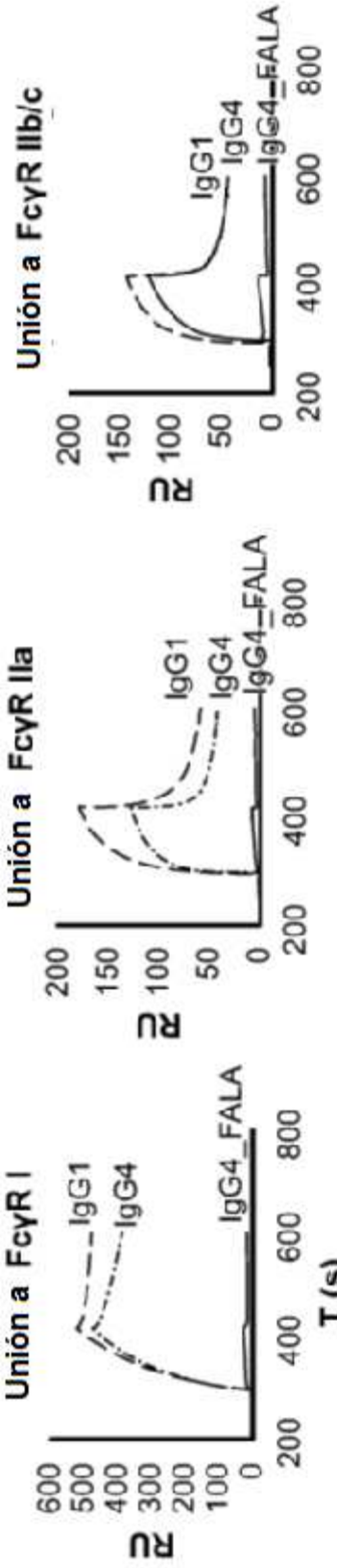


FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

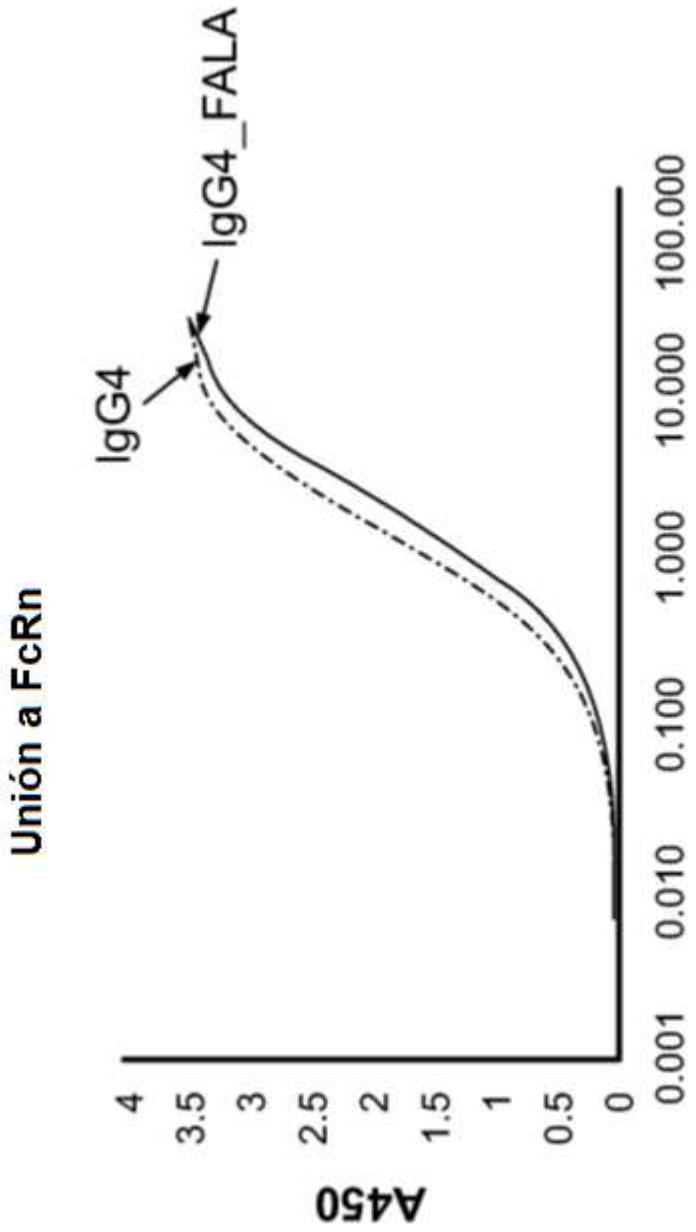

Unión a FcRn
A450
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
100.000
[Ab] nM
IgG4
IgG4_FALA

FIG. 16

Anticuerpo	Tmax (hr)	Cmax (ng/ml)	Tlast (hr)	Clast (ng/ml)	T 1/2 (hr)	AUCall (hr* ng/ml)
anti-hCD38$_{VH1}$/CD28$_{sup}$x CD3$_{mid}$ IgG4	0.083	460	72	16.6	24	4850
anti-hCD38$_{VH1}$/CD28$_{sup}$x CD3$_{mid}$ IgG4 FALA	0.083	495	336	117.1	234	61200
anti-hCD38$_{VH1}$/CD28$_{sup}$x CD3$_{mid}$ IgG1 LALA P329A	0.083	621	336	93.2	277	49400
anti-hCD38$_{hhy1370}$/CD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$ IgG4 FALA	0.083	645	336	112.9	255	64500

FIG. 17

p=0.0005
p=0.0006
15000
10000
5000
0
pg/mL
CD38VH1 Tri-WT
CD38VH1 Tri-FALA
Control negativo
CD38xCD3

FIG. 18A

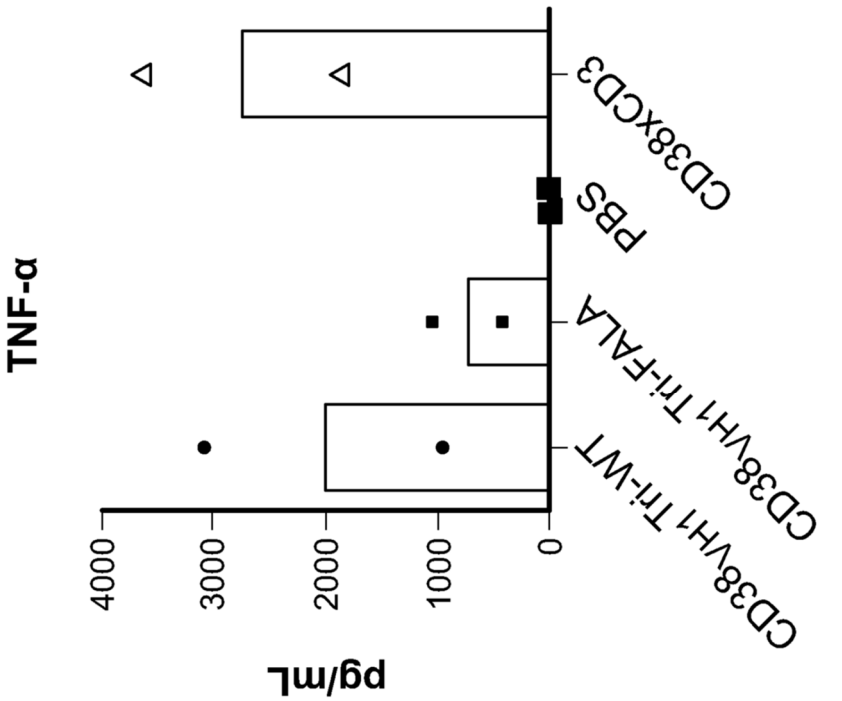


FIG. 18C

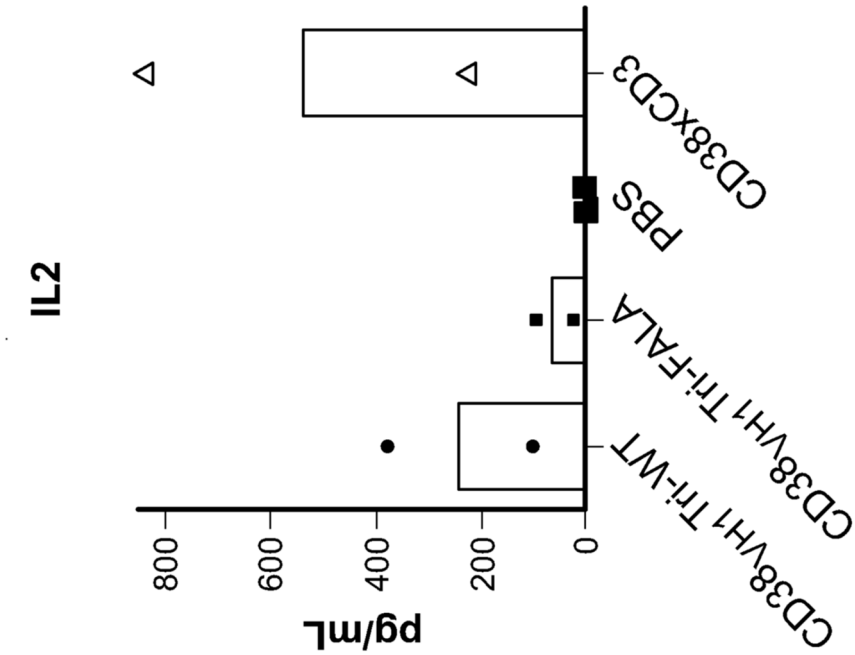


FIG. 18B

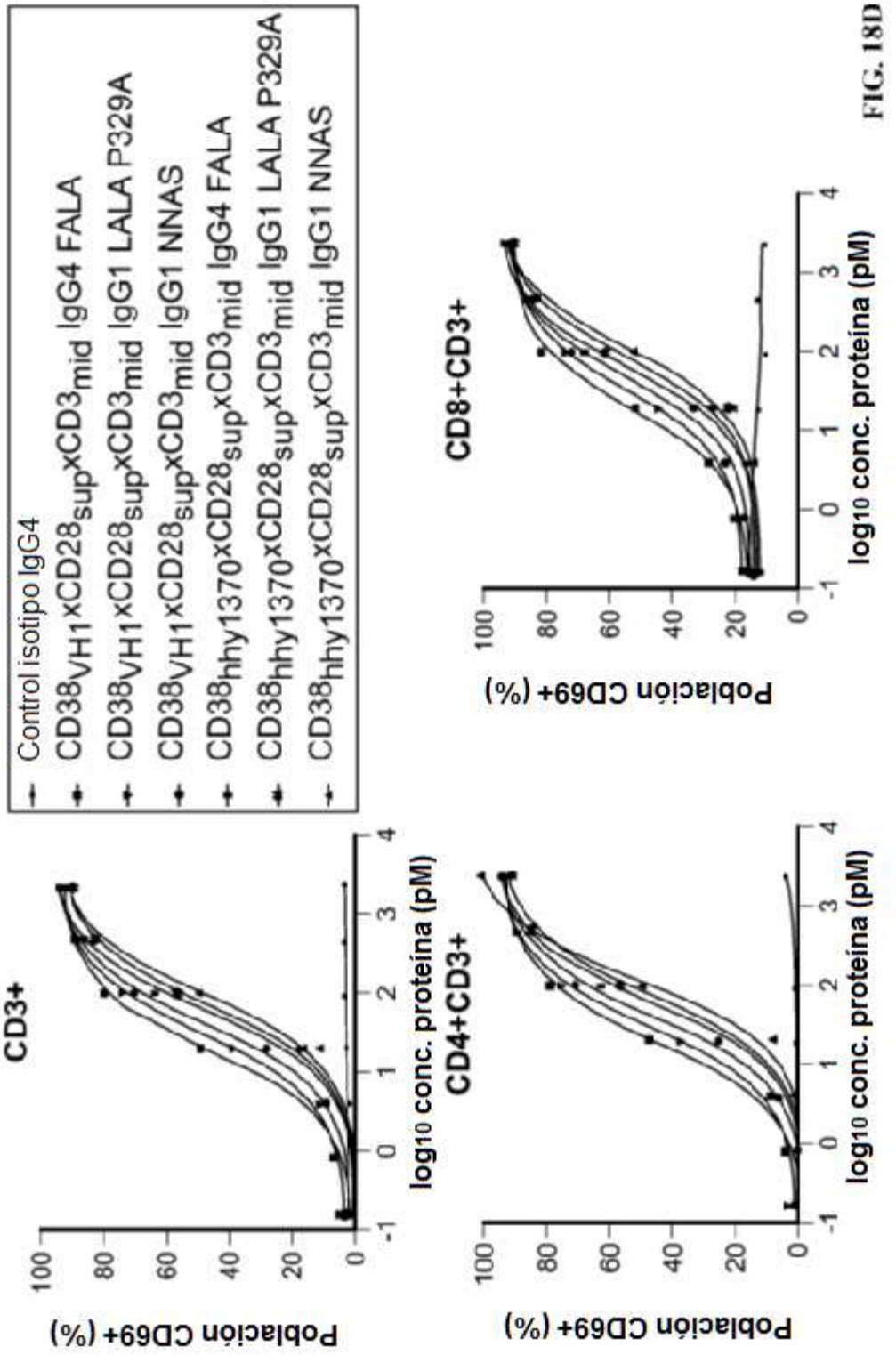

Control isotipo IgG4
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4 FALA
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG1 LALA P329A
CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG1 NNAS
CD3+
CD4+CD3+
CD8+CD3+
Población CD69+ (%)
log10 conc. proteína (pM)
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4

