

COMBITERAPIAS DE ANTI-CD20 X ANTI-CD28

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [0001] La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense n.º 63/579,267 presentada el 28 de agosto de 2023, titulada «*Anti-CD20 X Anti-CD28 Combination Therapies*» (Combiterapias de anti-CD20 X anti-CD28), que se incorpora en la presente memoria a modo de referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 [0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó de forma electrónica en formato XML y se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. Dicha copia XML, creada el 22 de agosto de 2024, se denomina 067461-5318-WO_SL.xml y tiene un tamaño de 640,102 bytes.

15 ANTECEDENTES

[0003] La molécula CD20 (también llamada antígenos de diferenciación restringido de linfocitos B humanos o Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD ubicada en los linfocitos pre-B y B maduros. La CD20 se encuentra en la superficie de más del 90 % de los linfocitos B de la sangre periférica o
20 de los órganos linfoides y se expresa durante el desarrollo temprano de los linfocitos pre-B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. La CD20 está presente tanto en los linfocitos B normales como en los malignos, incluidos ciertos tipos de linfomas y leucemias de linfocitos B. En particular, la CD20 se expresa en más del 90 % de los linfomas no Hodgkin (LNH, por sus siglas en inglés) de linfocitos B, pero no se encuentra
25 en células madre hematopoyéticas, linfocitos pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales.

[0004] La CD28 es una proteína transmembrana tipo I expresada en la superficie de los linfocitos T que tiene un único dominio extracelular similar a Ig-V ensamblado como un homodímero. La CD28 es el receptor de las proteínas CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) y es
30 activada por CD80 o CD86 expresado en las CPA. La unión de CD28 a CD80 o CD86 proporciona señales coestimuladoras importantes para la activación y supervivencia de los linfocitos T. La estimulación de los linfocitos T a través de CD28 además del receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) proporciona una señal potente para la producción de varias interleucinas. La CD28 potencia señales celulares como las vías controladas por

el factor de transcripción NFκB después de la activación del TCR. La coseñal CD28 es importante para la activación efectiva de los linfocitos T, como la diferenciación de linfocitos T, la proliferación, la liberación de citocinas y la muerte celular.

[0005] Las terapias basadas en anticuerpos se han utilizado con éxito para tratar una variedad de enfermedades, incluido el cáncer. Una vía cada vez más explorada es la ingeniería de moléculas de inmunoglobulina individuales que interactúan con dos antígenos diferentes. Estos formatos de anticuerpos alternativos que interactúan con dos antígenos diferentes a menudo se denominan anticuerpos biespecíficos. Un enfoque particular para los anticuerpos biespecíficos es diseñar un primer dominio de unión que interactúe con CD28 y un segundo dominio de unión que interactúe con un antígeno asociado o regulado positivamente en las células cancerosas (por ejemplo, CD20) de modo que el anticuerpo biespecífico redirija los linfocitos T para destruir las células cancerosas. Las moléculas de unión a antígenos biespecíficos que se unen tanto a CD28 como a un antígeno objetivo (como CD20) serían útiles en entornos terapéuticos en los que se desea la orientación específica y la muerte mediada por linfocitos T de las células que expresan el antígeno objetivo. También existe la necesidad de un anticuerpo anti-CD20 X anti-CD28 que sea seguro para su uso en una composición farmacéutica.

COMPENDIO

[0006] En la presente memoria se proporcionan nuevos anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 y métodos de uso de dichos anticuerpos para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B. Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 son capaces de unirse a las moléculas coestimuladoras CD28 en los linfocitos T y a CD20 en los linfocitos B. Los anticuerpos objeto de la presente memoria son particularmente útiles en combinación con otros anticuerpos que interactúan con los linfocitos T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 x anti-CD20 x anti-CD79b) para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B.

[0007] En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende:

- (a) un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20, donde el primer dominio de unión a antígenos comprende:
 - (i) una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (vhCDR1), una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

443;

(ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;

(iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459.

(iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

(vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;

(vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

(viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3

de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;

(ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;

(x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;

(xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484;

(xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;

(xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;

(xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495, y una región

determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o

(xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498; y

(b) un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, donde el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

(i) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 5;

(vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;

(x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;

(xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3

de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;

(xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;

(xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;

(xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;

(xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;

(xvii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;

(xviii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;

(xix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367, y una región

determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;

5 (xx) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380;

10 (xxi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395;

15 (xxii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;

20 (xxiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;

25 (xxiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;

30 (xxv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(xxvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable

(VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

5 **[0008]** En otra modalidad, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 y un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, y donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

10 (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446;

(ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

(iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

(iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

[0009] En otra modalidad, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 y un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, y donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

(i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;

10 (ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;

(iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459;

15 (iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(v) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

(vi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;

20 (vii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

(viii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;

25 (ix) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;

(x) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;

(xi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484;

30 (xii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(xiii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;

(xiv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y un VL1 que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;
- (xv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (xvi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y un VL1 que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498; y
- (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 15 (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- 25 (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;
- (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (xiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;
- (xiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;

- (xv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;
- (xvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;
- 5 (xvii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xviii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y un VL2 que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;
- (xx) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (xxi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395;
- 15 (xxii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;
- (xxiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;
- (xxiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y un VL2
- 20 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;
- (xxv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (xxvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.
- 25 **[0010]** En otra modalidad, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 y un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, y donde:
- (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:
- 30 (i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;
- (ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;
- (iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o

(iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

- 5 (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que
10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- 15 (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que
20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- 25 (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

[0011] En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o un fragmento de
30 anticuerpo de este que comprende un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20, y un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, y donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

10

[0012] En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20, y un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, y donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

[0013] En otra modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende:

a) un primer monómero que comprende, desde el extremo N al extremo C, un VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, donde el VH1 es el primer dominio de cadena pesada variable y CH2-CH3 es un primer dominio Fc; y

b) un segundo monómero que comprende:

i) un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un segundo dominio de cadena pesada variable (VH2), un conector y un segundo dominio de cadena ligera variable (VL2), y

ii) un segundo dominio Fc, donde el scFv está unido covalentemente al extremo N del segundo dominio Fc mediante el uso de un conector de dominio;

c) una cadena ligera que comprende, desde el extremo N al extremo C, VL1-CL, donde VL1 es el primer dominio de cadena ligera variable y CL es un dominio de cadena ligera constante,

donde el VH1 y el VL1 juntos forman un primer dominio de unión a antígenos y el VH2 y el

30

VL2 juntos forman un segundo dominio de unión, y

donde el primer dominio de unión a antígenos se une a CD20 y el segundo dominio de unión a antígenos se une a CD28.

[0014] También se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar una neoplasia

5 maligna de linfocitos B. En una modalidad, un método para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de este y un ligador de linfocitos T, donde:

(A) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de este comprende:

10 (a) un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446;

(ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

(iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

(iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470; y

(b) un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28 que comprende:

- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;
- (ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;
- (iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;
- (iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;
- (v) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (vi) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y

(B) el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo de este.

[0015] En una modalidad, se proporciona en la presente memoria un método para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente: A) anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 que comprende: i) un primer dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH1 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (b) un VL1 que comprende una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445 y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y ii) un segundo dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH2 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) un VL2 que comprende una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y B) un ligador de linfocitos T, donde el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende: (a) un dominio de unión a antígenos que se une a CD79b que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 524, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 525 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 526; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 528, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 529 y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 530; (b) un dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 540, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 541 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 542; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 544, una vICDR2

que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 545 y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 546; y (c) un dominio de unión a antígenos que se une a CD3 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 532, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 533 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 534; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 536, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 537 y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 538.

[0016] En otra modalidad, se proporciona en la presente memoria un método para mejorar la proliferación de linfocitos T que comprende poner en contacto a las células con: A) anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 que comprende: i) un primer dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH1 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (b) un VL1 que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y ii) un segundo dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH2 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) un VL2 que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y B) un ligador de linfocitos T, donde el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende: (a) un dominio de unión a antígenos que se une a CD79b que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 524, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 525 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 526; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 528, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 529 y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 530; (b) un dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 540,

una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 541 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 542; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 544, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 545 y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 546; y (c) un dominio de unión a antígenos que se une a CD3 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 532, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 533 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 534; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 536, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 537 y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 538.

[0017]En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 comprende: i) un primer monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 520; ii) un segundo monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 521; y iii) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 522.

[0018]En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo heterodimérico que comprende: i) un primer monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461; ii) un segundo monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 469; y iii) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019]Las figuras 1A y 1B representan las secuencias del CD28 humano, de ratón y de macaco cangrejero. Dichos CD28 son útiles para el desarrollo de dominios de unión a antígenos CD28 reactivos cruzados para facilitar el desarrollo clínico.

[0020]La figura 2 muestra las secuencias de CD20 humano, de ratón y de macaco cangrejero. Dichos CD20 son útiles para el desarrollo de dominios de unión a antígenos CD20 reactivos cruzados para facilitar el desarrollo clínico.

[0021]Las figuras 3A-3F representan pares útiles de conjuntos de variantes de heterodimerización (incluidas las variantes sesgadas y pl). En la figura 3F, hay variantes para las cuales no hay variantes «monómero 2» correspondientes. Estas variantes son variantes pl que se pueden utilizar solas en cualquier monómero de un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, bsAb CD20 x CD28), o incluirse, por ejemplo, en el lado que no

es scFv de un formato que utiliza un scFv como componente y se puede utilizar un conector scFv cargado apropiado en el segundo monómero que utiliza un scFv como dominio de unión a CD28. Los enlaces cargados adecuados se muestran en la figura 6.

[0022] La figura 4 muestra una lista de regiones constantes de anticuerpos variantes isostéricas y sus respectivas sustituciones. pl₋(-) indica variantes de pl más bajas, mientras que pl₊(+) indica variantes de pl más altas. Estas variantes se pueden combinar opcional e independientemente con otras variantes, incluidas las variantes de heterodimerización, descritas en la presente memoria.

[0023] La figura 5 muestra variantes de ablación útiles que eliminan la unión de FcγR (también conocidas como variantes «*knockout*» o «KO»). En algunas modalidades, dichas variantes de ablación se incluyen en el dominio Fc de ambos monómeros del anticuerpo objeto que se describe en la presente memoria. En otras modalidades, las variantes de ablación solo se incluyen en un solo dominio Fc variante.

[0024] La figura 6 muestra una serie de enlaces scFv cargados que se utilizan para aumentar o disminuir el pl de los anticuerpos biespecíficos heterodiméricos en cuestión que utilizan uno o más scFv como componente, como se describe en la presente memoria (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos CD20 x CD28 (bsAb, por sus siglas en inglés)). El conector positivo (+H) tiene un uso particular en la presente memoria, particularmente con las secuencias VL y VH anti-CD28 que se muestran en la presente memoria. Un único conector scFv de técnica anterior con una única carga se denomina «Whitlow», de Whitlow y cols., *Protein Engineering* 6(8):989-995 (1993). Cabe señalar que este conector se utilizó para reducir la agregación y mejorar la estabilidad proteolítica en scFv. Dichos enlaces scFv cargados se pueden utilizar en cualquiera de los formatos de anticuerpos descritos en la presente memoria que incluyen scFv (por ejemplo, formatos 1 + 1 Fab-scFv-Fc y 2 + 1 Fab2-scFv-Fc).

[0025] Las figuras 7A y 7B representan varios conectores de dominio de ejemplo. En algunas modalidades, estos conectores se utilizan al unir un Fv de cadena sencilla a una cadena Fc. En algunas modalidades, estos conectores pueden combinarse en cualquier orientación. Por ejemplo, un conector GGGGS (SEQ ID NO: 57) puede combinarse con un conector de «bisagra de mitad inferior» en el extremo N o en el extremo C.

[0026] La figura 8 muestra plataformas de anticuerpos biespecíficos particularmente útiles para los anticuerpos biespecíficos CD20 x CD28 (bsAb) de la invención. Aunque las plataformas se describen en la presente memoria en el contexto del formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc, se pueden adaptar para su uso en otros formatos de anticuerpos biespecíficos.

[0027] La figura 9 muestra varias sustituciones de aminoácidos de variantes sesgadas heterodiméricas que se pueden utilizar con los anticuerpos heterodímeros descritos en la presente memoria.

[0028] Las figuras 10A-10E muestran las secuencias de varias estructuras bsAb heterodiméricas CD20 x CD28 útiles basadas en IgG1 humana, sin los dominios variables.

5 La cadena principal del Fc heterodimérico 1 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M) e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La cadena principal del

10 Fc heterodimérico 2 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en

15 ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 3 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas L368E/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, la variante sesgada S364K en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La cadena principal del Fc

20 heterodimérico 4 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas K360E/Q362E/T411E y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, la variante sesgada D401K en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes sesgadas de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La cadena principal del Fc

25 heterodimérico 5 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356D/358L), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S Q295E/N384D/Q418E/N421D variantes pl en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 6 se basa en la IgG1 humana

30 (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y la variante N297A que elimina la glicosilación en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 7 se basa en la

IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y la variante N297S que

5 elimina la glicosilación en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 8 se basa en IgG4 humana e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico y la variante S228P (según la numeración de la UE, S241P en Kabat) que elimina el intercambio del brazo Fab

10 (como se conoce en la técnica) en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 9 se basa en IgG2 humana e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, y las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico. La cadena principal del Fc heterodimérico 10 se base en la IgG2 humana,

15 e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variante pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y la variante de ablación S267K en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 11 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y

20 las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes Xtend M428L/N434S en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 12 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes

25 sesgadas L368D/K370S en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes pl P217R/P229R/N276K en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 13 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M) e incluye la variante sesgada T366W en una primera cadena del Fc

30 heterodimérico, las variantes sesgadas T366S/L368A/Y407V y las variantes de purificación H435R/Y436F en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación L234A/L235A/D265S en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 14 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye la variante sesgada T366W en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas T366S/L368A/Y407V y las

variantes de purificación H435R/Y436F en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación L234A/L235A/D265S y las variantes de extensión de la semivida M252Y/S254T/T256E en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 15 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356D/358L), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes M428L/N434S Xtend en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 16 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes M428L/N434A Xtend en ambas cadenas. La cadena principal del Fc heterodimérico 17 se basa en la IgG1 humana (alotipo 356D/358L), e incluye las variantes sesgadas L368D/K370S variantes sesgadas y las variantes pl Q295E/N384D/Q418E/N421D en una primera cadena del Fc heterodimérico, las variantes sesgadas S364K/E357Q en una segunda cadena del Fc heterodimérico, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes Xtend de M428L/N434A en ambas cadenas.