FIG. 18D

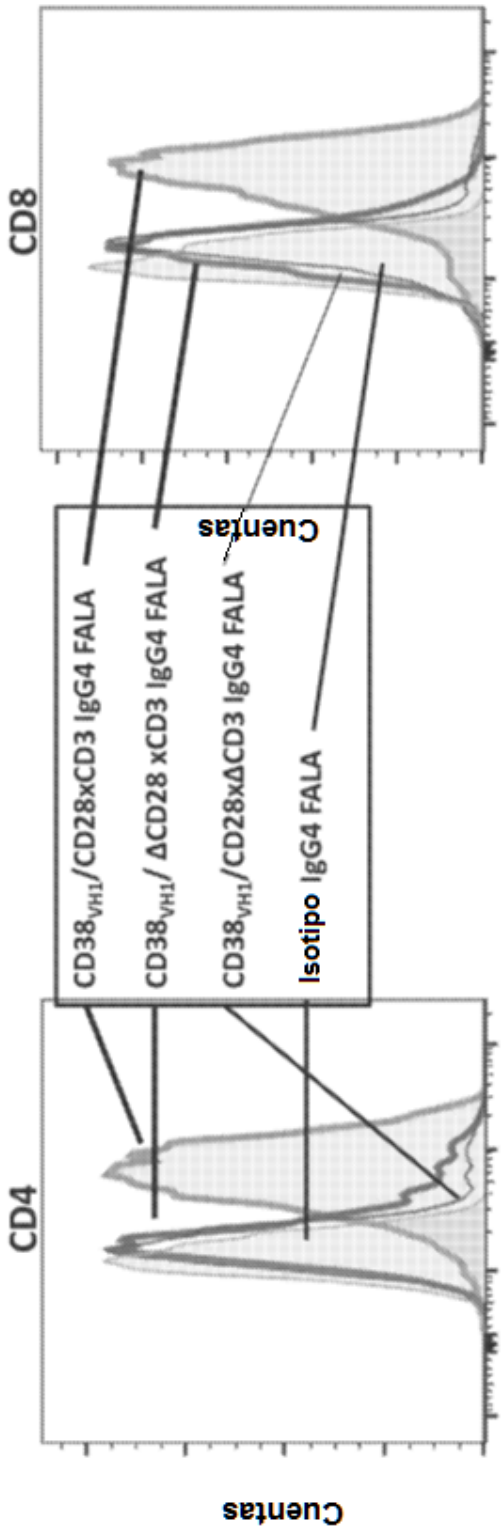
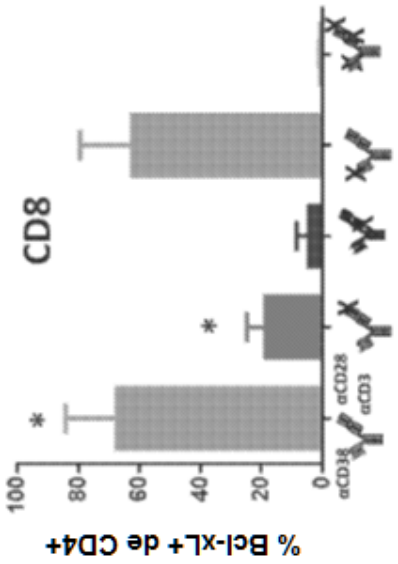


FIG. 19A



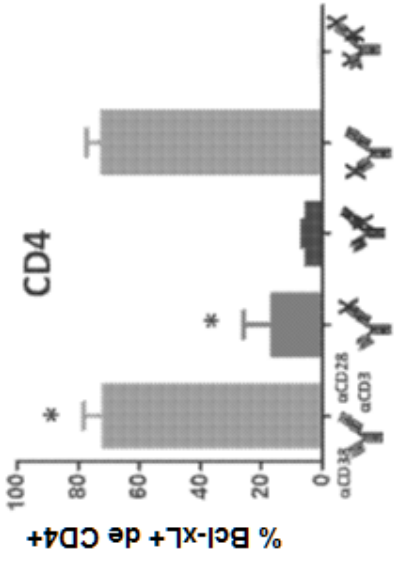


FIG. 19B

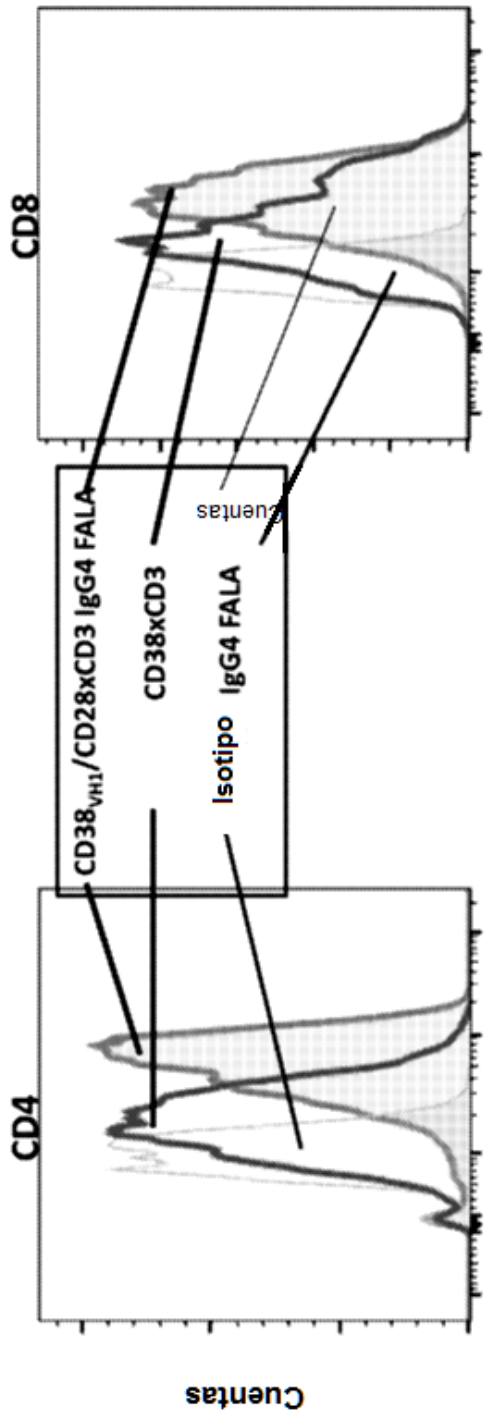


FIG. 19C

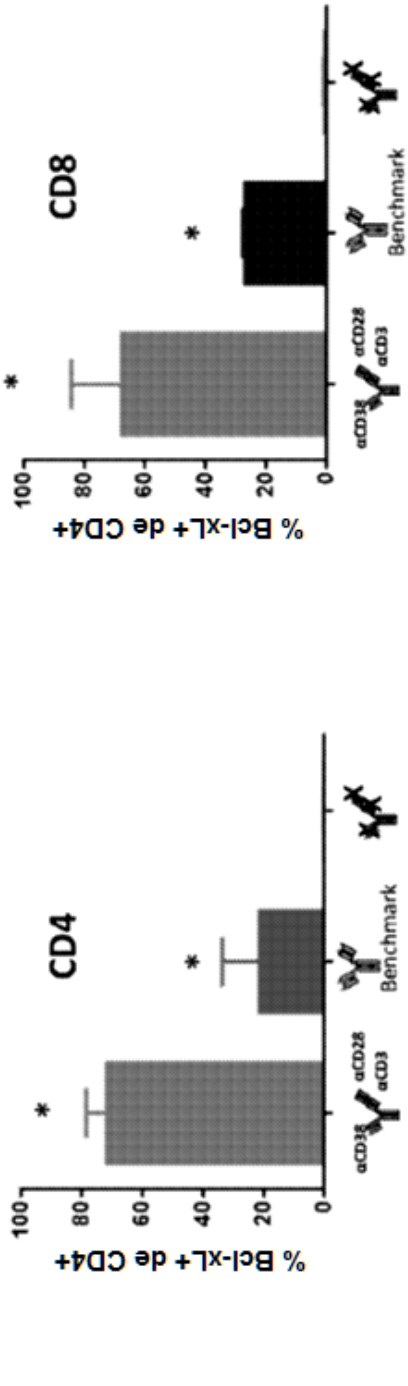


FIG. 19D

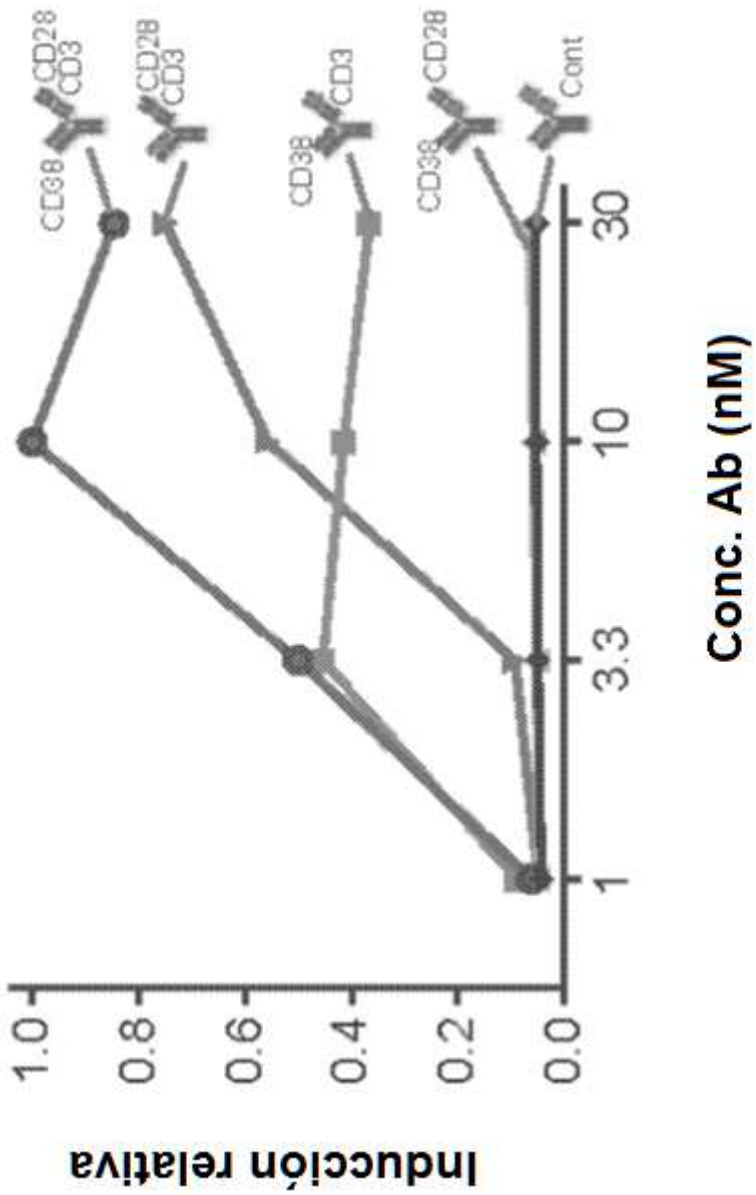

Inducción relativa
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
3.3
10
30
Conc. Ab (nM)
CD38
CD28
CD3
Cont

FIG. 19E

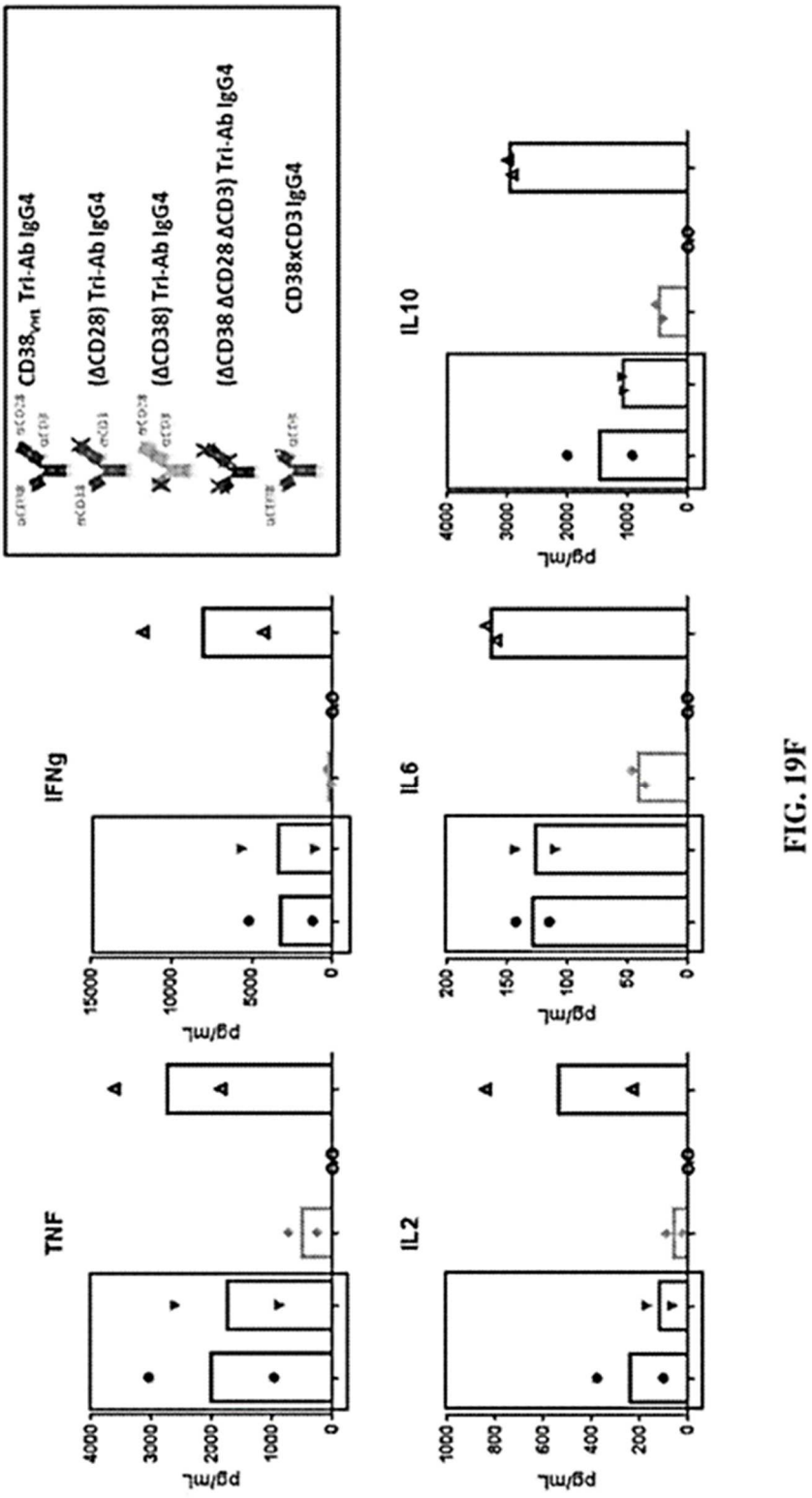

CD38$_{VH}$ Tri-Ab IgG4
(ΔCD28) Tri-Ab IgG4
(ΔCD38) Tri-Ab IgG4
(ΔCD38 ΔCD28 ΔCD3) Tri-Ab IgG4
CD38xCD3 IgG4
TNF
IFNg
IL2
IL6
IL10
pg/mL

FIG. 19F

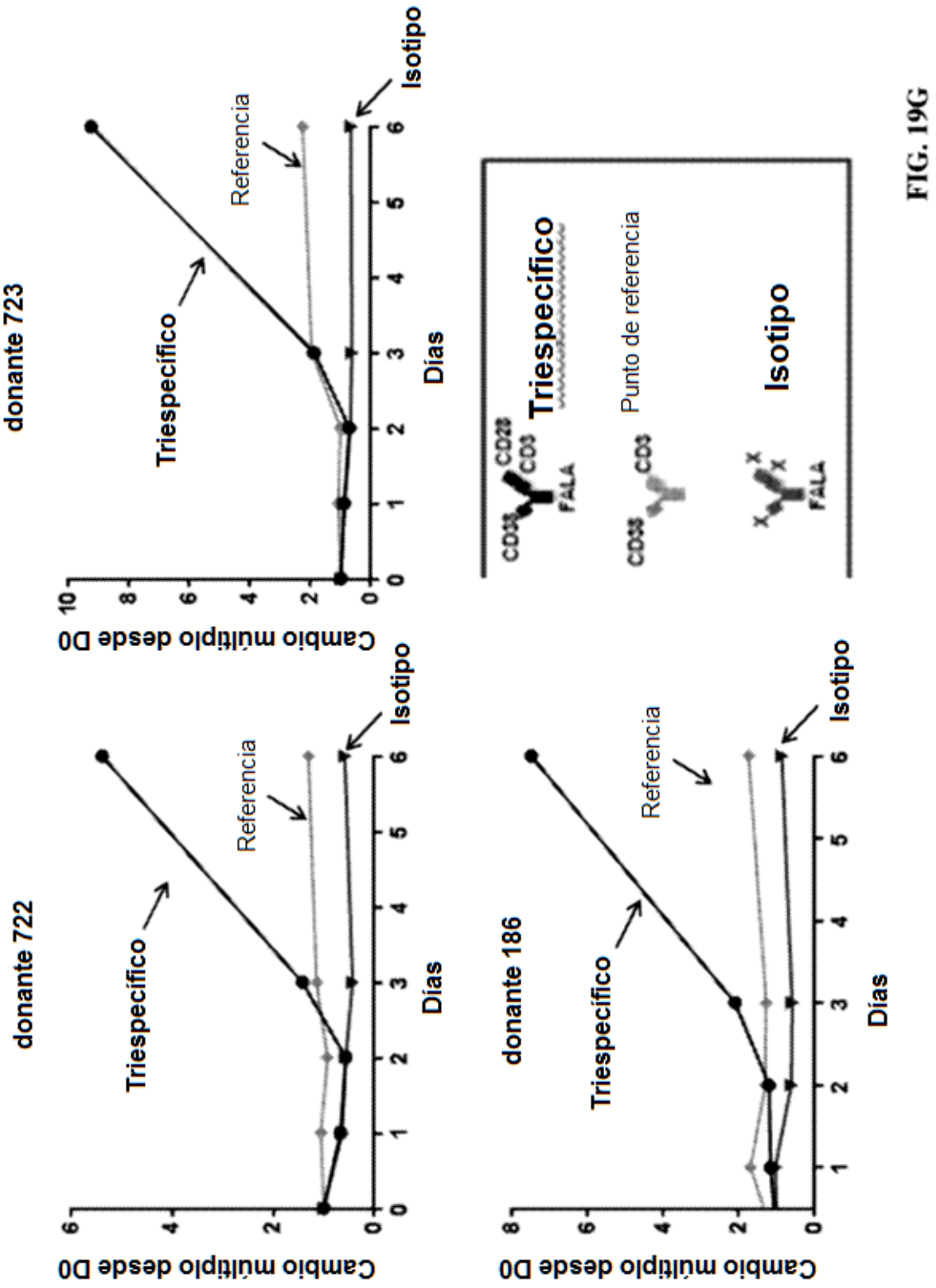

donante 723
donante 722
donante 186
Triespecífico
Referencia
Isotipo
Cambio múltiplo desde D0
Días
CD33
CD28
CD3
FALA
Triespecífico
Punto de referencia
Isotipo

FIG. 19G

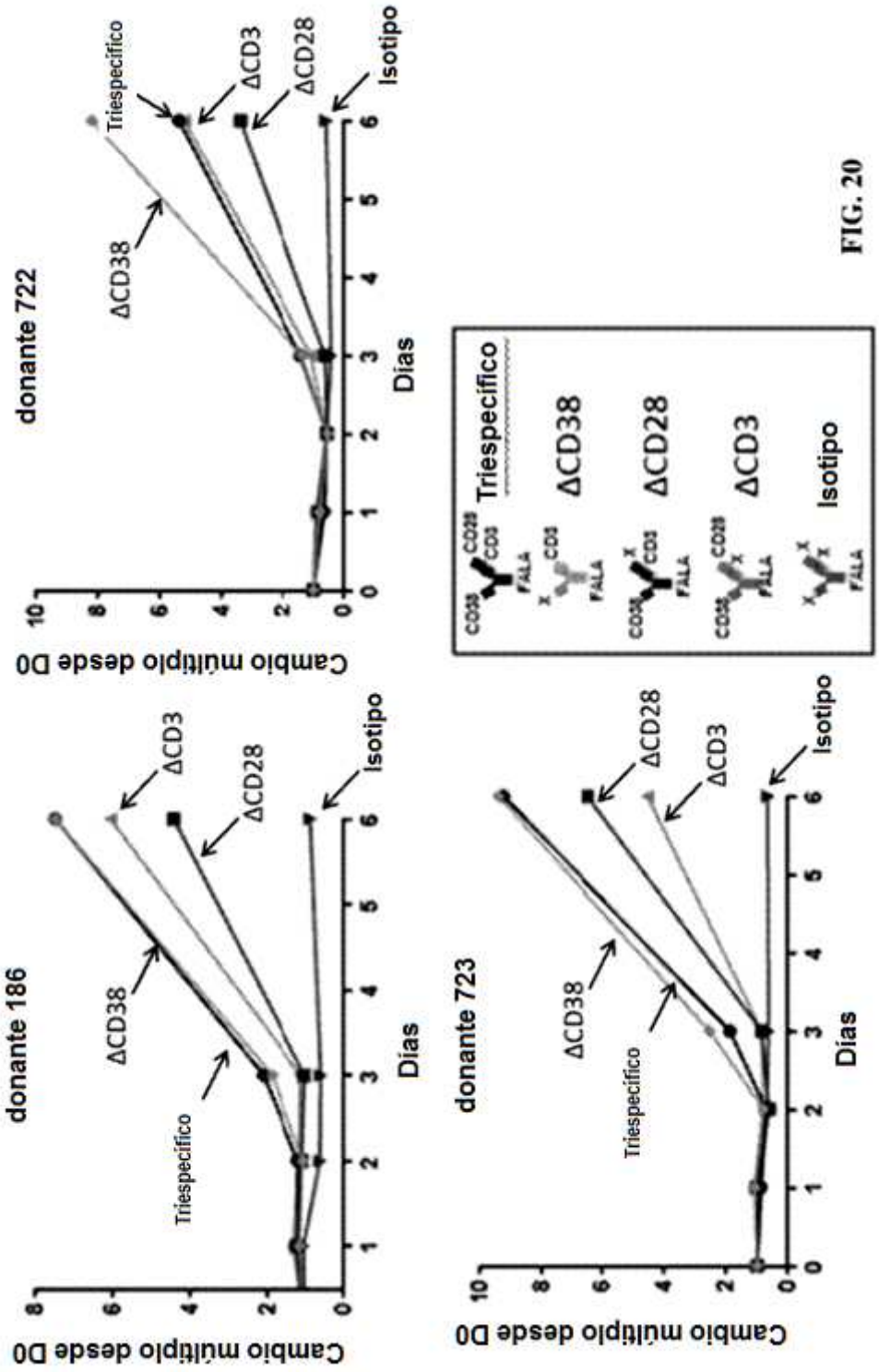

donante 722
Cambio múltiplo desde D0
Días
Triespecífico
ΔCD38
ΔCD3
ΔCD28
Isotipo
donante 186
donante 723
Triespecífico
ΔCD38
ΔCD28
ΔCD3
Isotipo

FIG. 20

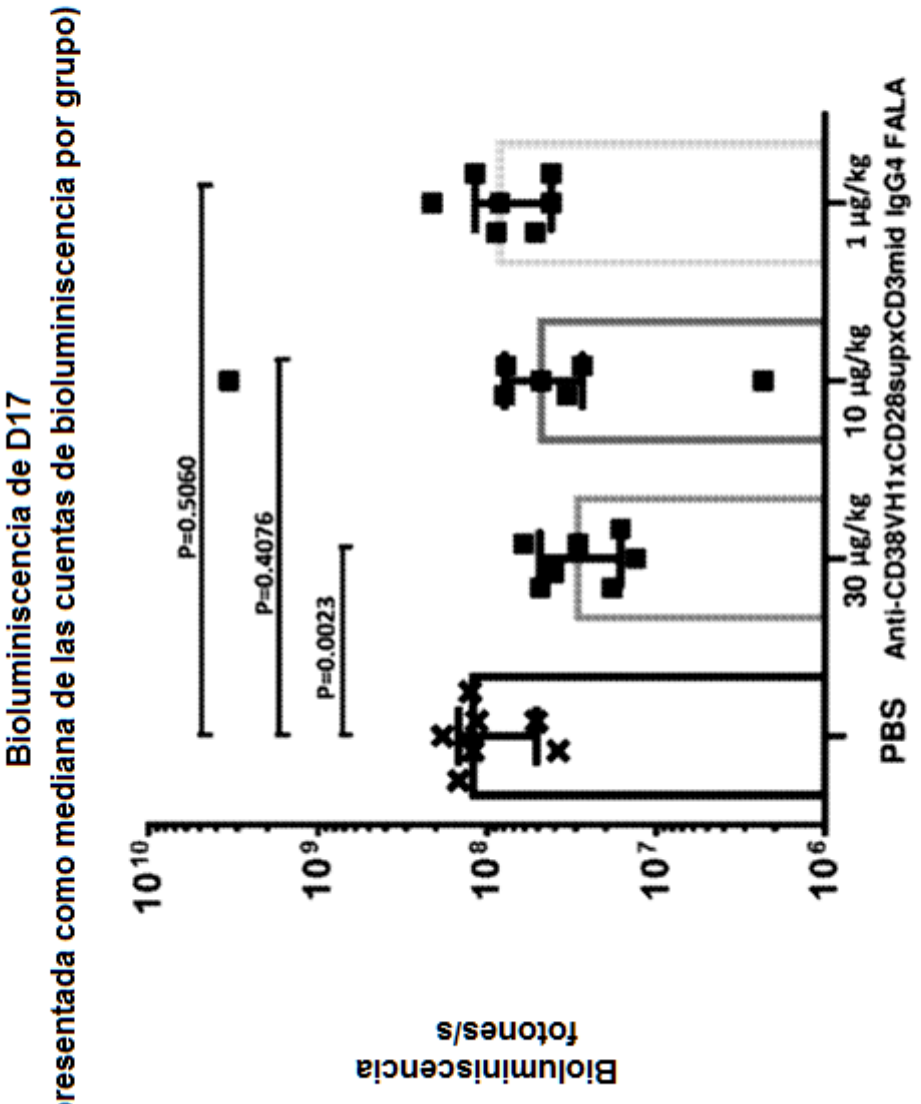

Bioluminiscencia de D17
(presentada como mediana de las cuentas de bioluminiscencia por grupo)
Bioluminiscencia fotones/s
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
P=0.5060
P=0.4076
P=0.0023
PBS
30 µg/kg
10 µg/kg
1 µg/kg
Anti-CD38VH1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA

FIG. 21

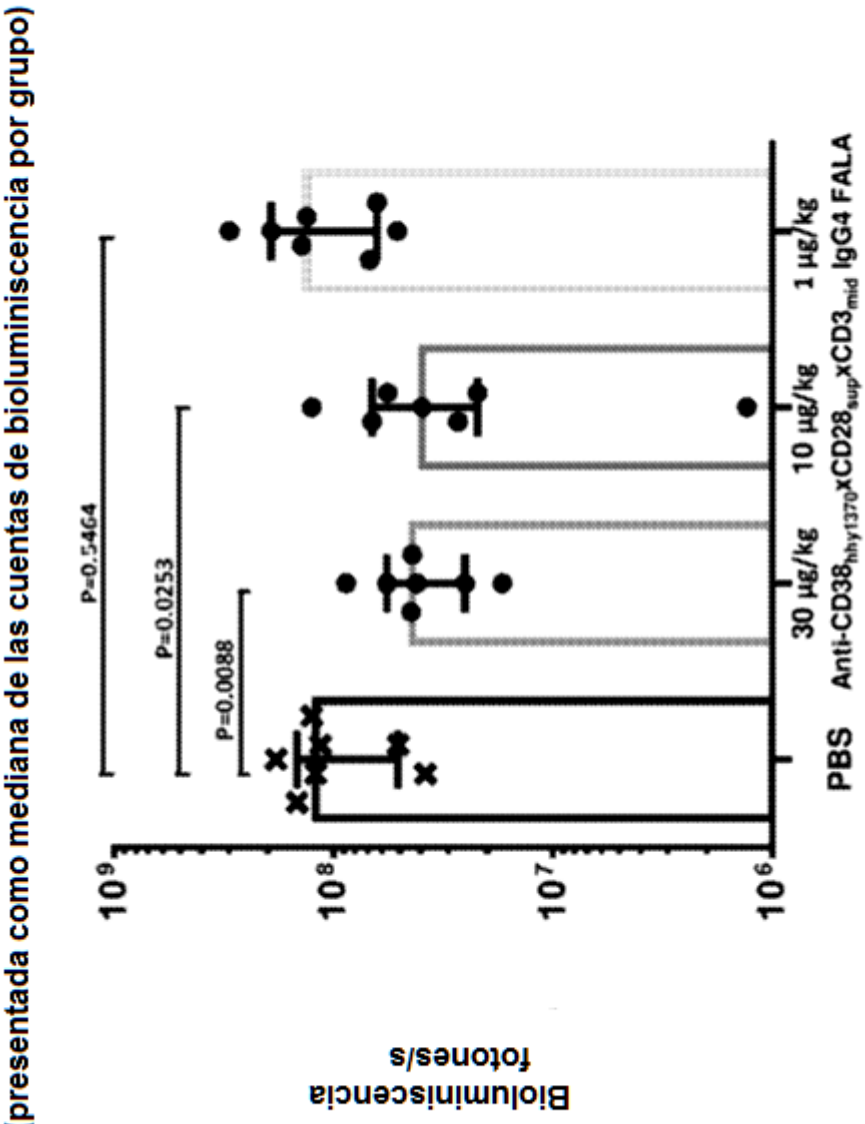

Bioluminiscencia de D17
(presentada como mediana de las cuentas de bioluminiscencia por grupo)
Bioluminiscencia fotones/s
10^9
10^8
10^7
10^6
P=0.5464
P=0.0253
P=0.0088
PBS
30 µg/kg
10 µg/kg
1 µg/kg
Anti-CD38hhy1370xCD28supxCD3mid IgG4 FALA