[0029] Dentro de cada una de estas cadenas principales se incluyen secuencias que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente memoria) a las secuencias enumeradas, y/o contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos adicionales (en comparación con el «original» de la figura, que, como observarán los expertos en la técnica, ya contiene una serie de modificaciones de aminoácidos en comparación con el IgG1 humano original (o IgG2 o IgG4, según la cadena principal). Es decir, las cadenas principales citadas pueden contener modificaciones de aminoácidos adicionales (generalmente sustituciones de aminoácidos) además o como alternativa a las variantes sesgadas, pl y ablación contenidas dentro de las cadenas principales de esta figura. Además, las cadenas principales que se representan en la presente memoria pueden incluir la eliminación de la glicina (G446_) y/o lisina (K447_) de extremo C. La eliminación de glicina y/o lisina del extremo C puede diseñarse intencionalmente para reducir la heterogeneidad o en el contexto de ciertos formatos biespecíficos, como el formato mAb-scFv. Además, la eliminación de glicina y/o lisina de extremo C puede ocurrir de forma natural, por ejemplo, durante la producción y el almacenamiento.

[0030] La figura 11 muestra secuencias ilustrativas de la cadena principal de bsAb heterodimérico CD20 x CD28 para su uso en el formato 2 + 1 mAb-scFv. El formato representado en la presente memoria se basa en la cadena principal del Fc heterodimérico 1 como se muestra en la figura X, excepto que incluye además G446_ en el monómero 1 (-) y G446_/K447_ en el monómero 2 (+). Se debe tener en cuenta que cualquiera de las cadenas principales adicionales representadas en la figura X se puede adaptar para su uso en el formato 2 + 1 mAb-scFv con o sin incluir K447_ en una o ambas cadenas. Cabe señalar que estas secuencias pueden incluir además las variantes M428L/N434S o las variantes de extensión de semivida M252Y/S254T/T256E.

[0031] La figura 12 representa secuencias para «CH1» que se utilizan en modalidades de bsAb CD20 x CD28.

[0032] La figura 13 representa secuencias para «bisagra» que se utilizan en modalidades de bsAb CD20 x CD28.

[0033] La figura 14 representa el dominio constante de las cadenas ligeras cognadas que se utilizan en los bsAb CD20 x CD28 que utilizan un dominio de unión Fab.

[0034] La figura 15 muestra las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable para 1A7, un dominio de unión a CD28 derivado de fago de ejemplo, así como las secuencias para XENP28428, un mAb anti-CD28 basado en 1A7 y la cadena principal de IgG1 con la variante de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K. Las CDR están subrayadas y las barras indican los límites entre las regiones variables y el dominio constante. Como se señala en la presente memoria y es cierto para cada secuencia en la presente memoria que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de CDR puede ser ligeramente diferente según la numeración utilizada como se muestra en la Tabla 2, y por lo tanto, en la presente memoria se incluyen no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidos dentro de los dominios VH y VL que usan otros sistemas de numeración. Además, como ocurre con todas las secuencias de las figuras, estas secuencias VH y VL se pueden utilizar tanto en formato scFv como en formato Fab.

[0035] La figura 16 representa las secuencias de los dominios pesados variables optimizados por afinidad del clon 1A7 anti-CD28. Se debe tener en cuenta que los dominios pesados variables se pueden emparejar con cualquiera de los otros dominios ligeros variables representados en la presente memoria, incluidos, por ejemplo, las SEQ ID NO: 19, 75, 79 y 200-305 (por ejemplo, 1A7_H1.1_L1.71 como se utiliza en XENP39583).

[0036] La figura 17 representa las secuencias de los dominios pesados variables optimizados por afinidad del clon 1A7 anti-CD28. Se debe tener en cuenta que los dominios

pesados variables se pueden emparejar con cualquiera de los otros dominios ligeros variables representados en la presente memoria, incluidos, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 11, 15, 63,67, 71, y 131-199 (p. ej. 1A7_H1.1_L1.71 como se utiliza en XENP39583).

[0037] Las figuras 18A-18C representan la secuencia de pares VH/VH 1A7 optimizados por afinidad ilustrativos. Cabe señalar que estos pares pueden formatearse como los Fab o como los scFv. Además, en el formato scFv, estos pares pueden formatearse en la orientación VHVL o en la orientación VLVH.

[0038] La figura 19 muestra las secuencias de dominios pesados variables ilustrativos del clon anti-CD28 1A7 con una cisteína introducida para permitir el «grapado» del scFv. Se debe tener en cuenta que los dominios pesados variables se pueden emparejar con cualquiera de los otros dominios ligeros variables representados en las figuras 17, 20 y 23, incluidas las SEQ ID NO: 19, 75, 79 y 200-305 (por ejemplo, como se utiliza en XENP42157, XENP42160 y XENP42163).

[0039] La figura 20 muestra las secuencias de dominios ligeros variables ilustrativos del clon anti-CD28 1A7 con una cisteína introducida para permitir el «grapado» del scFv. Se debe tener en cuenta que los dominios ligeros variables se pueden emparejar con cualquiera de los otros dominios pesados variables que se representan en las figuras 15, 16, 19 y 22, lo que incluye las SEQ ID NO: 1, 11, 15, 63,67, 71 y 131-199 (p. ej., como se utiliza en XENP42157, XENP42160 y XENP42163).

[0040] Las figuras 21A y 21B representan la secuencia de pares VH/VH 1A7 grapados ilustrativos. Estos pares pueden formatearse en la orientación VHVL o en la orientación VLVH.

[0041] Las figuras 22A-22F representan secuencias adicionales para dominios pesados variables optimizados por afinidad del clon anti-CD28 1A7. Se debe tener en cuenta que los dominios pesados variables se pueden emparejar con cualquiera de los otros dominios ligeros variables que se representan en la presente memoria, incluidas las SEQ ID NO: 19, 75, 79 y 200-305.

[0042] La figura 23A-23I representa las secuencias de los dominios pesados variables optimizados por afinidad del clon 1A7 anti-CD28. Se debe tener en cuenta que los dominios pesados variables se pueden emparejar con cualquiera de los otros dominios ligeros variables representados en la presente memoria, incluidas las SEQ ID NO: 1, 11, 15, 63,67, 71 y 131-199.

[0043] Las figuras 24A y 24B representan regiones de marco de consenso (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (como en Kabat) para las variantes de dominio

ligero variable y pesado del clon 1A7 anti-CD28. Estas secuencias de consenso pueden incluir además modificaciones «grapadas» para permitir su uso en un scFv «grapado».

[0044] La figura 25 muestra pares VH/VL 1A7 diseñados por afinidad ilustrativos y sus afinidades de unión en el contexto de scFv (en el contexto del formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc bsAb).

[0045] Las figuras 26A-26H representan las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable para dominios de unión a CD28 adicionales que encuentran uso en los bsAb CD20 x CD28 de la invención. Como se señala en la presente memoria y es cierto para cada secuencia en la presente memoria que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de CDR puede ser ligeramente diferente según la numeración utilizada como se muestra en la Tabla 2, y por lo tanto, en la presente memoria se incluyen no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidos dentro de los dominios VH y VL que usan otros sistemas de numeración. Además, como ocurre con todas las secuencias de las figuras, estas secuencias VH y VL se pueden utilizar tanto en formato scFv como en formato Fab.

[0046] La figura 27 muestra las secuencias de XENP27181, un mAb anti-CD28 bivalente basado en el dominio de unión HuTN228 y la cadena principal de IgG1 con la variante de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K; y XENP29154, que es una versión producida internamente de TGN1412.

[0047] La figura 28 representa la unión de mAb anti-CD28 bivalentes ilustrativos basados en clones derivados de fagos en PBMC humanas. Los datos muestran que la campaña de fagos generó dominios de unión de CD28 que tienen una unión máxima más débil que la técnica anterior HuTN228 (que está relacionada con los dominios de unión de CD28 humanizados descritos en el Ejemplo 1A).

[0048] Las figuras 29A-29N representan formatos biespecíficos de la presente invención. La figura 29A representa el formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc», con un primer brazo Fab que se une a un primer antígeno y un segundo brazo scFv que se une a un segundo antígeno. El formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 comprende un primer monómero que comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) unida covalentemente al extremo N de una primera cadena principal del Fc heterodimérico (opcionalmente a través de un conector), un segundo monómero que comprende un Fv de cadena sencilla unido covalentemente al extremo N de una segunda cadena principal del Fc heterodimérico correspondiente (opcionalmente a través de un conector), y un tercer monómero que comprende una región variable de cadena ligera unida covalentemente a un dominio constante de cadena ligera,

donde la región variable de cadena ligera es complementaria un VH1. La figura 29B representa el formato «2 + 1 Fab2-scFv-Fc», con un primer brazo Fab y un segundo brazo Fab-scFv, donde el Fab se une a un primer antígeno y el scFv se une a un segundo antígeno. El formato 2 + 1 Fab2-scFv-Fc comprende un primer monómero que comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) unida de forma covalente al extremo N de una primera cadena del Fc heterodimérico (opcionalmente a través de un conector), un segundo monómero que comprende el VH1 acoplado de forma covalente (opcionalmente a través de un conector) a una cadena sencilla Fc acoplada de forma covalente (opcionalmente a través de un conector) al extremo N de una segunda cadena principal de Fc heterodimérico correspondiente y un tercer monómero que comprende una región variable de cadena ligera unida de forma covalente a un dominio constante de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera es complementaria al VH1. La figura 29C representa el formato de «cadena ligera común 1 + 1» o «CLC 1 + 1», con un primer Fc que comprende un primer brazo Fab que se une a un primer antígeno y un segundo Fc que comprende un segundo brazo Fab que se une a un segundo antígeno. El formato CLC 1 + 1 comprende un primer monómero que comprende VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, un segundo monómero que comprende VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3 y un tercer monómero que comprende VL-CL. El VL se empareja con el VH1 para formar un dominio de unión con una primera especificidad de unión a antígeno; y el VL se empareja con el VH2 para formar un dominio de unión con una segunda especificidad de unión a antígeno. La figura 29D representa el formato de la «2 + 1 cadena ligera común» o «2 + 1 CLC», con una primera Fc que comprende 2 brazos Fab donde cada uno se une a un primer antígeno y una segunda Fc que comprende 1 brazo Fab que se une a un segundo antígeno. El formato 2 + 1 CLC comprende un primer monómero que comprende VH1-CH1-bisagra-VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, un segundo monómero que comprende VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3, y un tercer monómero que comprende VL-CL. Los pares VL con el primer y segundo VH1 forman dominios de unión con una especificidad de unión a un primer antígeno; y los pares VL con el VH2 forman un dominio de unión con una especificidad de unión a un segundo antígeno. La figura 29E representa el formato «2 + 1 mAb-scFv», con un primer Fc que comprende un Fab de extremo N que se une a un primer antígeno y un segundo Fc que comprende un brazo Fab de extremo N que se une al primer antígeno y un scFv de extremo C que se une a un segundo antígeno. El formato 2 + 1 mAb-scFv comprende un primer monómero que comprende VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, un segundo monómero que comprende VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3-scFv, y un tercer monómero que

- comprende VL-CL. El VL se empareja con el primer y segundo VH1 para formar dominios de unión con especificidad de unión para el primer antígeno. La figura 29F representa el formato «2 + 1 mAb-scFv» que comprende un primer monómero que comprende VH1-CH1-conector-VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3 donde CH2-CH3 es un primer dominio Fc heterodimérico; un segundo monómero que comprende desde el extremo de extremo N hasta el extremo de extremo C scFv-conector-CH2-CH3 donde CH2-CH3 es un segundo dominio Fc heterodimérico complementario al primer dominio Fc heterodimérico y donde el scFv tiene una primera especificidad de antígeno; y un tercer monómero que es una cadena ligera común que comprende desde el extremo de extremo N hasta el extremo de extremo C VL-CL donde el VL se empareja con VH1 y VH2 del primer monómero para formar dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales tiene una especificidad para un segundo dominio de unión a antígeno. Los formatos biespecíficos adicionales incluyen G) scFv dual, H) scFv-mAb de un brazo, I) scFv-mAb, J) mAb biespecífico, K) scFv central de un brazo, L) mAb-Fv, M) Fv central y N) tridente.
- 15 **[0049]** Las figuras 30A-30E representan las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable para dominios de unión a CD20 adicionales que se utilizan en los bsAb CD20 x CD28 de la invención. Como se señala en la presente memoria y es cierto para cada secuencia en la presente memoria que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de CDR puede ser ligeramente diferente según la numeración utilizada como se muestra en la Tabla 2, y por lo tanto, en la presente memoria se incluyen no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidos dentro de los dominios VH y VL que usan otros sistemas de numeración. Además, como ocurre con todas las secuencias de las figuras, estas secuencias VH y VL se pueden utilizar tanto en formato scFv como en formato Fab.
- 20 **[0050]** Las figuras 31A y 31B representan A) la interacción clásica linfocito T/APC y B) la replicación de la interacción clásica de linfocito T/APC mediante la combinación de anticuerpos biespecíficos CD3 con anticuerpos biespecíficos CD28. En la interacción clásica de linfocitos T/APC, hay una primera señal proporcionada por la reactividad del TCR con el péptido-MHC (Señal 1) y una segunda señal proporcionada por la reticulación de CD28 por CD80/CD86 que se expresa en las APC (Señal 2) que juntas activan completamente los linfocitos T. A diferencia del tratamiento con CD3 biespecíficos, solo se proporciona la primera señal. La señal CD28 puede ser proporcionada por un CD28 biespecífico con la idea de promover la activación y proliferación a través de la coestimulación de CD28. En algunas modalidades, TAA1 y TAA2 pueden ser antígenos

diferentes. En algunas modalidades, TAA1 y TAA2 pueden ser el mismo antígeno pero diferentes epítomos. En algunas modalidades, TAA1 y TAA2 pueden ser el mismo antígeno y el mismo epítomo.

[0051] Las figuras 32A y 32B representan secuencias para el anticuerpo trispecífico CD79b x CD20 x CD3 ilustrativo que se puede combinar con los bsAb CD20 x CD28 de la invención.

[0052] Las figuras 33A-33O representan las secuencias de bsAb CD20 x CD28 ilustrativos en el formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc. Aunque algunas de estas secuencias utilizan la Plataforma X y otras utilizan la Plataforma J, se puede utilizar cualquier otra estructura básica adecuada, incluidas las que se muestran en la figura 10. Las CDR están subrayadas y las barras indican los límites entre las regiones variables y otros dominios. Cabe señalar que los bsAb CD20 x CD28 pueden utilizar secuencias de región variable, región Fc y dominio constante que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente memoria) y/o contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos. Además, cada secuencia descrita en la presente memoria puede incluir o excluir las variantes M428L/N434S, M428L/N434A o M252Y/S254T/T256E en uno o preferentemente en ambos dominios Fc, lo que incluye las variantes que dan como resultado una semivida más prolongada en suero.

[0053] La figura 34 muestra las secuencias de bsAb CD20 x CD28 ilustrativos en el formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc. Aunque algunas de estas secuencias utilizan la Plataforma X y otras utilizan la Plataforma J, se puede utilizar cualquier otra estructura básica adecuada, incluidas las que se muestran en la figura 10. Las CDR están subrayadas y las barras indican los límites entre las regiones variables y otros dominios. Cabe señalar que los bsAb CD20 x CD28 pueden utilizar secuencias de región variable, región Fc y dominio constante que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente memoria) y/o contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos. Además, cada secuencia descrita en la presente memoria puede incluir o excluir las variantes M428L/N434S, M428L/N434A o M252Y/S254T/T256E en uno o preferentemente en ambos dominios Fc, lo que incluye las variantes que dan como resultado una semivida más prolongada en suero.

[0054] Las figuras 35A-35C representan las secuencias de bsAb CD20 x CD28 ilustrativos en el formato 2 + 1 stackFab₂-scFv-Fc. Aunque algunas de estas secuencias utilizan la plataforma X y otras utilizan la Plataforma J, se puede utilizar cualquier otra estructura básica adecuada, incluidas las que se muestran en la figura 10. Las CDR están subrayadas y las barras indican los límites entre las regiones variables y otros dominios. Cabe señalar que los bsAb CD20 x CD28 pueden utilizar secuencias de región variable, región Fc y dominio constante que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente

memoria) y/o contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos. Además, cada secuencia descrita en la presente memoria puede incluir o excluir las variantes M428L/N434S, M428L/N434A o M252Y/S254T/T256E en uno o preferentemente en ambos dominios Fc, lo que incluye las variantes que dan como resultado una semivida más prolongada en suero.

[0055] Las figuras 36A-36K representan las secuencias de bsAb CD20 x CD28 ilustrativos en el formato 2 + 1 mAb-scFv. Aunque algunas de estas secuencias utilizan la Plataforma X y otras utilizan la plataforma J, se puede utilizar cualquier otra estructura básica adecuada, incluidas las que se muestran en la figura 11. Las CDR están subrayadas y las barras indican los límites entre las regiones variables y otros dominios. Cabe señalar que los bsAb CD20 x CD28 pueden utilizar secuencias de región variable, región Fc y dominio constante que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente memoria) y/o contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos. Además, cada secuencia descrita en la presente memoria puede incluir o excluir las variantes M428L/N434S, M428L/N434A o M252Y/S254T/T256E en uno o preferentemente en ambos dominios Fc, lo que incluye las variantes que dan como resultado una semivida más prolongada en suero.

[0056] La figura 37 muestra la liberación de IFN γ de PBMC humanas tratadas con XENP28428 secado al aire (clon anti-CD28 1A7), TGN1412 (XENP29154) o PBS de control negativo.

[0057] Las figuras 38A-38C representan la inducción de la secreción de IL2 por linfocitos T incubados con A) Carnaval, B) OCI-Ly-10 y C) células cancerosas Ramos y tratadas con CD79b x CD20 x CD3 en combinación con bsAb CD20 x CD28 XENP42157 o XENP42160 en función de la plataforma J + Conector grapado (titulación de CD28).

[0058] Las figuras 39A-39C representan la inducción de la secreción de IL2 por linfocitos T incubados con A) Carnaval, B) OCI-Ly-10 y C) células cancerosas Ramos y tratadas con CD79b x CD20 x CD3 en combinación con el bsAb CD20 x CD28 XENP42157 o XENP42160 en función de la plataforma J + Conector grapado (titulación de CD3).

[0059] Las figuras 40A-40C representan el efecto de CD20XCD28 en combinación con CD79bXCD20XCD3 sobre la activación de linfocitos T mediante el uso de linfocitos pan-T de donantes sanos y células tumorales que expresan CD79b y CD20 (CARNAVAL y OCI-Ly10). (40A) representa la activación de linfocitos T medida mediante ensayos de citotoxicidad. (40B) representa la activación de linfocitos T medida mediante la expresión de CD25. (40C) muestra gráficos de sinergia para el bsAb CD20XCD28 en combinación con CD79bXCD20XCD3 sobre la citotoxicidad mediada por linfocitos T.

[0060] La figura 41 muestra el efecto del tratamiento combinado de CD20XCD28 y CD79bXCD20XCD3 sobre el crecimiento de xenoinjertos DLBCL SC OCI-Ly10 establecidos en ratones humanizados con linfocitos T.

[0061] Las figuras 42A-42D representan el efecto de CD20XCD28 en combinación con CD79bXCD20XCD3 sobre la activación de linfocitos T mediante el uso de linfocitos pan-T donantes sanas y células tumorales que expresan niveles bajos de CD79b y CD20 (WILL-2 y NALM6). La línea celular WILL2 utilizó 6 donantes y la línea celular NALM6 utilizó 3 donantes. (41A) representa la activación de linfocitos T medida mediante ensayos de citotoxicidad. (41B) representa la activación de linfocitos T medida mediante la expresión de CD25. (41C y 41D) muestra gráficos de sinergia para CD20XCD28 bsAb en combinación con CD79bXCD20XCD3 en la citotoxicidad mediada por linfocitos T. Los círculos abiertos representan efectos negativos y los círculos cerrados representan los efectos positivos.

[0062] Las figuras 43A y 43B representan el efecto de CD20XCD28 en combinación con CD79bXCD20XCD3 sobre la activación de linfocitos T mediante el uso de linfocitos pan-T donantes sanas y células tumorales que expresan CD79b y CD20 (CARNAVAL y OCI-Ly10), medido en el punto de tiempo de 72 h. (43A) representa la activación y proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 (% de CD25 positivo), y (43B) representa la liberación de citocinas.

[0063] Las figuras 44A-44G representan el efecto de CD20XCD28 en combinación con CD79bXCD20XCD3 sobre la activación, proliferación, diferenciación y liberación de citocinas de los linfocitos T. (43A y 43B) representan la proliferación de linfocitos pan-T, linfocitos T CD8 y linfocitos T CD4. (44C) representan la activación de linfocitos T CD8 y linfocitos T CD4 (% de linfocitos CD25⁺). (44D a 44F) representan la diferenciación de linfocitos T CD4 y CD8. (44G) representa la liberación de citocinas.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Descripción general

[0064] El antígeno CD20 se expresa selectivamente en los linfocitos B maduras y proporciona un objetivo terapéutico en el tratamiento de las neoplasias malignas de linfocitos B.

[0065] La activación de los linfocitos T en el tratamiento del cáncer está siendo ampliamente investigada. Los linfocitos T requieren múltiples señales para su activación y diferenciación completas. La señal 1, promovida por el reconocimiento de un complejo péptido-MHC (pMHC) por el receptor de linfocitos T (TCR), es absolutamente necesaria para la activación de los linfocitos T. La señal 2, la cual se complementa con la señal 1 y la amplifica, se

proporciona comúnmente mediante la interacción de los ligandos CD28, CD80 y CD86 con el propio CD28. Aunque la activación de CD28 por sí sola es inerte, cuando se combina con la activación de la señal 1, mejora la activación de los linfocitos T, la supervivencia y las señales proliferativas, incluida la secreción de IL-2. Como CD80 y CD86 se expresan naturalmente por medio de células presentadoras de antígenos profesionales, el grado de coestimulación de CD28 en el entorno tumoral puede ser muy variable. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una nueva clase de anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 dirigidos a tumores que imitan la interacción CD80/CD86 de CD28, proporcionando así una fuente de señal 2. En particular, la señal 1 puede ser proporcionada por el reconocimiento natural de TCR:pMHC de las células tumorales, o puede ser proporcionada por la combinación del CD28 biespecífico con un ligador de linfocitos T CD3 (por ejemplo, anti-CD3 x anti-CD20 x anti-CD79b), que puede imitar la señal 1.

[0066] Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan nuevos anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 (también denominados «αCD20 x αCD28» y, a veces, «CD20 x CD28») y métodos para utilizar dichos anticuerpos para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B. En muchos casos, estos anticuerpos son heterodiméricos. Los anticuerpos αCD20 x αCD28 son capaces de unirse a las moléculas coestimuladoras CD28 en los linfocitos T y dirigirse al CD20 en los linfocitos B malignos que expresan CD20. Por lo tanto, dichos anticuerpos mejoran selectivamente la actividad antitumoral en los sitios tumorales que expresan CD20 mientras minimizan la toxicidad periférica. Los anticuerpos objeto de la presente memoria son particularmente útiles para mejorar la actividad antitumoral ya sea solos, como monoterapia o cuando se usan en combinación con otras terapias contra el cáncer como se describe con más detalle en la presente memoria.

[0067] Por consiguiente, en una modalidad, en la presente memoria se proporcionan anticuerpos heterodiméricos o fragmentos de estos que se unen a dos antígenos diferentes, por ejemplo, los anticuerpos son «biespecíficos», ya que se unen a dos antígenos diana diferentes, generalmente CD20 y CD28 como se describirá más adelante. Estos anticuerpos heterodiméricos pueden unirse a cada uno de los antígenos objetivo de forma monovalente (por ejemplo, hay un único dominio de unión a antígenos) o bivalente (hay dos dominios de unión a antígenos que se unen independientemente al antígeno). En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico que se proporciona en la presente memoria incluye un dominio de unión a CD28 y un dominio de unión a CD20 (por ejemplo, anticuerpos heterodiméricos en el formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc» que se describe en la presente memoria, que por lo tanto son biespecíficos y bivalentes). En otras modalidades,

el anticuerpo heterodimérico que se proporciona en la presente memoria incluye un dominio de unión a CD28 y dos dominios de unión a CD20 (por ejemplo, anticuerpos heterodiméricos en los formatos «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc» descritos en la presente memoria, que son, por lo tanto, biespecíficos pero trivalentes, ya que contienen tres dominios de unión a antígenos (ABD)). Los anticuerpos heterodiméricos que se proporcionan en la presente memoria se basan en el uso de diferentes monómeros que contienen sustituciones de aminoácidos (es decir, variantes sesgadas) que «sesgan» la formación de heterodímeros sobre homodímeros, como se describe con más detalle a continuación. En algunas modalidades, los anticuerpos heterodímeros también están acoplados con variantes de purificación (por ejemplo, «variantes pl») que permiten una purificación simple de los heterodímeros a partir de los homodímeros, como se describe de manera similar a continuación. Los anticuerpos heterodiméricos proporcionados generalmente se basan en el uso de dominios Fc diseñados o variantes que pueden autoensamblarse en células de producción para producir proteínas heterodiméricas y métodos para generar y purificar dichas proteínas heterodiméricas.

II. Nomenclatura

[0068] La nomenclatura de los nombres de dominios de unión a antígenos particulares (p. ej. los dominios de unión a CD20 y CD28) usan un tipo de formato «Hx.xx_Ly.yy», es decir que los números son identificadores únicos para secuencias de cadena variable. Así, por ejemplo, el dominio de unión a CD28 «1A7[CD28]_H1_L1» (figura 15) incluye un dominio pesado variable, H1, y un dominio ligero variable L1. En el caso de que estas secuencias se utilicen como scFv, la designación «H1_L1», indica que el dominio de unión incluye un dominio pesado variable «H1» combinado con un dominio ligero variable «L1», y está en orientación VH-conector-VL, desde el extremo N al C. Esta molécula con las secuencias idénticas de los dominios variables pesado y ligero pero en orden inverso (orientación VL-conector-VH, del extremo N al C) se designaría «L1_H1». De manera similar, diferentes construcciones pueden «mezclar y combinar» las cadenas pesadas y ligeras, como será evidente en el listado de secuencias y las figuras.

III. Definiciones

[0069] Para que la aplicación pueda ser comprendida más completamente, se exponen a continuación varias definiciones. Tales definiciones pretenden abarcar equivalentes gramaticales.

[0070] Por «antígeno de linfocito B CD20», «CD20», «MS4A1», «B1», «Bp35», «CD20», «CVID5», «LEU-16», «MS4A2», «S7, membrana que abarca 4 dominios A1» y «FMC7» (por ejemplo, números de acceso de Genbank NP_068769 (humano), NP_690605 (humano), NP_690606 (humano)) se hace referencia en la presente memoria a una
 5 molécula de superficie de linfocito B que desempeña un papel en el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas. En los humanos, el CD20 está codificado por el gen MS4A1. El CD20 está presente desde los linfocitos pro-B tardíos hasta las células de memoria en el desarrollo de los linfocitos B. Se encuentra en linfomas de linfocitos B, leucemia de células peludas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y
 10 células madre de cáncer de melanoma. en la figura 2 se muestran secuencias de ejemplo de CD20. A menos que se indique lo contrario, las referencias a CD20 se refieren a la secuencia CD20 humana.

[0071] Por «CD28», «Cluster de diferenciación 28» y «Tp44» (por ejemplo, números de acceso de Genbank NP_001230006 (humano), NP_001230007 (humano), NP_006130
 15 (humano), y NP_031668 (ratón)) en la presente memoria se hace referencia a un receptor B7 expresado en linfocitos T que proporciona señales coestimuladoras necesarias para la activación y supervivencia de los linfocitos T. La estimulación de los linfocitos T a través de CD28 además del receptor de linfocitos T (TCR) proporciona una potente señal para la producción de varias interleucinas. CD28 es el receptor de las proteínas CD80 (B7.1) y
 20 CD86 (B7.2). CD28 incluye un dominio intercelular con un motivo YMNM (SEQ ID NO: 517) crítico para el reclutamiento de proteínas que contienen el dominio SH2, particularmente PI3K. CD28 también incluye dos motivos ricos en prolina que pueden unirse a proteínas que contienen SH3. En la figura 1 se muestran secuencias de CD28 de ejemplo. A menos que se indique lo contrario, las referencias a CD28 se refieren a la secuencia CD28 humana.

[0072] Por «ablación» en la presente memoria se entiende una disminución o eliminación de la actividad. Así, por ejemplo, «eliminar la unión de FcγR» significa que la variante de aminoácido de la región Fc tiene menos del 50 % de unión inicial en comparación con una
 25 región Fc que no contiene la variante específica. La unión de FcγR se evalúa mediante el uso de un ensayo de unión como ensayos de resonancia plasmónica de superficie (SPR) como Biacore o una interferometría de biocapa (BLI), y la ablación se define como una
 30 pérdida de actividad de unión de más del 50, 70, 80, 90, 95 o 98 %. De particular utilidad en la ablación de la unión de FcγR son los que se muestran en la figura 5, que generalmente están incluidos en los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente memoria.

[0073] «Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo» y «ADCC» se

refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR, reconocen anticuerpos de unión en una célula diana y posteriormente causan lisis de la célula diana. La ADCC se correlaciona con la unión a FcγRIIIa; una mayor unión a FcγRIIIa conduce a un aumento en la actividad de la ADCC.

5 **[0074]**«ADCP» o fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos, como se usa en la presente memoria, significa que la reacción mediada por células donde las células fagocíticas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la fagocitosis de la célula diana.

10 **[0075]**Como se utiliza en la presente memoria, el término «anticuerpo» se utiliza de forma general. Los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria pueden adoptar varios formatos como se describe en la presente memoria, incluidos los anticuerpos tradicionales, así como los derivados de anticuerpos, fragmentos y miméticos, descritos en la presente memoria.