FIG. 22

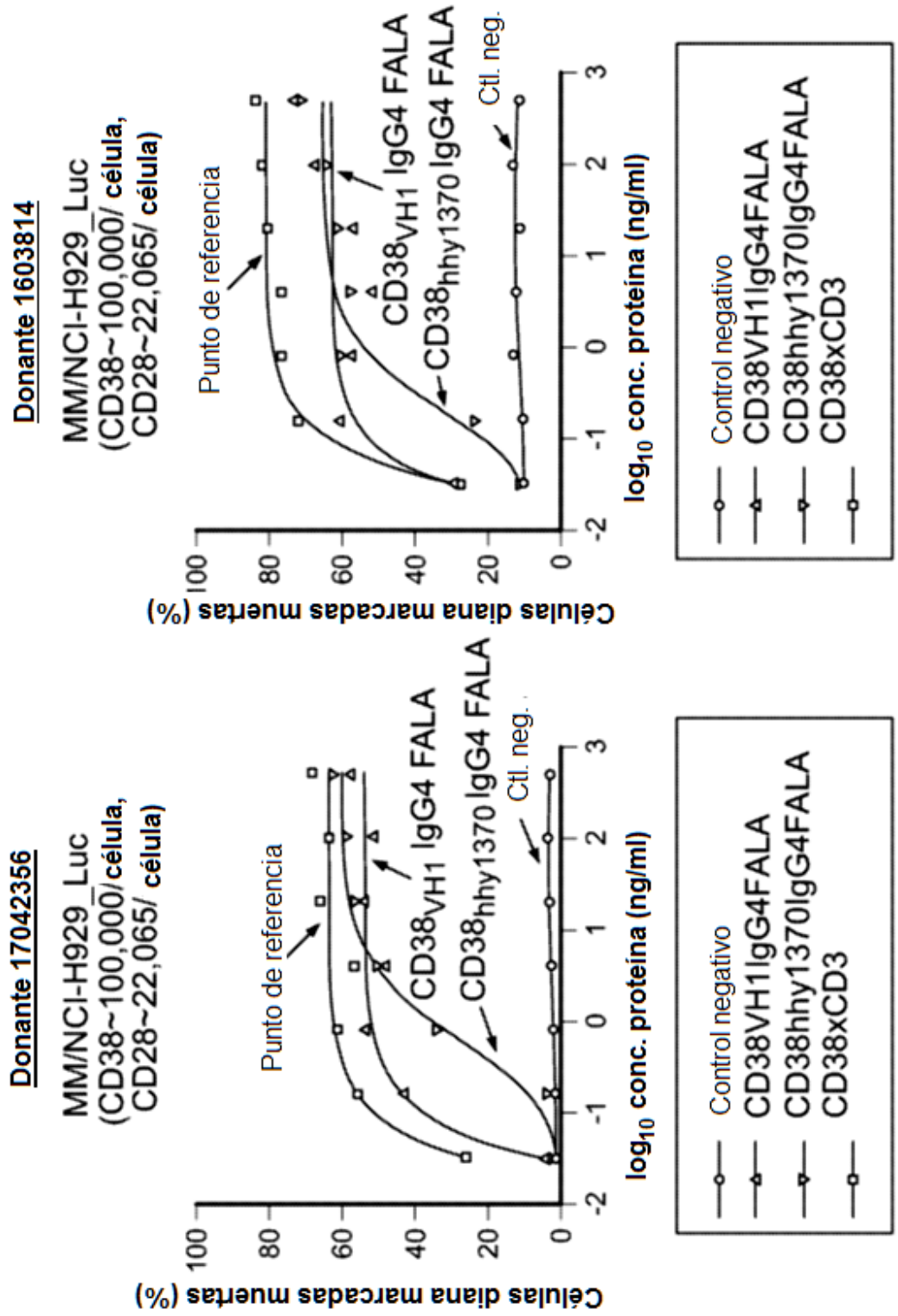


FIG. 23A

FIG. 23B

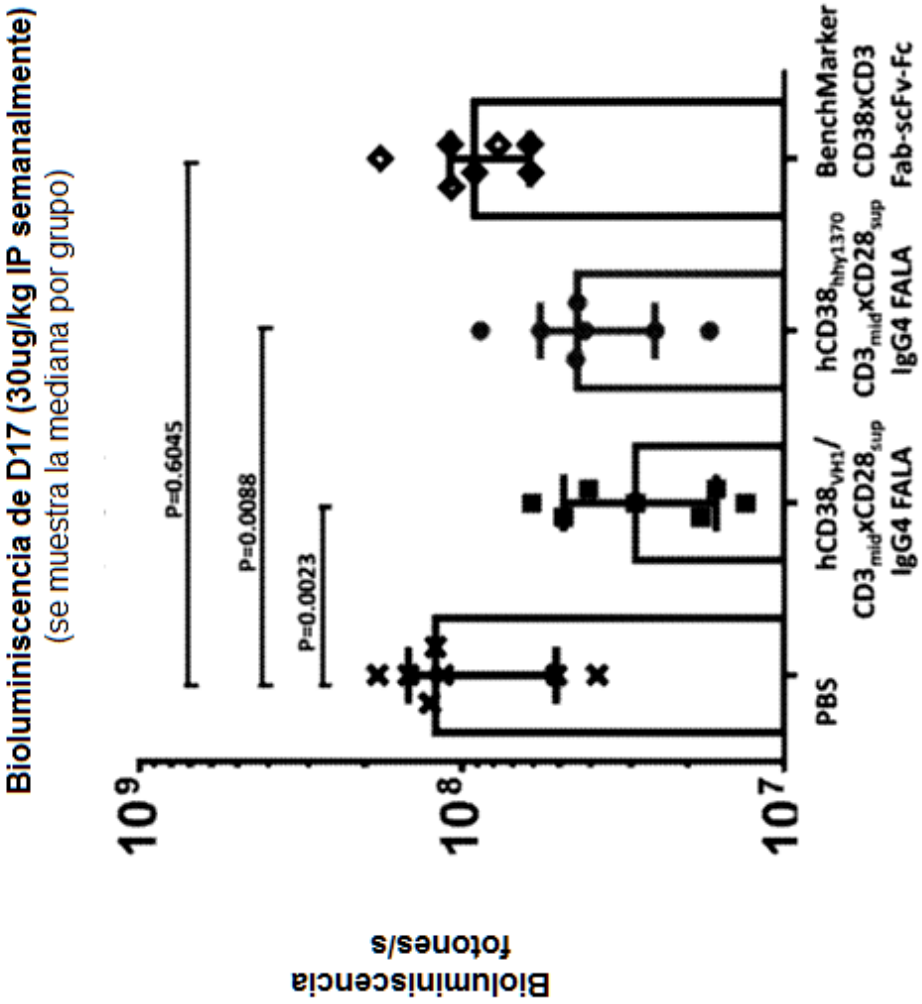

Bioluminiscencia de D17 (30ug/kg IP semanalmente)
(se muestra la mediana por grupo)
Bioluminiscencia
fotones/s
10^9
10^8
10^7
P=0.6045
P=0.0088
P=0.0023
PBS
hCD38VH1/
CD3midxCD28sup
IgG4 FALA
hCD38hhy1370
CD3midxCD28sup
IgG4 FALA
BenchMarker
CD38xCD3
Fab-scFv-Fc