15 **[0076]**Los anticuerpos de inmunoglobulina (Ig) tradicionales son tetrámeros en forma de «Y». Cada tetrámero se compone típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene un monómero de «cadena ligera» (que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y un monómero de «cadena pesada» (que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa).

20 **[0077]**Los ejemplos no taxativos de fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen, de modo no taxativo, diacuerpos y moléculas de cadena sencilla, así como moléculas Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc y Fv, anticuerpos de cadena sencilla (Sc), cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos o CDR y otras proteínas, andamiajes proteicos, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten
25 en una cadena pesada y una ligera, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra, un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb que consiste
30 esencialmente en un dominio VH, camélidos o nanocuerpos, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, y similares.

[0078]Otros formatos de anticuerpos útiles incluyen, entre otros, los formatos «1 + 1 Fab-scFv-Fc», «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc», «2+1 stack Fab₂-scFv-Fc» y «2+1 mAb-scFv» descritos en la presente memoria (figura 29). Los formatos de anticuerpos útiles adicionales incluyen,

entre otros, «cadena ligera común 1 + 1» y «cadena ligera común 2 + 1», «mAb-Fv», «mAb-scFv», «central-Fv», «scFv-mAb de un brazo», «scFv-mAb», «scFv dual» y anticuerpos con formato «tridente» (figura 29). Véase también, US20180127501A1, que se incorpora a modo de referencia en la presente memoria, particularmente en la parte pertinente relacionada con los formatos de anticuerpos (véase, por ejemplo, la figura 2 de US20180127501A1).

[0079] Las cadenas pesadas de anticuerpos generalmente incluyen un dominio pesado (VH) variable, que incluye vhCDR1-3, y un dominio Fc, que incluye un monómero CH2-CH3. En algunas modalidades, las cadenas pesadas de anticuerpos incluyen una bisagra y un dominio CH1. Las cadenas pesadas de anticuerpos tradicionales son monómeros que están organizados desde el extremo N al C: VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. La bisagra CH1-CH2-CH3 se denomina colectivamente «dominio constante» o «región constante» de la cadena pesada del anticuerpo, del cual existen cinco categorías o «isotipos» diferentes: IgA, IgD, IgG, IgE e IgM.

[0080] En algunas modalidades, los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria incluyen dominios constantes de isotipo IgG, que tiene varias subclases, que incluyen, entre otras, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por «dominio de inmunoglobulina (Ig)» en la presente memoria se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. De interés en la presente invención son los dominios de cadena pesada, incluidos los dominios pesados constantes (CH) y los dominios de bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, cada isotipo IgG tiene tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios «CH» en el contexto de IgG son los siguientes: «CH1» se refiere a las posiciones 118-215 según el índice de la UE como en Kabat. «Bisagra» se refiere a las posiciones 216-230 según el índice de la UE como en Kabat. «CH2» se refiere a las posiciones 231-340 según el índice de la UE como en Kabat, y «CH3» se refiere a las posiciones 341-447 según el índice de la UE como en Kabat. Como se muestra en la tabla 1, la numeración exacta y la ubicación de los dominios de la cadena pesada pueden ser diferentes entre los distintos sistemas de numeración. Como se muestra en la presente memoria y se describe a continuación, las variantes pl pueden estar en una o más de las regiones CH, así como en la región bisagra, que se analiza a continuación.

[0081] Cabe señalar que la IgG1 tiene diferentes alotipos con polimorfismos en 356 (D o E) y 358 (L o M). Las secuencias que se representan en la presente memoria utilizan el alotipo 356E/358M, sin embargo, el otro alotipo se incluye en la presente memoria. Es decir,

cualquier secuencia que incluya un dominio Fc de IgG1 incluido en la presente memoria puede tener 356D/358L reemplazando el alotipo 356E/358M. Debe entenderse que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases. Por ejemplo, como se muestra en la publicación estadounidense 2009/0163699, que se incorpora a modo de referencia, los presentes anticuerpos, en algunas modalidades, incluyen híbridos IgG1/G2 humanos.

[0082] Por «Fc» o «región Fc» o «dominio Fc» como se usa en la presente memoria se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo, en algunos casos, lo que excluye todo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante (por ejemplo, CH1) o una parte de este, y en algunos casos, lo que incluye opcionalmente la totalidad o parte de la bisagra. Para la IgG, el dominio Fc comprende los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 (C γ 2 y C γ 3) y, opcionalmente, toda o una parte de la región bisagra entre CH1 (C γ 1) y CH2 (C γ 2). Así, en algunos casos, el dominio Fc incluye, desde el extremo N al C, CH2-CH3 y bisagra-CH2-CH3. En algunas modalidades, el dominio Fc es el de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y la bisagra-CH2-CH3 de IgG1 y la bisagra-CH2-CH3 de IgG4 encuentran un uso particular en muchas modalidades. Además, en el caso de los dominios Fc de IgG1 humanos, la bisagra puede incluir una sustitución del aminoácido C220S. Además, en el caso de los dominios Fc de IgG4 humanos, la bisagra puede incluir una sustitución del aminoácido S228P. Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana generalmente se define para incluir los residuos E216, C226 o A231 hasta su terminal carboxilo, donde la numeración está de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas modalidades, como se describe más completamente a continuación, se realizan modificaciones de aminoácidos en la región Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más Fc γ R o al FcRn.

[0083] Por «región constante de cadena pesada» en la presente memoria se entiende la parte bisagra CH1-CH2-CH3 de un anticuerpo (o fragmentos de esta), excluido el dominio pesado variable; en la numeración de la UE de la IgG1 humana, estos son los aminoácidos 118-447. Por «fragmento de región constante de cadena pesada» en la presente memoria se entiende una región constante de cadena pesada que contiene menos aminoácidos de uno o ambos extremos N y C, pero que aún conserva la capacidad de formar un dímero con otra región constante de cadena pesada.

[0084] Otro tipo de dominio de la cadena pesada es la región bisagra. Por «bisagra» o «región bisagra» o «región bisagra de anticuerpo» o «dominio bisagra» en la presente memoria se entiende el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer

y el segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 215, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición EU del residuo 231. Por lo tanto, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente memoria para incluir las posiciones 216 (E216 en IgG1) a 230 (P230 en IgG1), donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunos casos, se utiliza un «fragmento de bisagra», que contiene menos aminoácidos en uno o ambos extremos N y C del dominio de bisagra. Como se señala en la presente memoria, también se pueden realizar variantes de pl en la región de la bisagra. Muchos de los anticuerpos en la presente memoria contenidos tienen al menos una de las cisteínas en la posición 220 según la numeración de la UE (región bisagra) reemplazada por una serina. Generalmente, esta modificación está en el lado del «monómero scFv» (cuando se utilizan los formatos 1+1 o 2+1) para la mayoría de las secuencias en la presente memoria representadas, aunque también puede estar en el lado del «monómero Fab», o en ambos, para reducir la formación de disulfuro. Se incluyen específicamente dentro de las secuencias en la presente memoria presentadas una o ambas de estas cisteínas reemplazadas (C220S).

[0085] Como observarán los expertos en la técnica, la numeración y ubicación exactas de los dominios de la región constante de la cadena pesada (es decir, dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3) pueden ser diferentes entre los diferentes sistemas de numeración. A continuación se muestra una comparación útil de la numeración de la región constante pesada según EU y Kabat; consulte Edelman y cols., 1969, Proc Natl Acad Sci EUA 63:78-85 y Kabat y cols., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, que se incorpora íntegramente a modo de referencia.

TABLA 1

	<u>Numeración de la UE</u>	<u>Numeración de Kabat</u>
<i>CH1</i>	118-215	114-223
<i>Bisagra</i>	216-230	226-243
<i>CH2</i>	231-340	244-360
<i>CH3</i>	341-447	361-478

25

[0086] La cadena ligera del anticuerpo generalmente comprende dos dominios: el dominio ligero variable (VL), que incluye las CDR de cadena ligera vLCDR1-3, y una región de cadena ligera constante (a menudo denominada CL o Ck). La cadena ligera del anticuerpo normalmente está organizada desde el extremo N al C: VL-CL.

[0087] Por «dominio de unión a antígeno» o «ABD» en la presente memoria se entiende un conjunto de seis regiones determinantes complementarias (CDR) que, cuando están presentes como parte de una secuencia polipeptídica, se unen específicamente a un antígeno objetivo (por ejemplo, CD20 o CD28) como se trata en la presente memoria. Como se sabe en la técnica, estas CDR generalmente están presentes como un primer conjunto de CDR pesadas variables (vhCDR o VHCDR) y un segundo conjunto de CDR ligeras variables (vlCDR o VLCDR), cada uno de los cuales comprende tres CDR: CDR pesadas variables vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 y CDR ligeras variables vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3. Las CDR están presentes en el dominio pesado variable (vhCDR1-3) y en el dominio ligero variable (vlCDR1-3). El dominio pesado variable y el dominio ligero variable de una región Fv.

[0088] La presente invención proporciona un gran número de conjuntos de CDR diferentes. En este caso, un «conjunto de CDR completo» comprende tres CDR ligeras variables y tres CDR pesadas variables, por ejemplo, una vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estos pueden ser parte de un dominio variable ligero o pesado más grande, respectivamente. Además, como se describe con más detalle en la presente memoria, los dominios pesado variable y ligero variable pueden estar en cadenas polipeptídicas separadas, cuando se utiliza una cadena pesada y ligera (por ejemplo, cuando se utilizan Fab), o en una sola cadena polipeptídica en el caso de secuencias scFv.

[0089] Como lo observarán aquellos en la técnica, la numeración exacta y la ubicación de las CDR pueden ser diferentes entre los distintos sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la descripción de una secuencia pesada variable y/o ligera variable incluye la descripción de las CDR asociadas (inherentes). Por consiguiente, la descripción de cada región pesada variable es una descripción de los vhCDR (por ejemplo, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la descripción de cada región ligera variable es una descripción de los vlCDR (por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3). A continuación se muestra una comparación útil de la numeración de CDR):

TABLA 2

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36

vICDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
vICDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

[0090] A lo largo de la presente memoria descriptiva, se utiliza generalmente el sistema de numeración Kabat cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1-107 de la región variable de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la región variable de la cadena pesada) y el sistema de numeración de la UE para las regiones Fc.

[0091] Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno, o más específicamente, del sitio de unión del epítipo de los dominios de unión del antígeno y los anticuerpos. «Epítipo» se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de unión de antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Los epítopos son agrupaciones de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo.

[0092] Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden verificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, por ejemplo, «seccionamiento». Como se describe a continuación, la invención no solo incluye los dominios de unión a antígenos y anticuerpos enumerados En la presente memoria, sino también aquellos que compiten por la unión con los epítopos unidos por los dominios de unión a antígenos enumerados.

[0093] En algunas modalidades, los seis CDR del dominio de unión a antígenos son aportadas por un dominio pesado variable y un dominio ligero variable. En un formato «Fab», el conjunto de 6 CDR son aportados por dos secuencias polipeptídicas diferentes, el dominio pesado variable (vh o VH; que contiene vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y el dominio ligero variable (vl o VL; que contiene vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3), con el extremo C del dominio vh unido al extremo N del dominio CH1 de la cadena pesada y el extremo C del dominio vl unido al extremo N del dominio ligero constante (y formando así la cadena ligera). En un formato scFv, los dominios vh y vl están unidos covalentemente, generalmente a través del uso de un conector (un «conector scFv») como se describe en la presente memoria, en una única secuencia polipeptídica, que puede ser (comenzando desde el extremo N) vh-conector-vl o vl-conector-vh. En general, el extremo C del dominio scFv está unido al extremo N de toda o parte de la bisagra en el segundo monómero.

[0094] Por «región variable» o «dominio variable» como se utiliza en la presente memoria se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes V κ , V λ y/o V H que conforman los loci genéticos de inmunoglobulina de cadena pesada, kappa y lambda respectivamente, y
 5 contiene las CDR que confieren especificidad de antígeno. De este modo, un «dominio pesado variable» se empareja con un «dominio ligero variable» para formar un dominio de unión a antígenos («ABD»). Además, cada dominio variable comprende tres regiones hipervariables («regiones determinantes complementarias», «CDR») (vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 para el dominio variable pesado y vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 para el dominio
 10 variable ligero) y cuatro regiones marco (FR), dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxiterminal en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

[0095] Por «Fab» o «región Fab» como se utiliza en la presente memoria se entiende la región de anticuerpo que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL, generalmente en dos cadenas polipeptídicas diferentes (por ejemplo, VH-CH1 en una
 15 cadena y VL-CL en la otra). Fab puede referirse a esta región de forma aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo biespecífico de la invención. En el contexto de un Fab, el Fab comprende una región Fv además de los dominios CH1 y CL.

[0096] Por «Fv» o «fragmento Fv» o «región Fv» como se utiliza en la presente memoria se entiende la región del anticuerpo que comprende los dominios VL y VH. Las regiones Fv se
 20 pueden formatear como Fab (como se explicó anteriormente, generalmente dos polipéptidos diferentes que también incluyen las regiones constantes como se describe anteriormente) y Fv de cadena simple (scFv), donde los dominios vl y vh están incluidos en un solo péptido, unido generalmente con un conector como se trata en la presente memoria.

[0097] Por «Fv de cadena sencilla» o «scFv» En la presente memoria se entiende un
 25 dominio pesado variable unido covalentemente a un dominio ligero variable, generalmente mediante el uso de un conector scFv como se trata en la presente memoria, para formar un scFv o dominio scFv. Un dominio scFv puede estar en cualquier orientación desde el extremo N al C (vh-conector-vl o vl-conector-vh). En las secuencias representadas en el listado de secuencias y en las figuras, el orden de los dominios vh y vl se indica en el
 30 nombre, por ejemplo, H.X_L.Y significa que el extremo N al C es vh-conector-vl, y L.Y_H.X es vl-conector-vh.

[0098] Algunas modalidades de los anticuerpos objeto de la presente memoria comprenden al menos un dominio scFv, que, si bien no se produce de forma natural, generalmente incluye un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, unidos entre sí por un

conector scFv. Como se describe en la presente memoria, si bien el dominio scFv generalmente está orientado desde el extremo N al C como VH-conector scFv-VL, esto se puede revertir para cualquiera de los dominios scFv (o aquellos contruidos mediante el uso de secuencias vh y vl de Fab), un VL-conector scFv-VH, con conectores opcionales en uno o ambos extremos según el formato.

[0099] Por «modificación» o «variante» en la presente memoria se entiende una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica o una alteración de una fracción ligada químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser un carbohidrato alterado o una estructura de PEG unida a una proteína. Por «modificación de aminoácidos» en la presente memoria se entiende una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Para mayor claridad, a menos que se indique lo contrario, la modificación de un aminoácido siempre es a un aminoácido codificado por el ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en el ADN y el ARN.