FIG. 23C

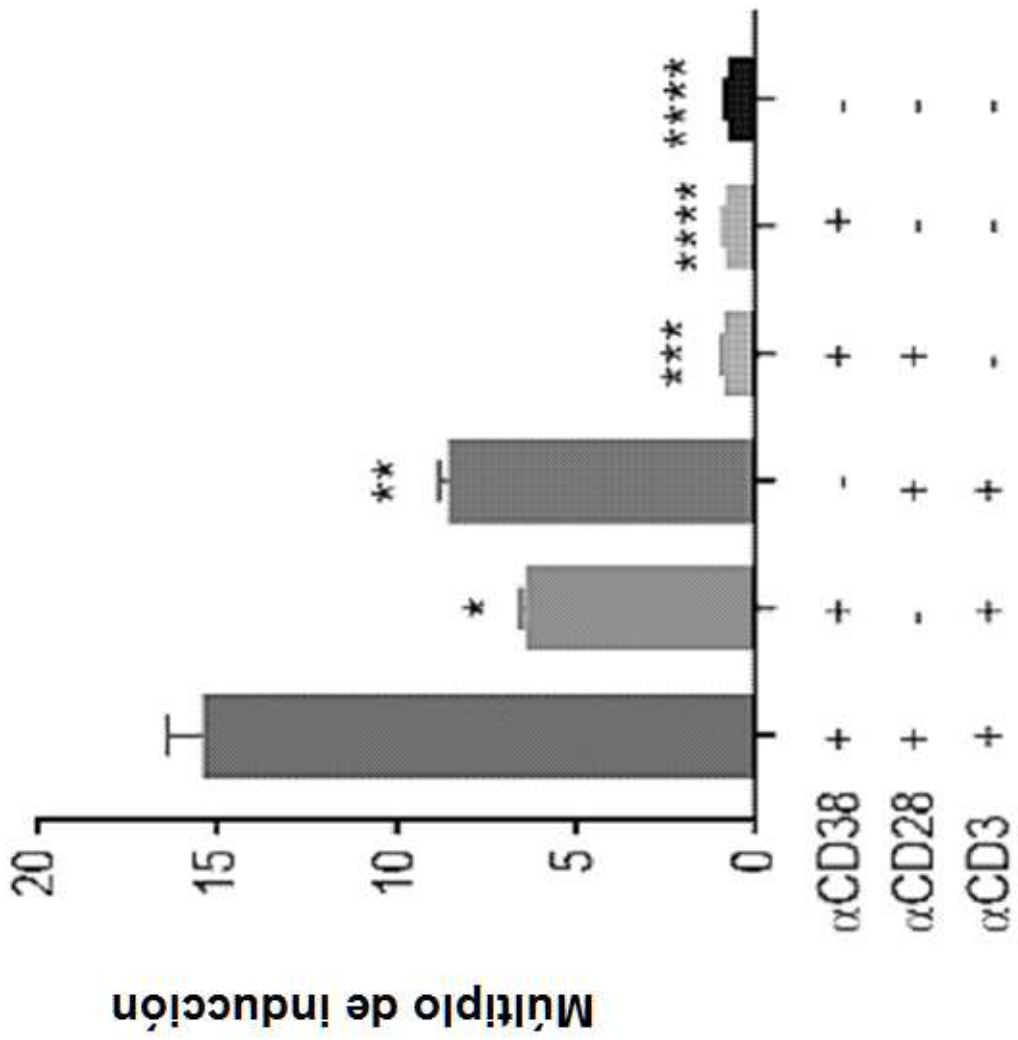


FIG. 24A

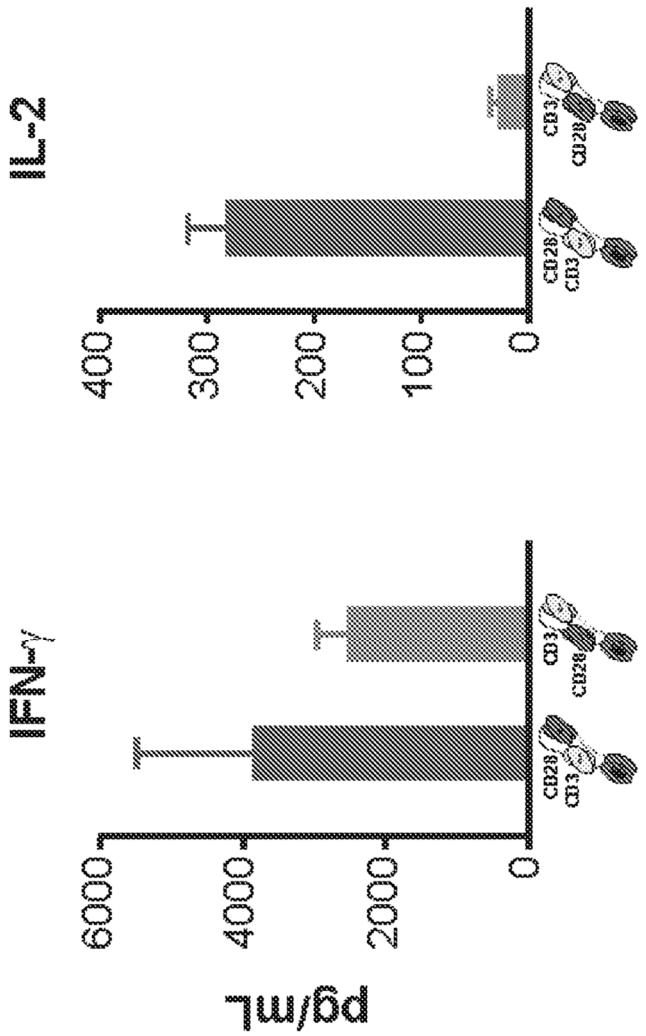

IL-2
400
300
200
100
0
T
CD28
CD3
CD3
CD28
IFN-γ
6000
4000
2000
0
pg/mL
T
CD28
CD3
CD3
CD28

FIG. 24B

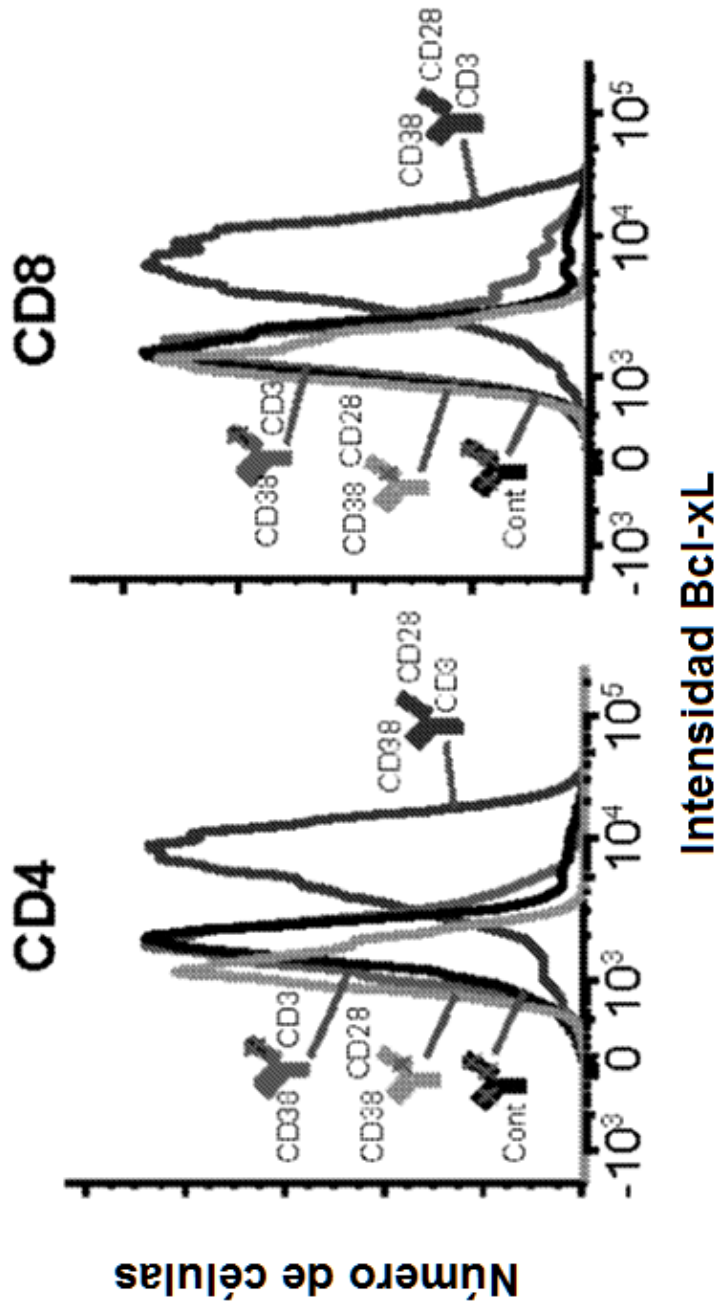

CD4
CD8
Número de células
Intensidad Bcl-xL
CD38 CD3
CD38 CD28
Cont
CD38 CD28 CD3
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵

FIG. 25

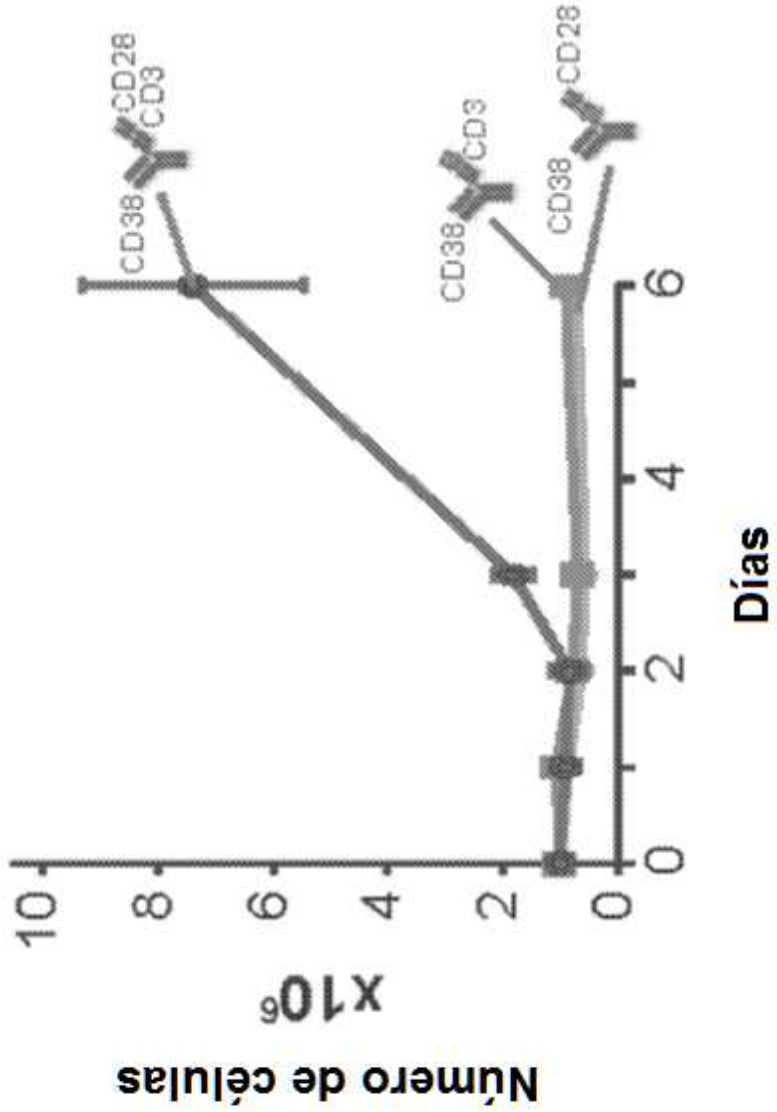

Número de células
x10⁶
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
Días
CD38
CD3
CD28
CD38
CD3
CD28

FIG. 26

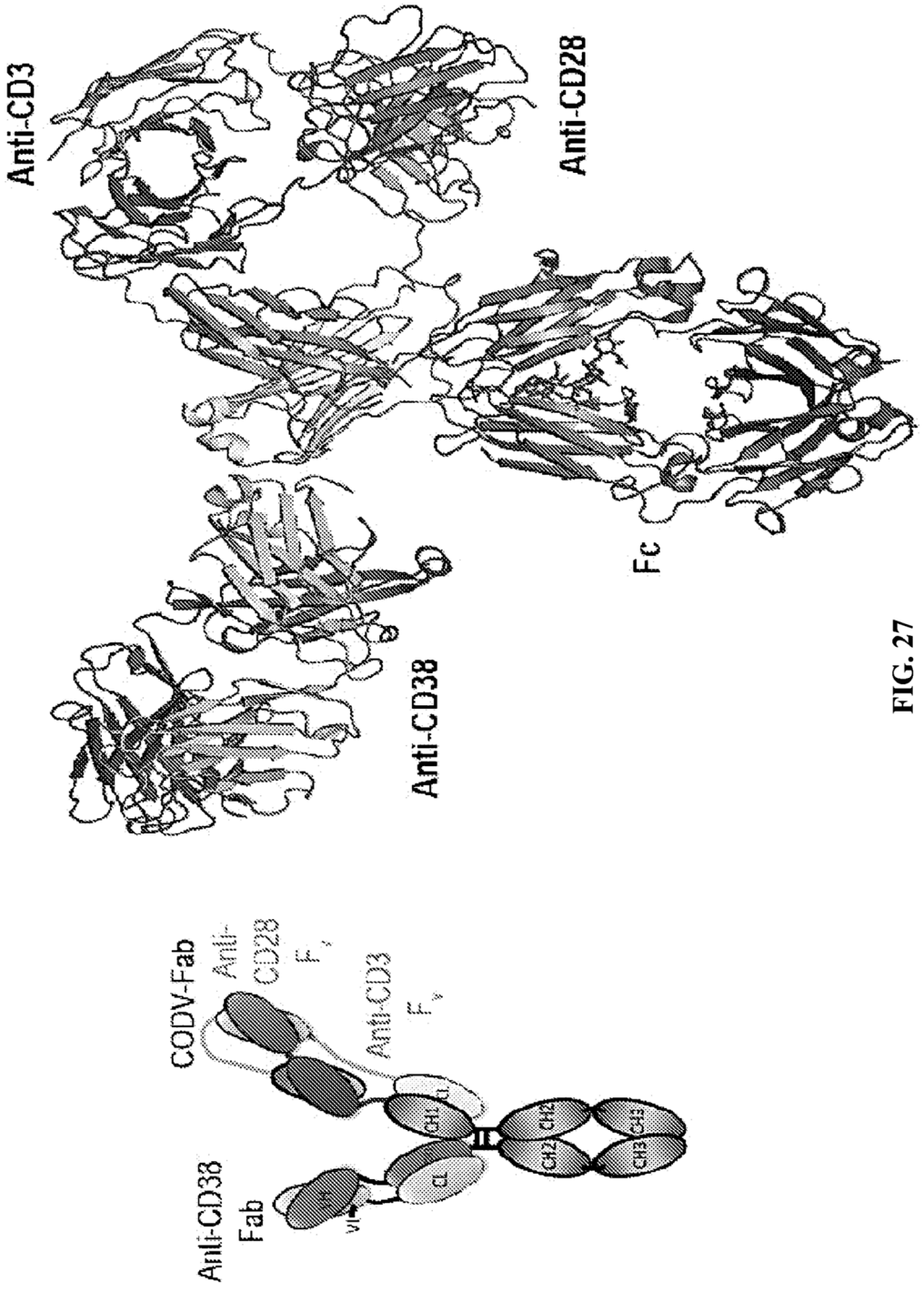

Anti-CD3
Anti-CD28
Anti-CD38
Fc
CODV-Fab
Anti-CD38 Fab
Anti-CD28 Fv
Anti-CD3 Fv
VH
CH1
CL
CH2
CH3