[0100] Por «sustitución de aminoácidos» o «sustitución» en la presente memoria se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido original con un aminoácido diferente. En particular, en algunas modalidades, la sustitución es por un aminoácido que no se encuentra de forma natural en la posición particular, ya sea que no se encuentra de forma natural dentro del organismo o en cualquier organismo. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se reemplaza por tirosina. Para mayor claridad, una proteína que ha sido diseñada para cambiar la secuencia codificante del ácido nucleico pero sin cambiar el aminoácido inicial (por ejemplo, intercambiar CGG (que codifica arginina) por CGA (que todavía codifica arginina) para aumentar los niveles de expresión del organismo huésped) no es una «sustitución de aminoácidos», es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular con la que comenzó, no es una sustitución de aminoácidos.

[0101] Por «inserción de aminoácidos» o «inserción» como se utiliza en la presente memoria se entiende la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido original. Por ejemplo, -233E o 233E designa una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o A233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

[0102] Por «eliminación de aminoácido» o «eliminación» como se usa en la presente memoria se entiende la remoción de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica original. Por ejemplo, E233- E233#, E233_, E233() y E233del designan una eliminación de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una eliminación de la secuencia GluAspAla que comienza en la posición 233.

[0103] Por «proteína variante» o «variante de proteína», o «variante» como se utiliza en la presente memoria se entiende una proteína que difiere de la de una proteína original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. La variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con la proteína original, pero no tantas como para que la proteína variante no se alinee con la proteína original mediante el uso de un programa de alineación como el que se describe a continuación. En general, las proteínas variantes (como los dominios Fc variantes, etc., descritos en la presente memoria) son generalmente al menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a la proteína original, mediante el uso de los programas de alineamiento descritos a continuación, como BLAST. Véase Altschul, SF y cols., (1990) «*Basic Local Alignment Search Tool*», J. Mol. Biol. 215:403-10, el algoritmo «BLAST», véase <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

[0104] «Variante Fc» o «variante Fc» como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína que comprende una modificación de aminoácido en un dominio Fc. La modificación puede ser una adición, eliminación o sustitución. Las variantes Fc se definen según las modificaciones de los aminoácidos que las componen. Por lo tanto, por ejemplo, N434S o 434S es una variante Fc con la sustitución de serina en la posición 434 con respecto al polipéptido Fc original, donde la numeración está de acuerdo con el índice de la UE. Asimismo, M428L/N434S define una variante Fc con las sustituciones M428L y N434S en relación con el polipéptido Fc original. La identidad del aminoácido WT puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 428L/434S. Se observa que el orden en que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que 434S/428L, y así sucesivamente. Para todas las posiciones analizadas en la presente memoria que se relacionan con anticuerpos o derivados y fragmentos de estos (por ejemplo, dominios Fc), a menos que se indique lo contrario, la numeración de la posición de aminoácidos está de acuerdo con el índice de la UE. El esquema «índice de la UE» o «índice de la UE como en Kabat» o «numeración de la UE» se refiere a la numeración del anticuerpo UE (Edelman y

cols., 1969, Proc Natl Acad Sci EUA 63:78-85, que se incorpora en su totalidad por la presente a modo de referencia). La modificación puede ser una adición, eliminación o sustitución.

5 **[0105]** En general, los dominios Fc variantes tienen al menos aproximadamente un 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 por ciento de identidad con el dominio Fc de IgG humano original correspondiente (mediante el uso de los algoritmos de identidad analizados a continuación, con una modalidad que utiliza el algoritmo BLAST como se conoce en la técnica, mediante el uso de parámetros predeterminados). Alternativamente, los dominios Fc variantes pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 10 18, 19 o 20 modificaciones de aminoácidos en comparación con el dominio Fc original. De manera alternativa, los dominios Fc variantes pueden tener hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 modificaciones de aminoácidos en comparación con el dominio Fc original. Además, como se trata en la presente memoria, los dominios Fc variantes descritos en la presente memoria aún conservan la capacidad de 15 formar un dímero con otro dominio Fc, como se mide mediante el uso de técnicas conocidas como se describe en la presente memoria, como la electroforesis en gel no desnaturizante.

[0106] Por «proteína» como se utiliza en la presente memoria se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, lo que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y 20 péptidos. Además, los polipéptidos que componen los anticuerpos de la invención pueden incluir derivatización sintética de una o más cadenas laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclización, conectores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios proteicos y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

[0107] Por «modificación de subclase de IgG» o «modificación de isotipo», como se utiliza 25 en la presente memoria, se entiende una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo de IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG alineado diferente. Por ejemplo, debido a que IgG1 comprende una tirosina y IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de la subclase de IgG.

30 **[0108]** Por «modificación que no ocurre de forma natural» como se utiliza en la presente memoria se entiende una modificación de aminoácido que no es isotópica. Por ejemplo, debido a que ninguna de las IgG humanas comprende una serina en la posición 434, la sustitución 434S en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (o híbridos de estas) se considera una modificación que no ocurre de forma natural.

[0109] Por «aminoácido» e «identidad de aminoácido» como se utiliza en la presente memoria se significa uno de los 20 aminoácidos naturales que están codificados por el ADN y el ARN.

[0110] Por «función efectora» como se utiliza en la presente memoria se entiende un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen, entre otras, ADCC, ADCP y CDC.

[0111] Por «ligando Fc de IgG» como se utiliza en la presente memoria se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de ligando Fc/Fc. Los ligandos Fc incluyen, entre otros, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y FcγR viral. Los ligandos Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcγR. Los ligandos Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Los ligandos Fc de IgG particulares son los receptores FcRn y Fc gamma. Por «ligando Fc» como se utiliza en la presente memoria significa una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de ligando Fc/Fc.

[0112] Por «receptor Fc gamma», «FcγR» o «FcγgammaR» como se utiliza en la presente memoria se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificado por un gen FcγR. En humanos, esta familia incluye, entre otros, FcγRI (CD64), incluidas las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluidas las isoformas FcγRIIa (incluidos los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluidos FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluidas las isoformas FcγRIIIa (incluidos los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluidos los alotipos FcγRIIb-NA1 y FcγRIIb-NA2), así como cualquier FcγR humano no descubierto o isoformas o alotipos de FcγR. Un FcγR puede provenir de cualquier organismo, incluidos, entre otros, humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen, entre otros, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcγR de ratón no descubierto o isoformas o alotipos de FcγR.

[0113] Por «FcRn» o «receptor Fc neonatal» como se utiliza en la presente memoria se entiende una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen FcRn. El FcγR puede provenir de cualquier organismo, incluidos, entre otros, humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se sabe en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a menudo denominados cadena

pesada y cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen FcRn. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de la cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. Una variedad de variantes de FcRn utilizadas para aumentar la unión al receptor FcRn y, en algunos casos, para aumentar la semivida sérica. Una «variante de FcRn» es una modificación de aminoácidos que contribuye a aumentar la unión al receptor de FcRn; a continuación se muestran variantes de FcRn adecuadas.

[0114] Por «polipéptido original» como se utiliza en la presente memoria se entiende un polipéptido de partida que se modifica posteriormente para generar una variante. El polipéptido original puede ser un polipéptido natural o una variante o versión diseñada de un polipéptido de origen natural. Por consiguiente, por «inmunoglobulina original» como se utiliza en la presente memoria se entiende un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y por «anticuerpo original» como se utiliza en la presente memoria se entiende un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Cabe señalar que el término «anticuerpo original» incluye anticuerpos comerciales conocidos, producidos de forma recombinante, como se describe a continuación. En este contexto, un «dominio Fc original» será relativo a la variante citada; por lo tanto, un «dominio Fc de IgG1 humana variante» se compara con el dominio Fc original de IgG1 humana, un «dominio Fc de IgG4 humana variante» se compara con el dominio Fc original de IgG4 humana, etc.

[0115] Por «disposición de cadenas» en el contexto de los monómeros de los anticuerpos heterodiméricos de la presente invención se entiende que, de manera similar a las dos cadenas de ADN que «coinciden», se incorporan variantes de heterodimerización en cada monómero de manera de preservar la capacidad de «coincidir» para formar heterodímeros. Por ejemplo, si algunas variantes de pl se diseñan en el monómero A (por ejemplo, haciendo que el pl sea más alto), entonces las variantes estéricas que son «pares de carga» que también se pueden utilizar no interfieren con las variantes de pl, por ejemplo, las variantes de carga que hacen que un pl sea más alto se colocan en la misma «cadena» o «monómero» para conservar ambas funcionalidades. De manera similar, para las variantes «sesgadas» que vienen en pares de un conjunto como se describe más detalladamente a continuación, el técnico experto considerará el pl al decidir en qué cadena o monómero irá un conjunto del par, de modo que la separación de pl se maximice mediante el uso de también el pl de las variantes sesgadas.

[0116] Se proporcionan en la presente memoria una serie de dominios de anticuerpos (por

- ejemplo, dominios Fc) que tienen identidad de secuencia con los dominios de anticuerpos humanos. La identidad de secuencia entre dos secuencias similares (por ejemplo, dominios variables de anticuerpos) se puede medir mediante algoritmos como el de Smith, TF y Waterman, MS (1981) «*Comparison Of Biosequences*», *Adv. Appl. Math.* 2:482 [algoritmo de homología local]; Needleman, S.B. & Wunsch, CD. (1970) "A General Method Applicable To The Search For Similarities In The Amino Acid Sequence Of Two Proteins," *J. Mol. Biol.* 48:443 [homology alignment algorithm], Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) "Improved Tools For Biological Sequence Comparison," *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EUA) 85:2444 [search for similarity method]; o Altschul, S.F. et al, (1990) "Basic Local Alignment Search Tool," *J. Mol. Biol.* 215:403-10, el algoritmo «BLAST», véase <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Al utilizar cualquiera de los algoritmos mencionados anteriormente, se utilizan los parámetros predeterminados (para longitud de ventana, penalización de espacio, etc.). En una modalidad, la identidad de secuencia se realiza mediante el uso del algoritmo BLAST, mediante el uso de parámetros predeterminados.
- 15 **[0117]** Los anticuerpos de la presente invención son generalmente aislados o recombinantes. «Aislado», cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente memoria, significa un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular a partir del cual se expresó. Sin embargo, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa
- 20 de purificación. Un «anticuerpo aislado» se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. «Recombinante» significa que los anticuerpos se generan mediante el uso de técnicas de ácido nucleico recombinante en células hospedadoras exógenas y también pueden aislarse.
- 25 **[0118]** «Unión específica» o «se une específicamente a» o es «específico para» un antígeno particular o un epítipo significa una unión que es medible y diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula objetivo en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión.
- 30 Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que sea similar al objetivo.
- [0119]** La unión específica para un antígeno particular o un epítipo puede ser exhibida, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítipo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente

10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10.000 o más veces mayor para una molécula de control en relación con el antígeno o epítipo.

[0120] Además, la unión específica para un antígeno particular o un epítipo puede mostrarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una K_A o K_a para un antígeno o epítipo de al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10.000 o más veces mayor para el epítipo en relación con un control, donde K_A o K_a se refieren a una tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. La afinidad de unión generalmente se mide mediante el uso de un ensayo Biacore, SPR o BLI.

IV. **Anticuerpos anti-CD28 x anti-CD20**

[0121] En una modalidad, se proporcionan en la presente memoria nuevos anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 descritos en la presente memoria son capaces de unirse a moléculas coestimuladoras CD28 en linfocitos T y CD20 en linfocitos B en neoplasias malignas de linfocitos B. Estos anticuerpos mejoran selectivamente la actividad antitumoral contra los linfocitos B que muestran expresión de CD20 en dichas neoplasias malignas de linfocitos B. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente memoria son particularmente útiles en combinación con otras terapias contra el cáncer, incluidos, por ejemplo, anticuerpos multivalentes para el tratamiento de dichas neoplasias malignas de linfocitos B.

[0122] Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 son multivalentes e incluyen al menos dos dominios de unión a antígenos (ABD), donde al menos un dominio de unión a antígenos es un dominio de unión a CD20 y al menos un dominio de unión a antígenos es un dominio de unión a CD28. Cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 adecuado se puede incluir en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 de la invención, incluidos, por ejemplo, los dominios de unión a CD20 y los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria.

[0123] Los dominios de unión a antígenos que se proporcionan en la presente memoria generalmente incluyen un dominio pesado (VH) variable que tiene $vhCDR1$, $vhCDR2$ y $vhCDR3$; y un dominio ligero variable (VL), y un dominio ligero variable (VL) que tiene

vICDR1, vICDR2 y vICDR3.

[0124] Además, como se trató anteriormente, la numeración utilizada en el listado de secuencias y figuras para la identificación de las CDR es Kabat, sin embargo, se puede utilizar una numeración diferente, que cambiará las secuencias de aminoácidos de las CDR como se muestra en la tabla 2.

[0125] Para todos los dominios variables pesados y ligeros enumerados en la presente memoria, se pueden realizar variantes adicionales. Como se describe en la presente memoria, en algunas modalidades el conjunto de 6 CDR puede tener 0, 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones de aminoácidos (las sustituciones de aminoácidos encuentran un uso particular), así como cambios en las regiones marco de los dominios variables pesados y ligeros, siempre que los marcos (lo que excluye las CDR) conserven al menos aproximadamente el 80, 85 o 90 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana seleccionada de las enumeradas en la figura 1 de la patente estadounidense n.º 7,657,380, cuya figura y Leyenda se incorporan a modo de referencia en su totalidad en la presente memoria. Así, por ejemplo, las CDR idénticas como se describen en la presente memoria se pueden combinar con diferentes secuencias marco de secuencias de línea germinal humana, siempre que las regiones marco mantengan al menos un 80, 85, 90, 95 o 99 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana seleccionada de las enumeradas en la figura 1 de la patente estadounidense n.º 7,657,380. De manera alternativa, las CDR pueden tener modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, de 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones de aminoácidos en el conjunto de CDR (es decir, las CDR se pueden modificar siempre que el número total de cambios en el conjunto de 6 CDR sea menor que 6 modificaciones de aminoácidos, con cualquier combinación de CDR que se cambie; por ejemplo, puede haber un cambio en vICDR1, dos en vHCDR2, ninguno en vHCDR3, etc.)), así como tener cambios en la región marco, siempre que las regiones marco conserven al menos 80, 85, 90, 95 o 99 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana seleccionada de las enumeradas en la figura 1 de la patente estadounidense n.º 7,657,380.

[0126] Como observarán los expertos en la técnica, cualquier conjunto de 6 CDR o dominios VH y VL puede estar en el formato scFv o en el formato Fab, que luego se agrega a los dominios constantes pesados y ligeros, donde los dominios constantes pesados comprenden variantes (incluso dentro del dominio CH1 así como del dominio Fc).