FIG. 27

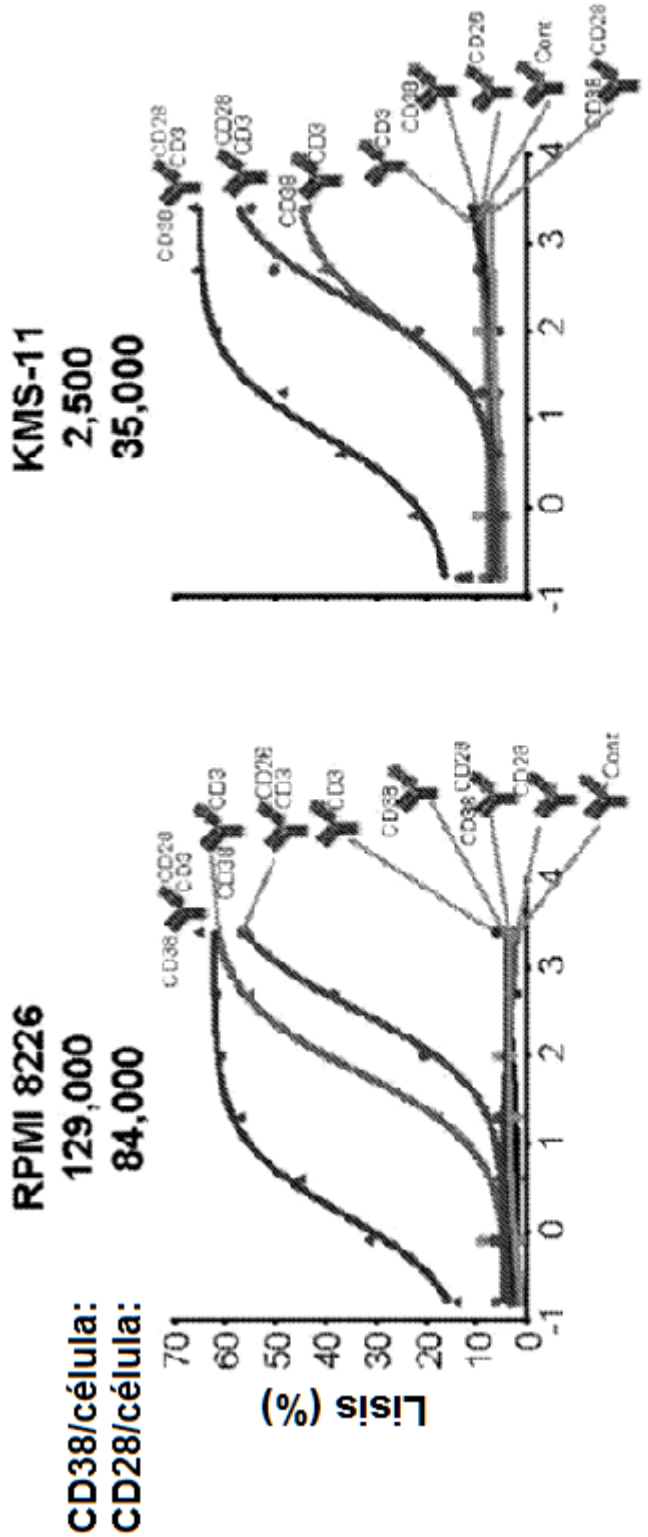


FIG. 28A

FIG. 28B

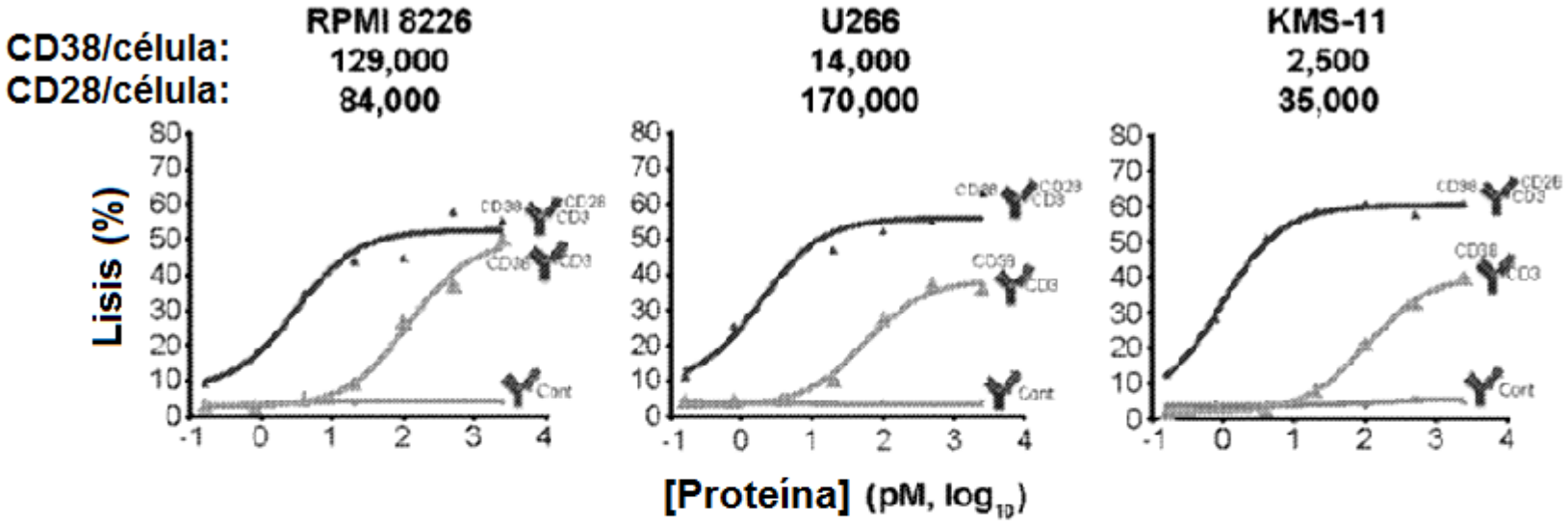


FIG. 29A FIG. 29B FIG. 29C

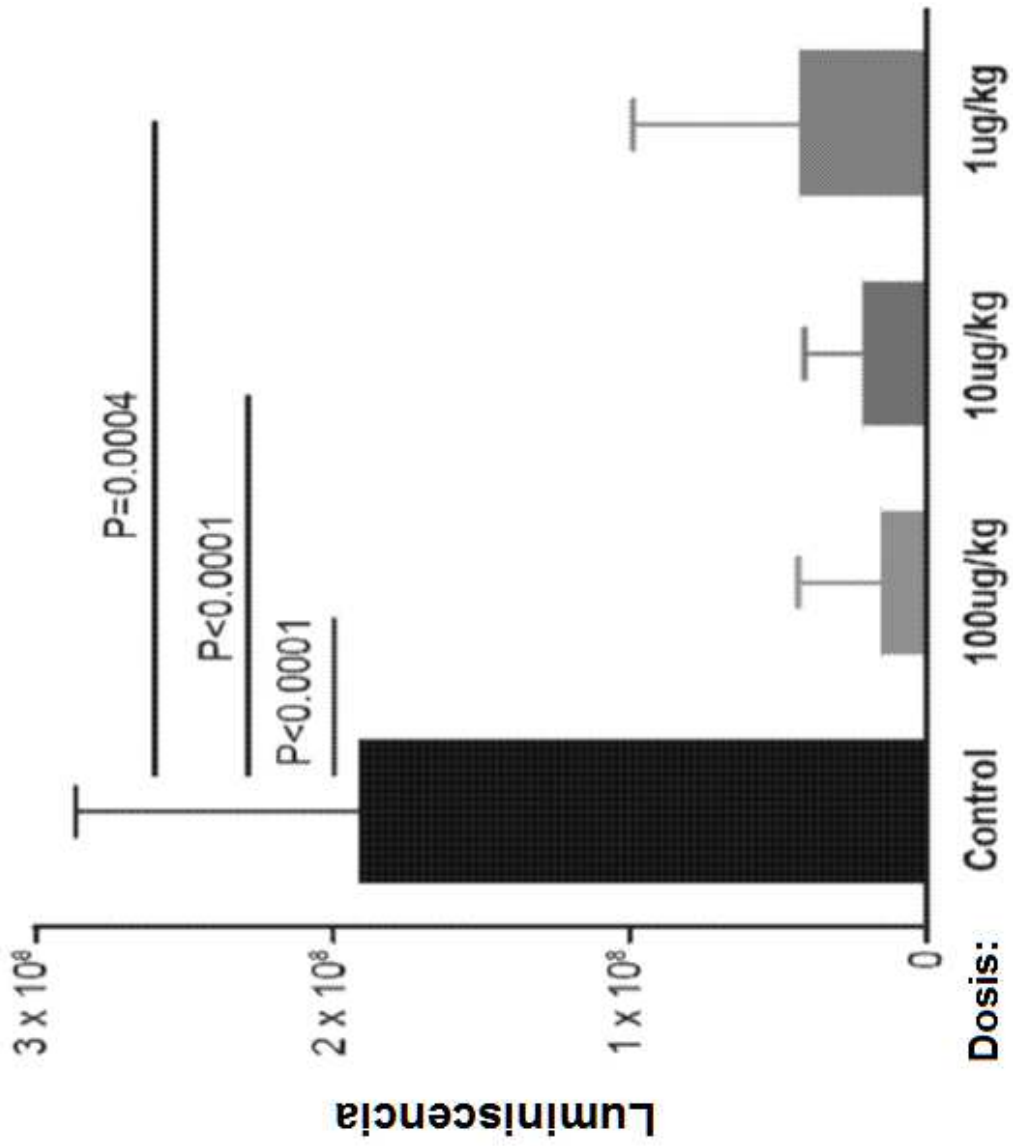

Luminiscencia
3 x 10⁸
2 x 10⁸
1 x 10⁸
0
P=0.0004
P<0.0001
P<0.0001
Dosis:
Control
100ug/kg
10ug/kg
1ug/kg

FIG. 30

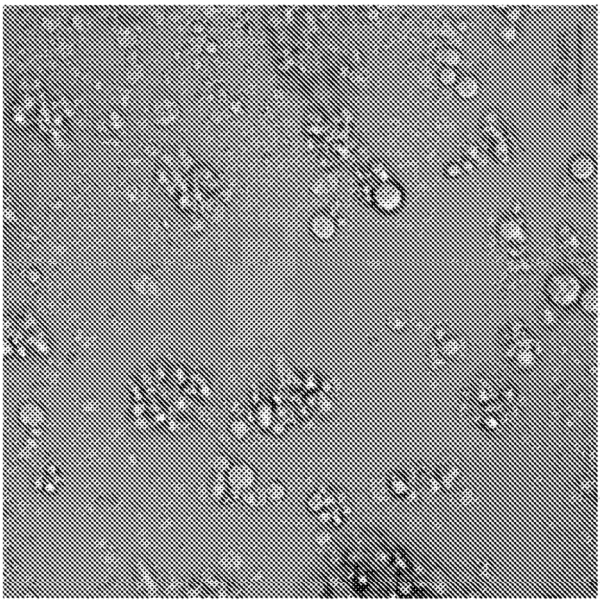


FIG. 31B

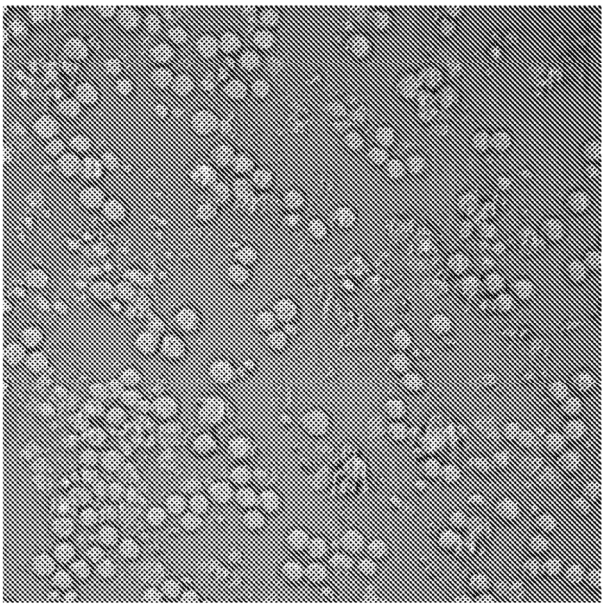


FIG. 31A

	Tipo natural
IgG1	CPPCPAPELLGGPS
IgG2	CPPCPAPPVAG-PS
IgG4	CPPCPAPEFLGGPS
	Mutante
IgG1 LALA/P239A	CPPCPAPEAAGGPS
IgG4 PVA	CPPCPAPVAG-PS
IgG4 FALA	CPPCPAAPEAAGGPS

FIG. 32

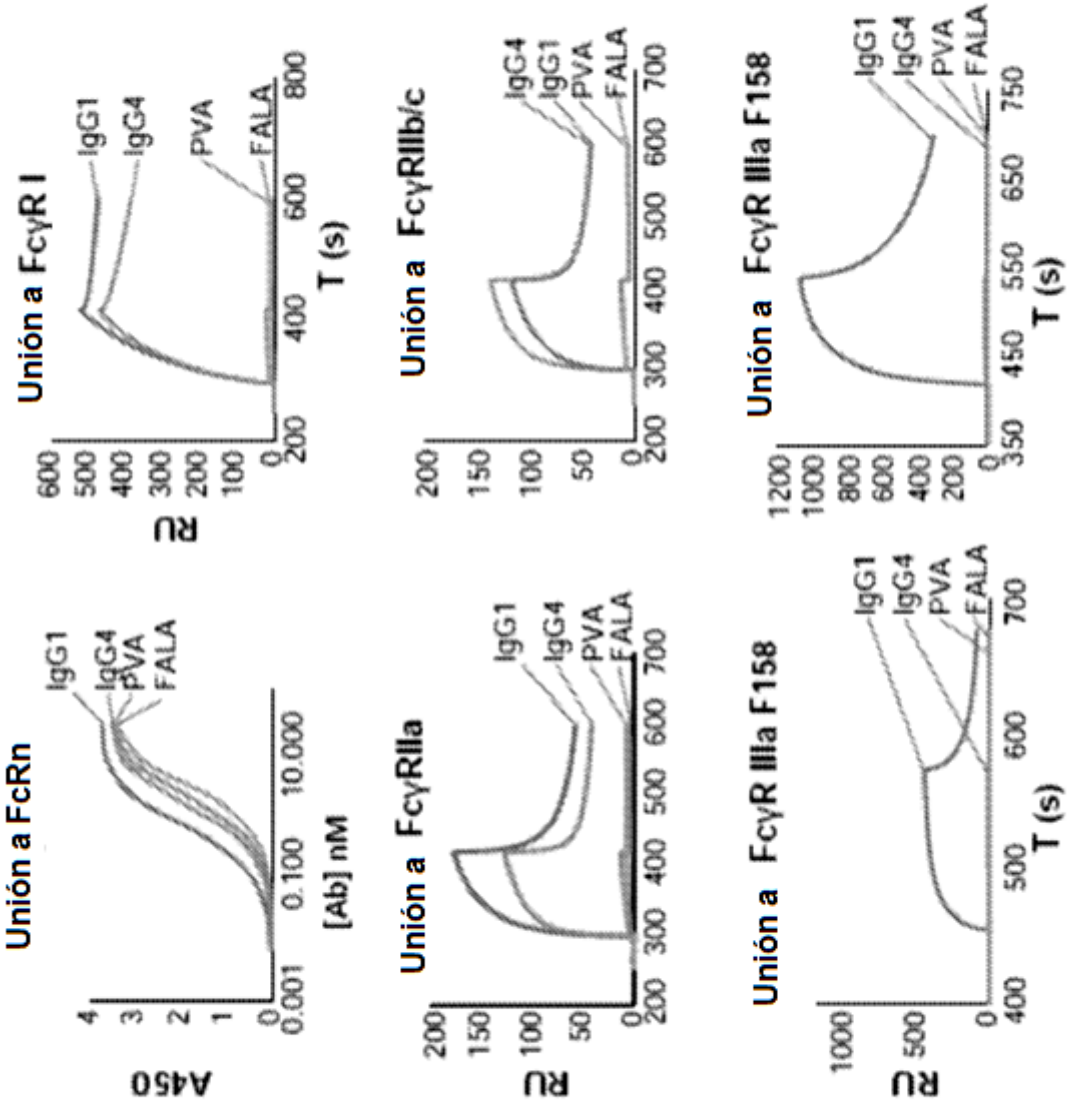

Unión a FcRn
A450
[Ab] nM
IgG1
IgG4
PVA
FALA
Unión a FcγR I
RU
T (s)
Unión a FcγRIIa
Unión a FcγRIIb/c
Unión a FcγR IIIa F158
Unión a FcγR IIIa F158

FIG. 33

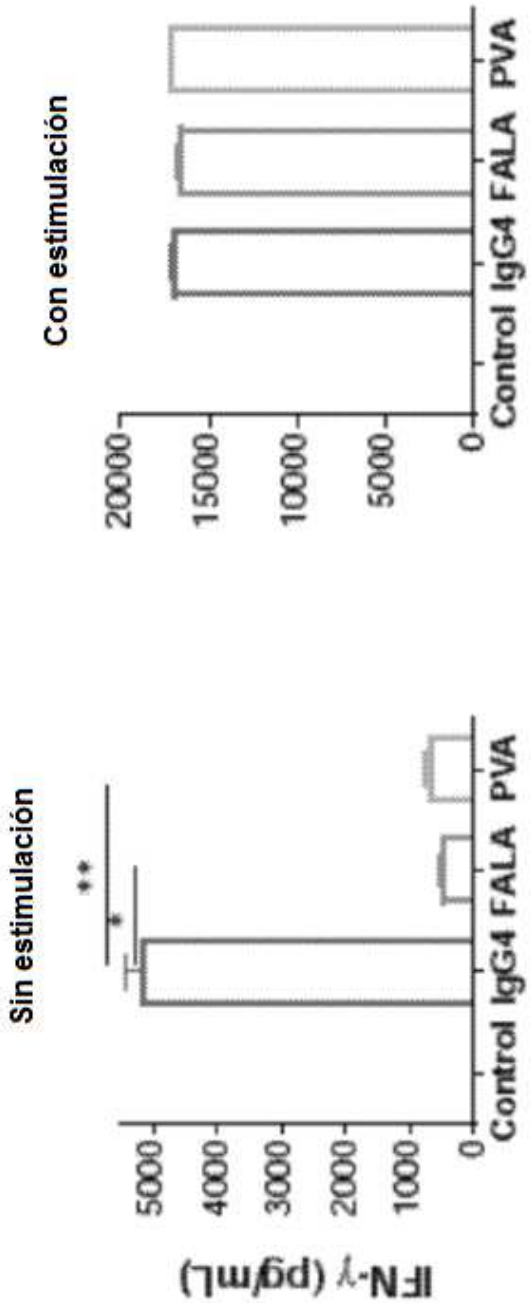

Sin estimulación
Con estimulación
IFN-γ (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
20000
15000
10000
5000
0
**
*
Control IgG4
FALA
PVA

FIG. 34

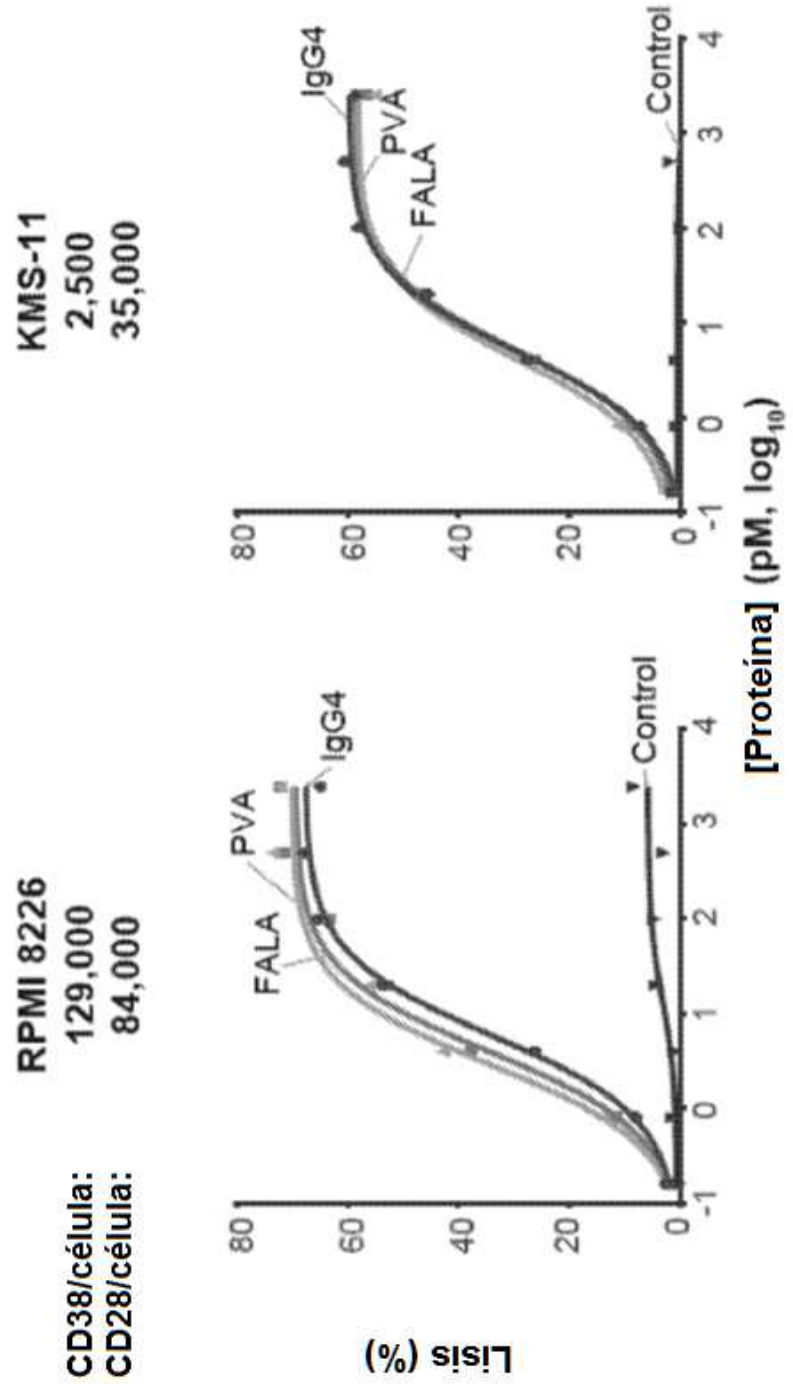

RPMI 8226
CD38/célula: 129,000
CD28/célula: 84,000
KMS-11
2,500
35,000
Lisis (%)
[Proteína] (pM, log10)
IgG4
PVA
FALA
Control
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4

FIG. 35

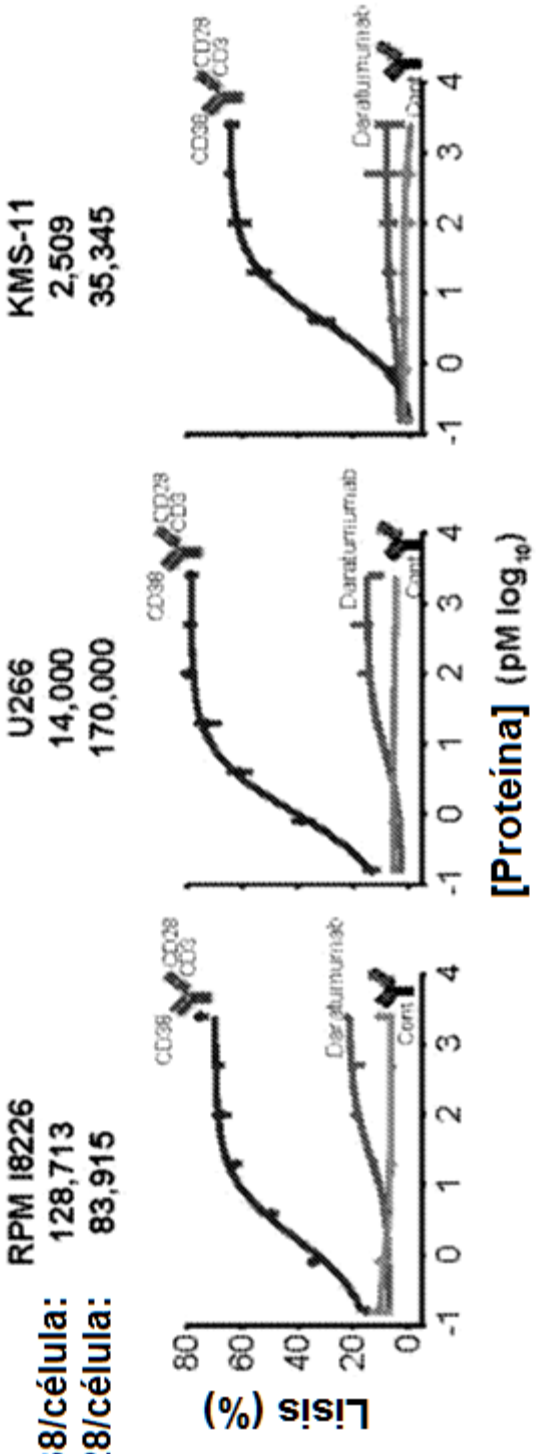

RPM I8226
CD38/célula: 128,713
CD28/célula: 83,915
U266
14,000
170,000
KMS-11
2,509
35,345
Lisis (%)
[Proteína] (pM log10)
CD38
CD38 CD28 CD3
Daratumumab
Cont

FIG. 36

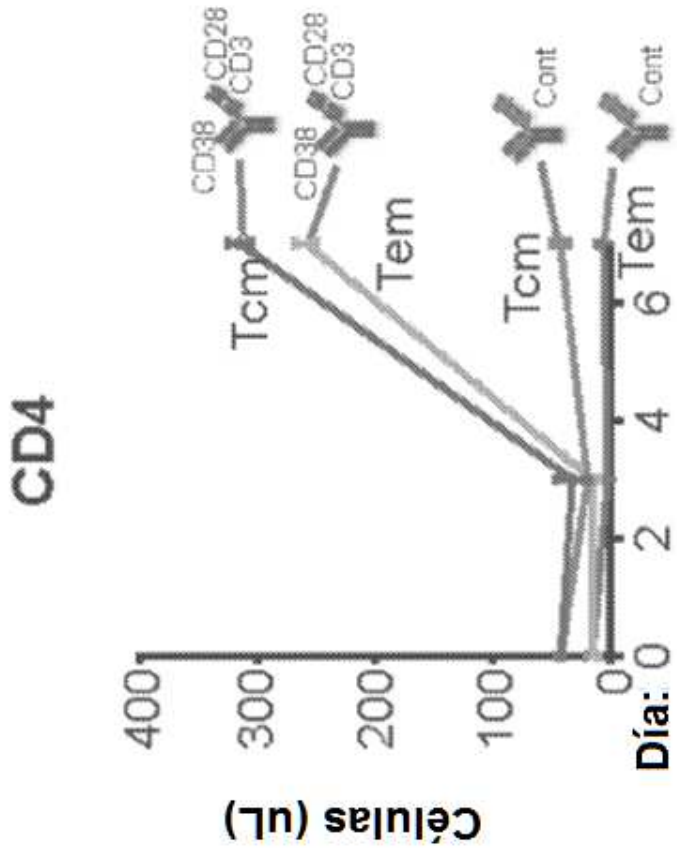

CD4
Células (uL)
400
300
200
100
0
Día: 0
2
4
6
Tcm
Tem
Tcm
Tem
CD38
CD28
CD3
CD38
CD28
CD3
Cont
Cont

FIG. 37A

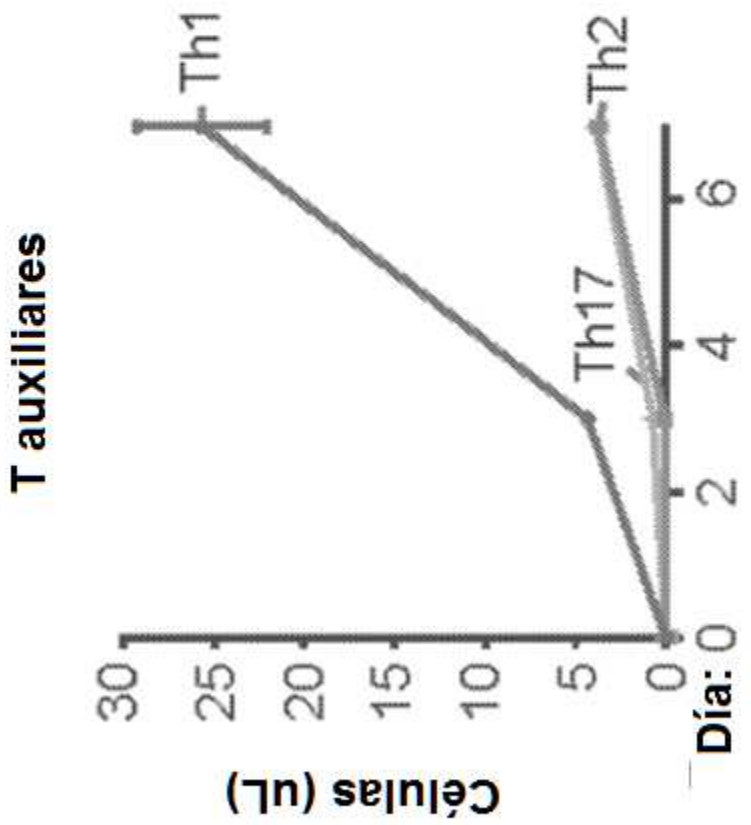


FIG. 37B

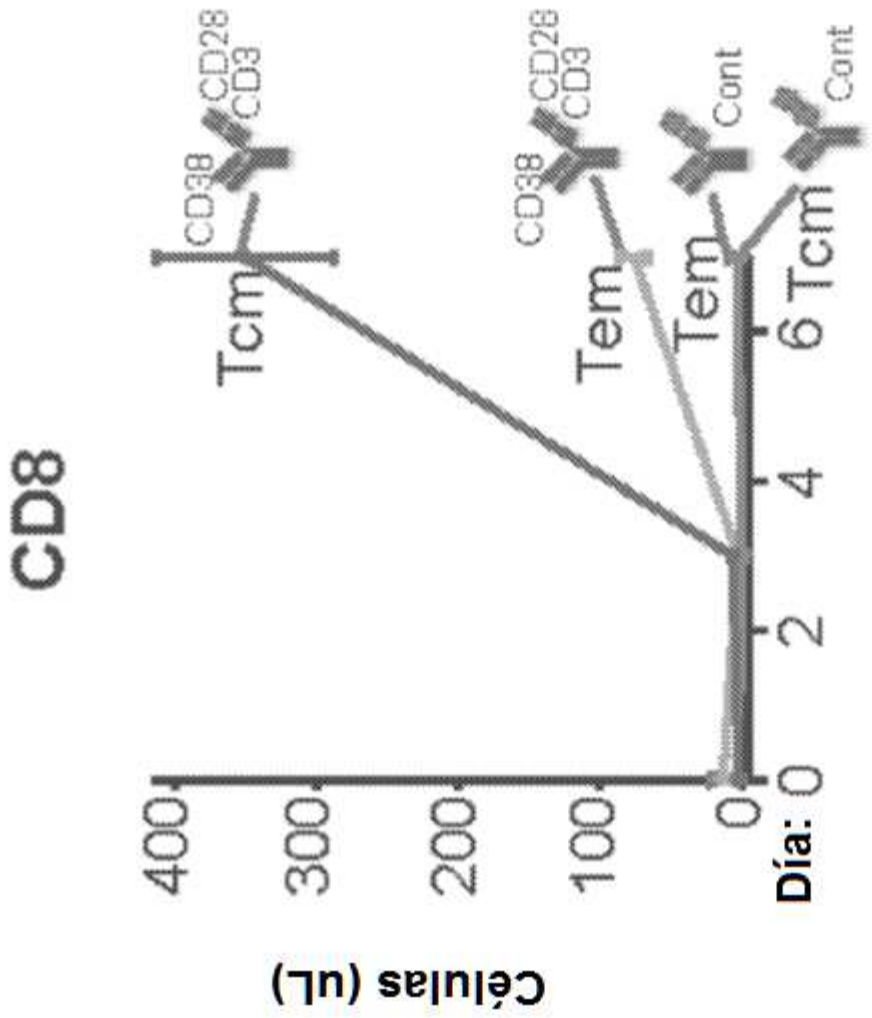

CD8
Células (uL)
400
300
200
100
0
Día: 0
2
4
6
Tcm
Tem
Tem
Tcm
CD38
CD28
CD3
CD38
CD28
CD3
Cont
Cont