[0127] Además, en modalidades en las que el anticuerpo en cuestión incluye un scFv, el scFv puede estar en una orientación desde el extremo N al C del conector VH-scFv-VL o del conector VL-scFv-VH. En algunos formatos, uno o más de los ABD generalmente es un

Fab que incluye un dominio VH en una cadena de proteína (generalmente como un componente de una cadena pesada) y un VL en otra cadena de proteína (generalmente como un componente de una cadena ligera). en la figura 6 se muestran conectores scFv de ejemplo para su uso en los anticuerpos en cuestión.

5 **[0128]**En la presente memoria se detallan con más detalle los dominios de unión de CD20 y los dominios de unión de CD28 útiles que pueden incluirse en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión.

[0129]En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un
10 anticuerpo bivalente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo trivalente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo biespecífico, bivalente. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 incluyen un dominio de unión a CD28 y un dominio de unión a CD20. En modalidades de ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo
15 biespecífico, trivalente. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 incluyen un dominio de unión a CD28 y dos dominios de unión a CD20.

[0130]Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria pueden estar en cualquier formato útil, lo que incluye, por ejemplo, inmunoglobulina canónica, así como los formatos «1 + 1 Fab-scFv-Fc», «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc», «2+1 stack
20 Fab₂-scFv-Fc» y «2+1 mAb-scFv» descritos en la presente memoria (figura 29). Los formatos útiles adicionales incluyen, de modo no taxativo: formatos de «cadena ligera común 1 + 1» y «cadena ligera común 2 + 1», «mAb-Fv», «mAb-scFv», «central-Fv», «un scFv-mAb armado», «scFv-mAb,» «scFv dual» y «tridente» que se proporcionan en la presente memoria (véase, p. ej., la figura 29). Véase también, US20180127501A1, que se
25 incorpora a modo de referencia en la presente memoria, particularmente en la parte pertinente relacionada con los formatos de anticuerpos (véase, p. ej., la figura 2). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 son anticuerpos biespecíficos heterodiméricos que incluyen dominios Fc variantes que tienen cualquiera de las variantes sesgadas de heterodimerización, variantes pl y/o variantes de ablación descritas en la
30 presente memoria. Véase, p. ej., la figura 8.

[0131]Tenga en cuenta que, a menos que se especifique en la presente memoria, el orden de la lista de antígenos en el nombre no confiere estructura; es decir, un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 1 + 1 Fab-scFv-Fc puede tener el scFv unido a CD20 o CD28, aunque en algunos casos, el orden especifica la estructura como se indica.

[0132] Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria incluyen además diferentes dominios de anticuerpos. Como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica, los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen diferentes dominios dentro de las cadenas pesadas y ligeras, que también pueden superponerse. Estos dominios incluyen, de modo no taxativo, el dominio Fc, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio bisagra, el dominio constante pesado (dominio CH1-bisagra-Fc o CH1-bisagra-CH2-CH3), el dominio pesado variable, el dominio ligero variable, el dominio constante ligero, dominios Fab y dominios scFv.

[0133] Como se muestra en la presente memoria, hay una serie de enlaces adecuados (para usar como enlaces de dominio o enlaces scFv) que se pueden usar para unir covalentemente los dominios citados (por ejemplo, scFv, Fab, dominios Fc, dominios VH, dominios VL, etc.), incluidos los enlaces peptídicos tradicionales, generados por técnicas recombinantes. En la figura 7 se muestran ejemplos de enlaces para unir dominios del anticuerpo en cuestión entre sí. En algunas modalidades, el péptido enlace puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido conector debe tener una longitud adecuada para unir dos moléculas de tal manera que asuman la conformación correcta entre sí para que conserven la actividad deseada. En una modalidad, el conector tiene una longitud de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos, preferentemente una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos. En una modalidad, se pueden utilizar conectores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, y en algunas modalidades se utilizan de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos. Los conectores útiles incluyen polímeros de glicina-serina, lo que incluye por ejemplo (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 518), (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 57) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 519), donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros conectores flexibles. De manera alternativa, una variedad de polímeros no proteicos, incluidos, entre otros, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como conectores.

[0134] Otras secuencias conectoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1, pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1. Los enlaces pueden derivarse de la cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, C_κ o C_λ. Los enlaces pueden derivarse de cadenas pesadas de inmunoglobulina de cualquier isotipo, incluidos, por ejemplo, C_γ1, C_γ2, C_γ3, C_γ4, C_α1, C_α2, C_δ, C_ε, y C_μ. Las secuencias de enlace también

pueden derivarse de otras proteínas, como proteínas similares a Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR), secuencias derivadas de la región bisagra y otras secuencias naturales de otras proteínas.

[0135] En algunas modalidades, el conector es un «conector de dominio», utilizado para enlazar dos dominios cualesquiera como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, en el formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, puede haber un conector de dominio que une el extremo C del dominio CH1 del Fab al extremo N del scFv, con otro conector de dominio opcional que une el extremo C del scFv al dominio CH2 (aunque en muchas modalidades la bisagra se utiliza como este conector de dominio). Si bien se puede utilizar cualquier conector adecuado, muchas modalidades utilizan un polímero de glicina-serina como conector de dominio, lo que incluye, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 518), (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 57) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 519), donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4 a 5), así como cualquier secuencia peptídica que permita la unión recombinante de los dos dominios con suficiente longitud y flexibilidad para permitir que cada dominio conserve su función biológica. En algunos casos, y prestando atención a la «variabilidad», como se describe a continuación, se pueden utilizar conectores de dominio cargados, como los que se utilizan en algunas modalidades de conectores scFv. en la figura 7 se muestran ejemplos de conectores de dominio útiles.

[0136] En algunas modalidades, el conector es un conector scFv que se utiliza para unir covalentemente los dominios VH y VL como se trata en la presente memoria. En muchos casos, el conector scFv es un conector scFv cargado, varios de los cuales se muestran en la figura 6. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan conectores scFv cargados, para facilitar la separación en pl entre un primer y un segundo monómero. Es decir, al incorporar un conector scFv cargado, ya sea positivo o negativo (o ambos, en el caso de andamios que utilizan scFv en diferentes monómeros), esto permite que el monómero que comprende el conector cargado altere el pl sin realizar cambios adicionales en los dominios Fc. Estos enlaces cargados se pueden sustituir en cualquier scFv que contenga enlaces estándar. Nuevamente, como observarán aquellos en la técnica, los conectores scFv cargados se utilizan en la «cadena» o monómero correcto, de acuerdo con los cambios deseados en pl. Por ejemplo, como se trata en la presente memoria, para elaborar un anticuerpo heterodímero en formato Fab-scFv-Fc 1 + 1, se calcula el pl original de la región Fv para cada uno de los dominios de unión a antígenos deseados y se elige uno para elaborar un scFv y, dependiendo del pl, se eligen conectores positivos o negativos. Los conectores de dominio cargado también se pueden utilizar para aumentar la separación

de pl de los monómeros de la invención y, por lo tanto, los incluidos en la figura 6 se pueden utilizar en cualquier modalidad de la presente memoria donde se utilice un conector. En algunas modalidades, el scFv es un scFv «grapado» que incluye un «conector grapado». En la presente memoria se describen con más detalle los scFv «grapados» que presentan una estabilidad mejorada y/o una agregación reducida. en la figura 6 se proporcionan ejemplos de conectores básicos que son útiles para su inclusión en dichos scFv «grapados».

[0137]En algunas modalidades, en las que se incluye un scFv en el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 (por ejemplo, el anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc o de formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc), el scFv incluye modificaciones «básicas» que mejoran la estabilidad del scFv y/o reducen la agregación. En modalidades de ejemplo, dichos scFv «grapados» incluyen: a) un primer enlace disulfuro entre una cisteína de VH expuesta a la superficie estructuralmente conservada y una primera cisteína conectora scFv; b) un segundo enlace disulfuro entre una cisteína de VL expuesta a la superficie estructuralmente conservada y una segunda cisteína conectora scFv; o c) el primer enlace disulfuro entre la cisteína de VH expuesta a la superficie estructuralmente conservada y la primera cisteína conectora scFv y el segundo enlace disulfuro entre la cisteína de VL expuesta a la superficie estructuralmente considerada y la segunda cisteína conectora scFv. en la figura 6 se proporcionan ejemplos de «conectores de grapas» de scFv para su inclusión en scFv «grapados». Los métodos para elaborar scFv «grapados» se describen en el documento WO 2021/030657, que se incorpora a modo de referencia en su totalidad, incluidas las partes pertinentes relacionadas con los métodos para elaborar scFv «grapados» y composiciones de scFv «grapados».

[0138]Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 de ejemplo se muestran, por ejemplo, en las figuras 33-36. Durante la producción de cultivos celulares de los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria, el residuo de lisina de extremo C o los residuos de lisina y glicina de extremo C pueden escindirse de los monómeros de la cadena pesada, lo que conduce a variantes con «clipado» de extremo C. Véase, por ejemplo, Jiang y cols., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105:2066-2072 (2016). Por lo tanto, en algunas modalidades que se proporcionan en la presente memoria, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es una variante de uno de los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 representados en las figuras 33-36 que incluye una eliminación de residuos de lisina (-K) de extremo C o residuos de lisina y glicina (-GK) en la «cadena 1» y/o la «cadena 2». En algunas modalidades, la eliminación es G446del y/o K447del. En algunas modalidades, el

anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 está diseñado para incluir una modificación G446del y/o K447del en uno o ambos dominios Fc de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 que se describe en la presente memoria. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye una modificación G446del y/o K447del de origen natural en uno o ambos dominios Fc en comparación con un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 que se proporciona en la presente memoria.

[0139] Las modalidades de los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 se describen con más detalle a continuación.

A. Dominios de unión a CD28

[0140] Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria incluyen al menos un dominio de unión a CD28. Cualquier dominio de unión a CD28 adecuado se puede incluir en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria. En modalidades de ejemplo, el dominio de unión a CD28 es un ABD CD28 agonista que proporciona ventajosamente actividad coestimuladora de linfocitos T.

[0141] Como observarán los expertos en la técnica, los dominios de unión a CD28 adecuados pueden comprender un conjunto de 6 CDR como se muestra en las figuras, ya sea como están subrayados o, en el caso en que se utilice un esquema de numeración diferente, como se describe en la presente memoria y como se muestra en la tabla 2, como las CDR que se identifican mediante el uso de otras alineaciones dentro de las secuencias del dominio pesado (VH) variable y del dominio ligero variable (VL) de los representados en las figuras 15-24 y 26. Los ABD CD28 adecuados también pueden incluir las secuencias VH y VL completas como se muestra en estas secuencias y figuras, utilizadas como scFv o como Fab.

[0142] En algunas modalidades, el ABD CD28 comprende un dominio pesado (VH) variable y un dominio ligero variable (VL), donde el VH se selecciona de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 1, 11, 15, 63, 67, 71, 132-196, 320, 327, 335, 343, 351, 359, 367, 375, 383, 391, 399, 407, 415, 423 y 431, o una variante de estas; y donde VL se selecciona entre las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 5, 19, 75, 79, 200-305, 324, 331, 339, 347, 355, 371, 379, 387, 395, 403, 411, 419 y 435, o una variante de estas.

[0143] Además de los conjuntos de CDR originales descritos en las figuras y el listado de secuencias que forman un ABD para CD28, se proporcionan en la presente memoria ABDs de CD28 variantes que tienen CDR que incluyen al menos una modificación de las CDR de

ABD de CD28 descritos en la presente memoria (por ejemplo, (figuras 15-18, 21 y 26 y el listado de secuencias). En una modalidad, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 de la invención incluye un conjunto de 6 CDR con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con las 6 CDR de un ABD CD28 como se describe en la presente memoria, incluidas las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión incluye un conjunto de 6 CDR con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con las 6 CDR de un ABD CD28 que tiene uno de los siguientes VH y VL:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un
- 10 VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un
- 20 VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

En determinadas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión es capaz de unirse al antígeno CD28, según se mide mediante al menos uno de los siguientes métodos: Biacore, resonancia de plasmón de superficie (SPR), citometría de

30 flujo y/o ensayo BLI (interferometría de biocapa, por ejemplo, ensayo Octet), siendo este último un uso particular en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1).

[0144]En algunas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión incluye 6 CDR que son al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas a las 6 CDR de

un ABD CD28 como se describe en la presente memoria, incluidas las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión incluye 6 CDR que son al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas a las 6 CDR de un ABD CD28 que tiene uno de los siguientes VH y VL:

- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435 (figuras 15, 18, 21 y 26).
- En determinadas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo puede unirse al CD28, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR),
- 25 Biacore, citometría de flujo, y/o ensayo BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octet), y este último puede usarse particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1).
- [0145]** En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un ABD CD28
- 30 que incluye un dominio pesado variable y/o un dominio ligero variable que son variantes de un dominio VH y VL de ABD CD28 que se describe en la presente memoria. En una modalidad, el dominio VH variante y/o el dominio VL tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos de un dominio VH y/o VL de un ABD CD28 que se describe en la presente memoria, incluidas las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de

ejemplo, el dominio VH variante y/o el dominio VL tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos de un dominio VH y/o VL de un ABD CD28 que tiene uno de los siguientes VH y VL:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435 (figuras 15, 18, 21 y 26).
- En algunas modalidades, los cambios se encuentran en un dominio VH. En algunas modalidades, los cambios se encuentran en un dominio de VL. En algunas modalidades, los cambios se encuentran en un dominio VH y VL. En modalidades de ejemplo, el ABD
- 25 CD28 es un scFv y los cambios de aminoácidos introducen residuos de cisteína en las regiones de marco VH y/o VL (FR1-FR4) para permitir el «grapado» del scFv, como se describe en la presente memoria. Véase también la patente WO 2021/030657, que se incorpora a modo de referencia en su totalidad, incluidas las partes pertinentes relacionadas con los métodos para elaborar scFv «grapados» y composiciones de scFv «grapados». Los
- 30 dominios de unión de CD28 «grapados» de ejemplo y los dominios VH/VL que se pueden incluir en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 representados en la presente memoria se incluyen en las figuras 19-21. En determinadas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 puede unirse al CD28, según lo medido al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR), citometría de flujo y/o ensayo de BLI

(interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octed), y este último se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1).

[0146] En una modalidad, el dominio de unión a antígenos CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio pesado (VH) variable que tiene el vhCDR1-3 (es decir, vhCDR1-3) de 1A7_H1sp (SEQ ID NO: 63, figura 19). En algunas modalidades, el dominio de unión a antígenos CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye además cualquiera de los dominios ligeros variables del dominio de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria. En modalidades de ejemplo, los dominios ligeros variables es 1A7_L1.71sp (SEQ ID NO: 79, figura 20) o una variante de este. En determinadas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR), citometría de flujo, y/o ensayo de BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octet), y este último tiene se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1). En modalidades de ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo con formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc», «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc», «2+1 pila Fab₂-scFv-Fc» o «2+1 mAb-scFv».

[0147] En una modalidad, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio pesado (VH) variable que tiene vhCDR1-3 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con el vhCDR1-3 de 1A7_H1sp (SEQ ID NO: 63, figura 19). En algunas modalidades, el dominio de unión a antígenos CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye además cualquiera de los dominios ligeros variables del dominio de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria. En modalidades de ejemplo, los dominios ligeros variables es 1A7_L1.71sp (SEQ ID NO: 79, figura 20) o una variante de este. En determinadas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR), citometría de flujo, y/o ensayo de BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octet), y este último tiene se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1). En modalidades particulares, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1). En modalidades de ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo con formato

«1 + 1 Fab-scFv-Fc», «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc», «2+1 pila Fab₂-scFv-Fc» o «2+1 mAb-scFv».

[0148] En algunas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio pesado (VH) variable que tiene vhCDR1-3 que son al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticos al vhCDR1-3 de 1A7_H1sp (SEQ ID NO: 63, figura 19). En algunas modalidades, el dominio de unión a antígenos CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye además cualquiera de los dominios ligeros variables del dominio de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria. En modalidades de ejemplo, los dominios ligeros variables es 1A7_L1.71sp (SEQ ID NO: 79, figura 20) o una variante de este. En determinadas modalidades, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 puede unirse al CD28, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR) de Biacore, citometría de flujo, y/o ensayo de BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octet), y este último se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1). En modalidades de ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo con formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc», «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc», «2+1 pila Fab₂-scFv-Fc» o «2+1 mAb-scFv».

[0149] En modalidades de ejemplo, el dominio de unión a CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un scFv. En algunas modalidades, el scFv anti-CD28 incluye uno de los VH y/o VL ABD CD28 descritos en la presente memoria o una variante de estos. En algunas modalidades, el scFv anti-CD28 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye una o más modificaciones «básicas» que mejoran la estabilidad o reducen la agregación del scFv. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un scFv «grapado», donde el scFv grapado incluye: a) un primer enlace disulfuro entre una cisteína de VH expuesta a la superficie estructuralmente conservada y una primera cisteína conectora de scFv; b) un segundo enlace disulfuro entre una cisteína de VL expuesta a la superficie estructuralmente conservada y una segunda cisteína conectora de scFv; o c) el primer enlace disulfuro entre la cisteína de VH expuesta a la superficie estructuralmente conservada y una primera cisteína conectora de scFv y el segundo enlace disulfuro entre la cisteína de VL expuesta a la superficie estructuralmente conservada y la segunda cisteína conectora de scFv. En modalidades de ejemplo, el scFv «grapado» es una variante de uno de los ABD CD28 descritos en la presente memoria, donde el ABD CD28 variante incluye: a) una sustitución de aminoácidos para introducir una cisteína de VH expuesta a la superficie; b) una sustitución de aminoácidos para introducir una cisteína de VL expuesta a la superficie; o c) sustituciones de aminoácidos para introducir tanto una cisteína de VH

expuesta a la superficie como una cisteína de VH expuesta a la superficie. En algunas modalidades, los cambios de aminoácidos se encuentran en las regiones marco VH y/o VL (FR1, FR2, FR3 y/o FR4). Los «conectores grapados» de scFv para la inclusión en los scFV «grapados» se proporcionan en la figura 6. Los métodos para elaborar scFv «grapados» se describen, por ejemplo, en la patente WO 2021/030657, la cual se incorpora a modo de referencia en su totalidad, lo que incluye, las partes pertinente que se relacionan con los métodos para elaborar scFV «grapados» y composiciones de scFV «grapados». En modalidades de ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un scFv «grapado» que incluye un VH y VL modificados de un ABD CD28 que tiene uno de los siguientes VH y VL:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435 (figuras 15, 18 y 26).

Los dominios de unión de CD28 «grapados» de ejemplo incluyen, entre otros, los que se muestran en la figura 21.

[0150] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio de unión a CD28 que comprende las CDR seleccionadas entre las siguientes:

- (i) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región

- determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- 5 (ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- 10 (iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 15 (iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 20 (v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- 25 (vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 30 (vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable

- (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- 5 (ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- 10 (x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;
- 15 (xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- 20 (xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- 25 (xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;
- 30 (xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;

- (xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;
- (xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;
- (xvii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xviii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;
- (xx) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380;
- (xxi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 395;

(xxii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;

(xxiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;

(xxiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;

(xxv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(xxvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

[0151] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio de unión a CD28 que comprende las CDR seleccionadas entre las siguientes:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

[0152] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio de unión a CD28 que incluye una VH y VL que se seleccionan de las siguientes:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene

una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5; o

5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5; o

10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 19; o

15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5; o

20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 19; o

25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 75; o

30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 75; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 79; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 111; o

5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 75; o

10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 79.

[0153] En algunas modalidades, el ABD CD28 incluye un VH que es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntico a uno de los siguientes: las SEQ ID NO: 1, 11, 15, 63, 67, 71, 132-196, 320, 327, 335, 343, 351, 359, 367, 375, 383, 391, 399, 407, 415, 423 y 431. En algunas modalidades, el ABD CD28 incluye un VL que es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a una de las siguientes: 5, 19, 75, 79, 200-305, 324, 331, 339, 347, 355, 371, 379, 387, 395, 403, 411, 419 y 435. En determinadas modalidades, el ABD CD28 puede unirse al CD28, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR) de Biacore, citometría de flujo, y/o BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octet) y este último se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD28 es capaz de unirse al antígeno CD28 humano (véase la figura 1).

[0154] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un dominio de unión a CD28 que incluye una VH y VL que se seleccionan de las siguientes:

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL

que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o

10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

[0155] En algunas modalidades, el dominio de unión a CD28 incluido en el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye una vhCDR1 que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO: 307, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 309 y/o una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 311. En algunas
20 modalidades, el dominio de unión a CD28 incluido en el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye una vlCDR1 que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO: 314, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 316, y/o una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 318.

B. Dominios de unión a CD20

25 **[0156]** Dominios de unión a CD20. En algunas modalidades, los anticuerpos del sujeto que incluyen dichos dominios de unión a antígenos CD20 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28) se dirigen ventajosamente a las células que expresan CD20.

[0157] Como los expertos en la técnica observarán, los dominios de unión a CD20
30 adecuados pueden comprender un conjunto de 6 CDR como se ilustra en el listado de secuencia y la figura 30, ya sea que las CDR estén subrayadas o, en el caso donde se usa un esquema de numeración diferente como se describe en la presente memoria y como se muestra en la tabla 2, dado que las CDR que se identifican mediante el uso de otras alineaciones dentro de las secuencias de dominio pesado variable (VH) y de dominio ligero

(VL) variable de aquellas que se ilustran en la figura 30 y el listado de secuencias (véase la tabla 2). Los ABD CD20 adecuados también pueden incluir las secuencias VH y VL completas como se muestra en estas secuencias y figuras, utilizadas como scFv o como dominios Fab.

- 5 **[0158]**En algunas modalidades, el dominio de unión a antígenos CD20 comprende un dominio pesado (VH) variable y un dominio ligero variable (VL), donde el VH se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 439, 447, 455, 463, 471, 473, 475, 477, 479, 481, 483, 487, 489, 491, 495 y 497;
- y el VL se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de
10 las SEQ ID NO: 443, 451, 459, 467, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 490, 492, 496 y 498.
- [0159]**En una modalidad, el dominio de unión a antígenos CD20 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye las 6 CDR (es decir, vhCDR1-3 y vlCDR1-3) de un ABD CD20 que se describe en la presente memoria, incluidas las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el ABD CD20 es uno de los siguientes ABD CD20: CD20-A_H1L1,
15 CD20-A_H1.202_L1.113, CD20-B_H1L1, CD20-C, rituximab, Obinutuzumab, ibritumomab, ocrelizumab, mosunetuzumab, ublituximab, veltuzumab, glofitamab, epcoritamab, TRU-015_SMIP, odronextamab, ripertamab y ocaratuzumab (figura 30).
- [0160]**Además de los conjuntos de CDR originales descritos en las figuras y el listado de secuencias que forman un ABD para CD20, se proporcionan en la presente memoria ABD
20 CD20 variantes que tienen CDR que incluyen al menos una modificación de las CDR de ABD CD20 descritas en la presente memoria. En una modalidad, el ABD CD20 incluye un conjunto de 6 CDR con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con las 6 CDR de un ABD CD20 que se describe en la presente memoria, lo que incluye las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el ABD CD20
25 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye un conjunto de 6 CDR con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con las 6 CDR de un ABD CD20 que tiene uno de los siguientes VH y VL:
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
 - 30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
 - (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
 - (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un
- 25 VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).

[0161]En determinadas modalidades, el ABD CD20 variante puede unirse al antígeno CD20, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR) de Biacore, citometría de flujo, y/o BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octet), y este último se usa particularmente en muchas modalidades. En

30 modalidades particulares, el ABD CD20 puede unirse al antígeno CD20 humano (véase la figura 2).

[0162]En una modalidad, el ABD CD20 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye 6 CDR que son al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas a las 6 CDR de un ABD CD20 como se describe en la presente memoria, lo que incluye las figuras y el listado de secuencias.

En modalidades de ejemplo, el ABD CD20 incluye 6 CDR que son al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas a las 6 CDR de un ABD CD20 que tiene uno de los siguientes VH y VL:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).

[0163] En determinadas modalidades, el ABD CD20 puede unirse al antígeno CD20, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR) de Biacores, citometría de flujo, y/o BLI (interferometría de biocapa, por ejemplo, ensayo de Octet), y este último se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades

5 particulares, el ABD CD20 puede unirse al antígeno CD20 humano (véase la figura 2).

[0164] En otra modalidad de ejemplo, el ABD CD20 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye el dominio pesado (VH) variable y el dominio ligero variable (VL) de cualquiera de los ABD CD20 descritos en la presente memoria, incluidas las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el ABD CD20 incluye uno de los siguientes VH y

10 VL:

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o

15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que

20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o

25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que

30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).
- [0165]** Además de los dominios variables pesados y ligeros variables ABD CD20 originales
- 10 descritos en la presente memoria, se proporcionan en la presente memoria ABD CD20 que incluyen un dominio variable pesado y/o un dominio variable ligero que son variantes de un dominio VH y VL de ABD CD20 que se describe en la presente memoria. En una modalidad, el dominio VH variante y/o dominio VL tiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos de un VH y/o el dominio VL de un ABD CD20 descrito en la presente memoria,
- 15 lo que incluye las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el dominio VH variante y/o dominio VL tiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos de un VH y/o dominio VL de un ABD CD20 que tiene uno de los siguientes VH y VL:
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- 30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).

[0166] En algunas modalidades, los cambios se encuentran en un dominio VH representado en la figura 30. En algunas modalidades, los cambios se encuentran en un dominio VL representado en la figura 30. En algunas modalidades, los cambios se encuentran en un dominio VH y VL representado en la figura 30. En algunas modalidades, los cambios de

20 aminoácidos se encuentran en las regiones marco VH y/o VL (FR1, FR2, FR3 y/o FR4). En determinadas modalidades, el ABD CD20 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 puede unirse al CD20, según lo medido al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR) de Biocore, citometría de flujo y/o ensayo de BLI (interferometría de biocapa, p. ej., ensayo de Octed), y este último se usa particularmente en muchas

25 modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD20 puede unirse al antígeno CD20 humano.

[0167] En una modalidad, el dominio VH y/o VL variante es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntico al VH y/o VL de un ABD CD20 como se describe en la presente memoria, incluidas las figuras y el listado de secuencias. En modalidades de ejemplo, el dominio variante VH

30 y/o VL es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntico al VH y/o VL de un ABD CD20 que tiene uno de los siguientes VH y VL:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).
- 30 **[0168]**En algunas modalidades, el ABD CD20 incluye un VH que es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntico al dominio VH representado en la figura 30. En algunas modalidades, el ABD CD20 incluye un VL que es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntico al dominio VL representado en la figura 30. En algunas modalidades, el ABD CD20 incluye un VH y un VL que es al menos 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntico a un VH y un VL dominios representado en

la figura 30. En determinadas modalidades, el ABD CD20 del anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 puede unirse al CD20, según lo medido mediante al menos uno de una resonancia de plasmones superficiales (SPR) de Biacore, citometría de flujo, y/o BLI (interferometría de biocapa, por ejemplo, ensayo de Octet) y este último se usa particularmente en muchas modalidades. En modalidades particulares, el ABD CD20 puede unirse al antígeno CD20 humano.

[0169] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo bivalente (por ejemplo, anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1+1) que incluye un dominio de unión a CD20. En otras modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 es un anticuerpo trivalente (p. ej., anticuerpo con formato 2+1 Fab₂-scFv-Fc) que incluye dos dominios de unión a CD20.

[0170] En algunas modalidades, las CDR de los dominios de unión de CD20 se seleccionan de las siguientes:

(i) una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (vhCDR1), una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;

(ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;

(iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459;

(iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

- (v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;
- (vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;
- (vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 476;
- (viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;
- (ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;
- (x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;
- (xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 484;

(xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;

(xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;

(xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o

(xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498.

[0171] En algunas modalidades, las CDR de los dominios de unión de CD20 se seleccionan de las siguientes:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y (ii) una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446; o

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470.

[0172]En algunas modalidades, el VH y el VL de los dominio/s de unión a CD20 se seleccionan a partir de los siguiente:

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 443; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 451; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 459; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 467.

[0173]En algunas modalidades, el VH y el VL de los dominio/s de unión a CD20 se seleccionan a partir de los siguiente:

- 5

10

[0174]

- 15

Por ejemplo,

que co

«deriv

«el pro

human

anticu

germir

human

secler

memo

partici

amino

mutac

sitio. S

secue

inmun

identif

secue

ejemp

human

98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humanizado derivado de una secuencia de línea germinal humana particular no mostrará más de 10 a 20 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana (antes de la introducción de cualquier variante de sesgo, pl y ablación en la presente memoria descrita; es decir, la cantidad de variantes es generalmente baja, antes de la introducción de las variantes de la invención). En ciertos casos, el anticuerpo humanizado puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal (nuevamente, antes de la introducción de cualquier variante de sesgo, pl y ablación en la presente memoria descrita; es decir, la cantidad de variantes es generalmente baja, antes de la introducción de las variantes de la invención).

[0175] En una modalidad, el anticuerpo original se maduró por afinidad, como se sabe en la técnica. Se pueden emplear métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración por afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004,590. Se pueden emplear métodos basados en la selección para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpos, incluidos, entre otros, los métodos descritos en Wu y cols., 1999, *J. Mol. Biol.* 294:151-162; Baca y cols., 1997, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-10684; Rosok y cols., 1996, *J. Biol. Chem.* 271(37): 22611-22618; Rader y cols., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 95: 8910-8915; Krauss y cols., 2003, *Protein Engineering* 16(10):753-759, todos ellos que se incorporas en su totalidad a modo de referencia. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de sólo partes de las CDR, incluidos, entre otros, los métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan y cols., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; De Pascalis y cols., 2002, *J. Immunol.* 169:3076-3084, todos que se incorporas en su totalidad a modo de referencia.