FIG. 37C

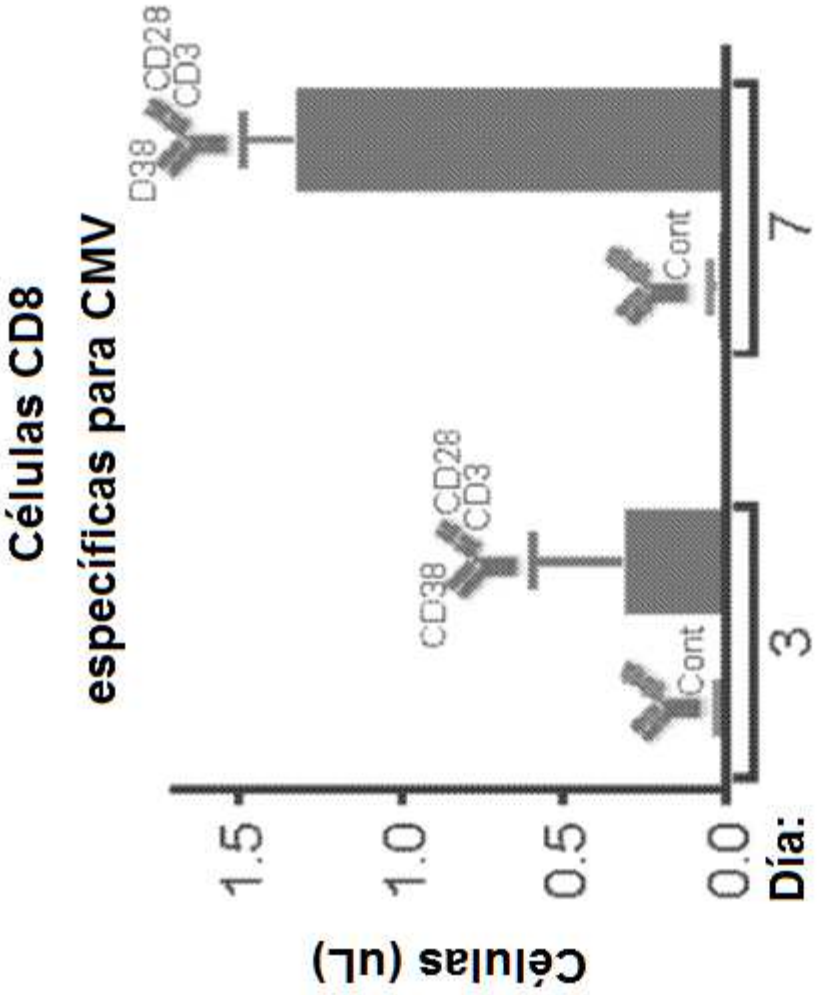

Células CD8
específicas para CMV
Células (uL)
1.5
1.0
0.5
0.0
Día:
3
7
Cont
CD38
CD28
CD3

FIG. 37D

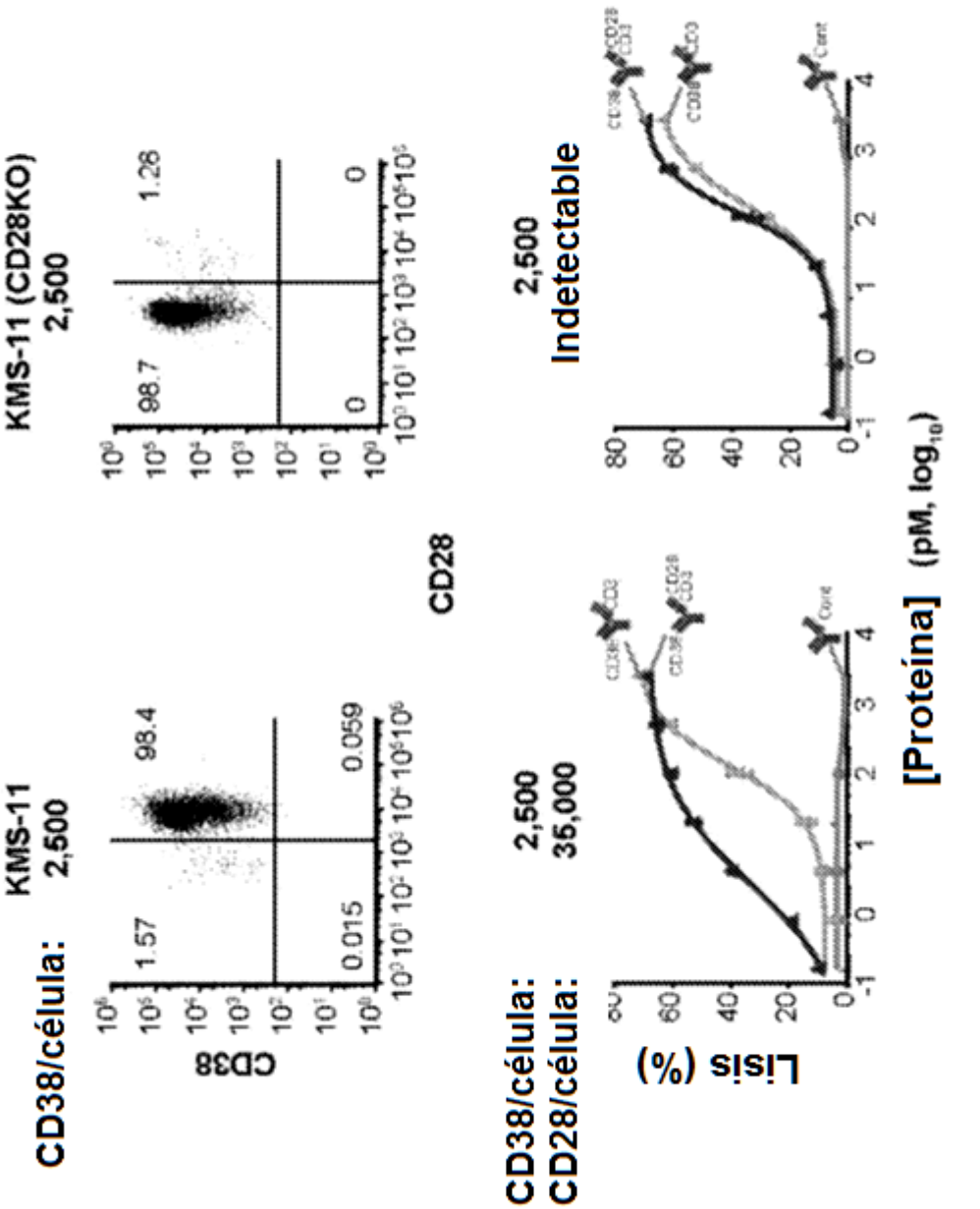

KMS-11
CD38/célula: 2,500
CD38
CD28
1.57
98.4
0.015
0.059
KMS-11 (CD28KO)
2,500
98.7
1.26
0
0
CD38/célula: 2,500
CD28/célula: 35,000
2,500
Indetectable
Lisis (%)
[Proteína] (pM, log10)

FIG. 38

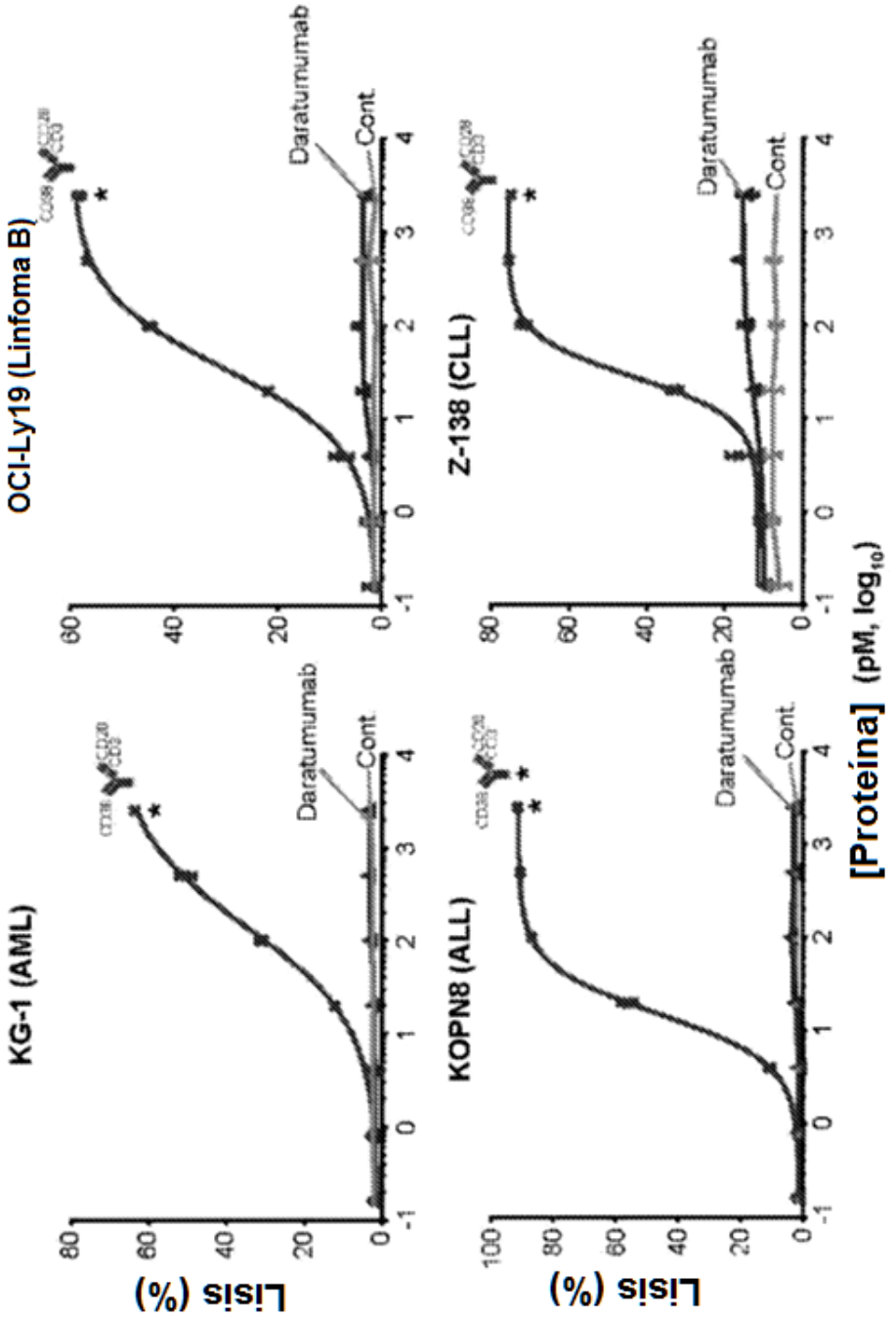

KG-1 (AML)
OCI-Ly19 (Linfoma B)
KOPN8 (ALL)
Z-138 (CLL)
Daratumumab
Cont.
Lisis (%)
[Proteína] (pM, log10)

FIG. 39

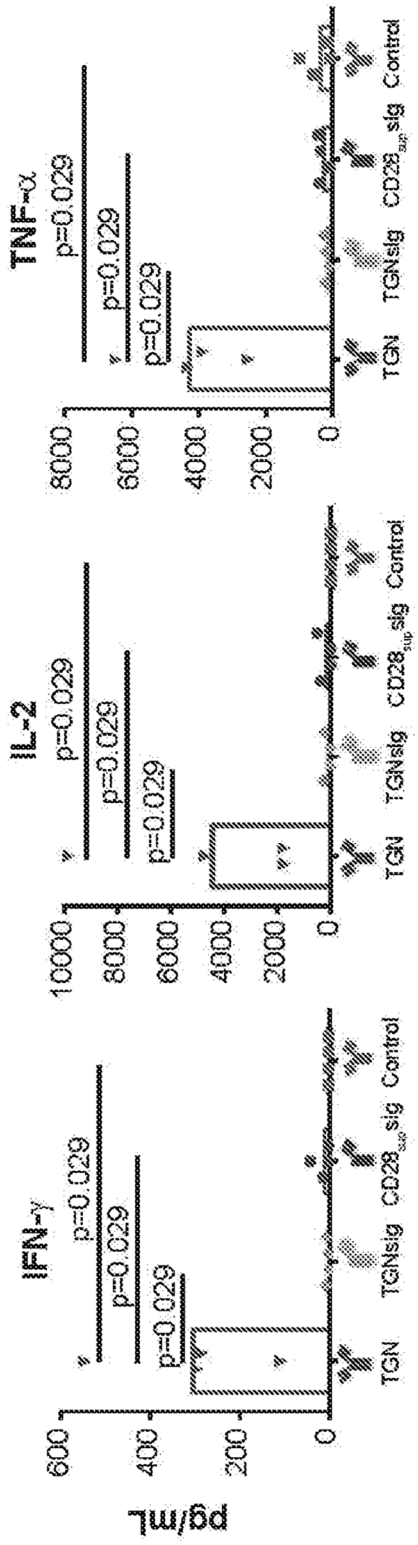


FIG. 40