D. Anticuerpos heterodiméricos

[0176] En modalidades de ejemplo, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria son anticuerpos biespecíficos heterodiméricos que incluyen dos secuencias de dominio Fc variantes. Estos dominios Fc variantes incluyen modificaciones de aminoácidos para facilitar el autoensamblaje y/o purificación de los anticuerpos heterodiméricos.

[0177] Un problema actual en las tecnologías de anticuerpos es el deseo de anticuerpos

«biespecíficos» que se unan a dos antígenos diferentes simultáneamente, permitiendo así en general que los diferentes antígenos se acerquen y den como resultado nuevas funcionalidades y nuevas terapias. En general, estos anticuerpos se elaboran lo que incluye genes para cada cadena pesada y ligera en las células hospedadoras. Esto generalmente da como resultado la formación del heterodímero deseado (AB), así como de los dos homodímeros (AA y BB (sin incluir los problemas heterodímeros de cadena ligera)). Sin embargo, un obstáculo importante en la formación de anticuerpos biespecíficos es la dificultad de sesgar la formación del anticuerpo heterodimérico deseado sobre la formación de los homodímeros y/o purificar el anticuerpo heterodimérico de los homodímeros.

5 **[0178]** Hay varios mecanismos que pueden utilizarse para generar los anticuerpos heterodiméricos en cuestión. Además, como observarán los expertos en la técnica, estos diferentes mecanismos se pueden combinar para garantizar una alta heterodimerización. Las modificaciones de aminoácidos que facilitan la producción y purificación de heterodímeros se denominan colectivamente, en general, «variantes de heterodimerización». Como se trata a continuación, las variantes de heterodimerización incluyen variantes «sesgadas» (por ejemplo, las variantes de «perillas y agujeros» y «pares de carga» descritas a continuación), así como «variantes pl», que permiten la purificación de heterodímeros a partir de homodímeros. Como se describe en general en la patente estadounidense n.º US 9,605,084, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad y específicamente como se describe a continuación para el análisis de las variantes de heterodimerización, los mecanismos útiles para la heterodimerización incluyen «perillas y agujeros» («KIH») como se describe en la patente estadounidense n.º US 9,605,084, «dirección electrostática» o «pares de carga» como se describe en la patente estadounidense n.º US 9,605,084, variantes pl como se describe en la patente estadounidense n.º US 9,605,084 y variantes generales adicionales de Fc como se describe en la patente estadounidense n.º US 9,605,084 y a continuación.

20 **[0179]** Las variantes de heterodimerización que son útiles para la formación y purificación del anticuerpo heterodimérico en cuestión (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) se tratan con más detalle a continuación.

30

1. Variantes sesgadas

[0180] En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico incluye variantes sesgadas que son una o más modificaciones de aminoácidos en un primer dominio Fc (A) y/o un segundo dominio Fc (B) que favorecen la formación de heterodímeros Fc (dímeros Fc que

incluyen el primer y el segundo dominio Fc; (AB) sobre homodímeros Fc (dímeros Fc que incluyen dos del primer dominio Fc o dos del segundo dominio Fc; AA o BB). Las variantes sesgadas adecuadas se incluyen en la figura 29 de la solicitud de publicación estadounidense n.º 2016/0355608, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad y específicamente por su descripción de variantes sesgadas, así como en las figuras 3 y 9.

[0181] En la técnica se hace referencia generalmente a un tipo particular de variantes sesgadas como «perillas y agujeros», que se refieren a la modificación de aminoácidos que crea influencias estéricas para favorecer la formación heterodimérica y desfavorecer la formación homodimérica, como se describe en USSN 61/596,846, Ridgway y cols., *Protein Engineering* 9(7):617 (1996); Atwell y cols., *J. Mol. Biol.* 1997 270:26; la patente estadounidense n.º 8,216,805, los cuales se incorporan a modo de referencia en su totalidad y específicamente para la descripción de mutaciones de «perillas y agujeros». En la presente memoria a veces se hace referencia a esto como «variantes estéricas». Las figuras identifican una serie de pares «monómero A – monómero B» que se basan en «perillas y agujeros». Además, como se describe en Merchant y cols., *Nature Biotech.* 16:677 (1998), estas mutaciones de «perillas y agujeros» se pueden combinar con enlaces disulfuro para favorecer adicionalmente la formación de heterodímeros Fc.

[0182] Otro método que se utiliza en la generación de heterodímeros se denomina a veces «dirección electrostática», como se describe en Gunasekaran y cols., *J. Biol. Chem.* 285(25):19637 (2010), que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. En la presente memoria a esto se hace referencia a veces como «pares de carga». En esta modalidad, se utiliza electrostática para sesgar la formación hacia la heterodimerización. Los expertos en la técnica observarán que, estas pueden tener un efecto sobre la pl, y por lo tanto sobre la purificación, y así podrían en algunos casos considerarse variantes pl. Sin embargo, como se generaron para forzar la heterodimerización y no se utilizaron como herramientas de purificación, se clasifican como «variantes sesgadas». Estos incluyen, de modo no taxativo, D221E/P228E/L368E emparejado con D221R/P228R/K409R (por ejemplo, estos son «conjuntos correspondientes de monómeros») y C220E/P228E/368E emparejado con C220R/E224R/P228R/K409R.

[0183] En algunas modalidades, las variantes sesgadas favorecen ventajosamente y simultáneamente la heterodimerización basada tanto en el mecanismo de «perillas y agujeros» como en el mecanismo de «dirección electrostática». En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico incluye uno o más conjuntos de dichas variantes sesgadas de

heterodimerización. Estas variantes vienen en «pares» de «conjuntos». Es decir, un conjunto del par se incorpora al primer monómero y el otro conjunto del par se incorpora al segundo monómero. Cabe señalar que estos conjuntos no necesariamente se comportan como variantes de «perillas en agujeros», con una correspondencia uno a uno entre un residuo en un monómero y un residuo en el otro. Es decir, estos pares de conjuntos pueden, en cambio, formar una interfaz entre los dos monómeros que fomenta la formación de heterodímeros y desalienta la formación de homodímeros, permitiendo que el porcentaje de heterodímeros que se forman espontáneamente en condiciones biológicas sea superior al 90 %, en lugar del 50 % esperado (25 % homodímero A/A:50 % heterodímero A/B:25 % homodímero B/B). Las variantes de heterodimerización «sesgadas» de ejemplo se representan en las figuras 3 y 9. Dichas variantes «sesgadas» incluyen, de modo no taxativo: S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q (numeración de la UE).

[0184]En modalidades de ejemplo, el anticuerpo heterodimérico incluye un conjunto de sustitución de aminoácidos variante «sesgada» S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; o un conjunto de sustitución de aminoácidos variante «sesgada» T366S/L368A/Y407V: T366W (que opcionalmente incluye un disulfuro de puente, T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C) (numeración de la UE). En una modalidad de ejemplo, el anticuerpo heterodimérico incluye un conjunto de sustitución de aminoácidos «S364K/E357Q : L368D/K370S». En términos de nomenclatura, el par «S364K/E357Q : L368D/K370S» significa que uno de los monómeros incluye un dominio Fc que incluye las sustituciones de aminoácidos S364K y E357Q y el otro monómero incluye un dominio Fc que incluye las sustituciones de aminoácidos L368D y K370S; como anteriormente, la «disposición de la cadena» de estos pares depende del pl inicial.

[0185]En algunas modalidades, los dominios de heterodimerización de Fc que provocan la heterodimerización de dos dominios Fc diferentes comprenden variantes de aminoácidos en el dominio Fc que incluyen, entre otros, estos pares: S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; o un conjunto de sustitución de aminoácidos de variante «sesgada» T366S/L368A/Y407V : T366W (que opcionalmente incluye un disulfuro de puente, T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C o

T366S/L368A/Y407V/Y354C : T366W/S349C) (numeración de la UE), así como otros en la figura 1. En general, estas variantes de Fc de heterodimerización se realizan en las cadenas principales de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas.

[0186] En algunas modalidades, las variantes sesgadas que se proporcionan en la presente memoria se pueden incorporar opcional e independientemente con cualquier otra modificación, incluidas, entre otras, otras variantes sesgadas (véase, por ejemplo, la figura 37 de la solicitud de publicación estadounidense n.º 2012/0149876, que se incorpora en la presente memoria a modo de referencia, particularmente por su descripción de variantes sesgadas), variantes pl, variantes isotópicas, variantes FcRn, variantes de ablación, etc. en uno o ambos del primer y segundo dominio Fc del anticuerpo heterodimérico. Además, también se pueden incluir o excluir de forma independiente y opcional modificaciones individuales del anticuerpo heterodimérico.

[0187] En algunas modalidades, las variantes sesgadas descritas en la presente memoria se pueden incorporar de manera opcional e independiente con cualquier variante pl (u otras variantes tales como variantes Fc, variantes FcRn, etc.) en uno o ambos monómeros de cadena pesada, y se pueden incluir o excluir de manera independiente y opcional de los anticuerpos heterodiméricos en cuestión.

2. Variantes de purificación

[0188] En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico incluye variantes de purificación que permiten ventajosamente la separación de proteínas heterodiméricas (por ejemplo, anticuerpo biespecífico anti-CD20 x anti-CD28) de proteínas homodímeras.

[0189] Existen varios mecanismos básicos que pueden facilitar la purificación de anticuerpos heterodiméricos. Por ejemplo, las modificaciones de uno o ambos monómeros A y B de la cadena pesada del anticuerpo de modo que cada monómero tenga un pl diferente permiten la purificación isoeléctrica del anticuerpo AB heterodimérico de las proteínas AA y BB monoméricas. De manera alternativa, algunos formatos de andamiaje, como el formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc» y el formato «2 + 1 Fab₂-scFv-Fc», permiten la separación en función del tamaño. Como se describió anteriormente, también es posible «sesgar» la formación de heterodímeros sobre homodímeros mediante el uso de variantes sesgadas. Por lo tanto, una combinación de variantes sesgadas de heterodimerización y variantes de purificación se utilizan en particular en los anticuerpos heterodiméricos que se proporcionan en la presente memoria.

[0190] Además, como se describe más detalladamente a continuación, dependiendo del

formato del anticuerpo heterodimérico, se pueden utilizar variantes de purificación incluidas dentro de la región constante y/o dominios Fc de un monómero, y/o conectores de dominio. En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico incluye modificaciones adicionales para funcionalidades alternativas que también pueden crear cambios de pI, como variantes Fc, FcRn y KO.

[0191] En algunas modalidades, los anticuerpos heterodiméricos en cuestión de la presente memoria incluyen al menos un monómero con una o más modificaciones que alteran el pI del monómero (es decir, una «variante pI»). En general, como observarán los expertos en la técnica, existen dos categorías generales de variantes pI: las que aumentan el pI de la proteína (cambios básicos) y las que disminuyen el pI de la proteína (cambios ácidos). Como se describe en la presente memoria, se pueden realizar todas las combinaciones de estas variantes: un monómero puede ser de tipo salvaje, o una variante que no muestra un pI significativamente diferente del tipo salvaje, y el otro puede ser más básico o más ácido. De manera alternativa, se cambia cada monómero, uno a más básico y otro a más ácido.

[0192] Según el formato del anticuerpo heterodímero, las variantes pI pueden estar incluidas dentro de los dominios constantes y/o Fc de un monómero, o se pueden utilizar conectores cargados, ya sean conectores de dominio o conectores scFv. Es decir, los formatos de anticuerpos que utilizan scFv/s, como el formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc», pueden incluir enlaces scFv cargados (ya sean positivos o negativos), que brindan un aumento adicional de pI para fines de purificación. Como observarán los expertos en la técnica, algunos formatos 1 + 1 Fab-scFv-Fc y 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc son útiles con solo conectores scFv cargados y sin ajustes de pI adicionales, aunque la invención proporciona variantes pI que están en uno o ambos monómeros y/o conectores de dominio cargados también. Además, la ingeniería de aminoácidos adicionales para funcionalidades alternativas también puede conferir cambios de pI, como las variantes Fc, FcRn y KO.

[0193] En los anticuerpos heterodiméricos que utilizan pI como mecanismo de separación para permitir la purificación de proteínas heterodiméricas, se introducen variantes de aminoácidos en uno o ambos polipéptidos monoméricos. Es decir, el pI de uno de los monómeros (denominado en la presente memoria para simplificar como «monómero A») se puede modificar a partir del monómero B, o bien se pueden modificar tanto el monómero A como el B, aumentando el pI del monómero A y disminuyendo el pI del monómero B. Como se describe más detalladamente a continuación, los cambios de pI de uno o ambos monómeros se pueden realizar eliminando o agregando un residuo cargado (por ejemplo, un aminoácido neutro se reemplaza por un residuo de aminoácido cargado positiva o

negativamente, por ejemplo, glicina a ácido glutámico), cambiando un residuo cargado de positivo o negativo a la carga opuesta (ácido aspártico a lisina) o cambiando un residuo cargado a un residuo neutro (por ejemplo, pérdida de una carga; lisina a serina). Algunas de estas variantes se muestran en las figuras 3 y 4.

5 **[0194]** Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico en cuestión incluye modificaciones de aminoácidos en las regiones constantes que alteran el punto isoelectrico (pI) de al menos uno, si no ambos, de los monómeros de una proteína dimérica para formar «anticuerpos pI») mediante la incorporación de sustituciones de aminoácidos («variantes pI» o «sustituciones pI») en uno o ambos monómeros. Como se muestra en la
10 presente memoria, la separación de los heterodímeros de los dos homodímeros se puede lograr si los pI de los dos monómeros difieren en tan solo 0,1 unidades de pH, siendo 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 o más todos valores útiles en la presente invención.

[0195] Como observarán los expertos en la técnica, el número de variantes pI que se deben incluir en cada uno o ambos monómeros para obtener una buena separación dependerá en
15 parte del pI inicial de los componentes, por ejemplo, en los formatos 1+1 Fab-scFv-Fc, 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, 1 + 1 CLC y 2 + 1 CLC, el pI inicial del scFv (1+1 Fab-scFv-Fc, 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc) y Fab/s de interés. Es decir, para determinar qué monómero diseñar o en qué «dirección» (por ejemplo, más positivo o más negativo), se calculan las secuencias Fv de los dos antígenos objetivo y a partir de ahí se toma una decisión. Como se sabe en la
20 técnica, diferentes Fv tendrán diferentes pI iniciales que se aprovechan en la presente invención. En general, como se describe en la presente memoria, los pI están diseñados para dar como resultado una diferencia de pI total de cada monómero de al menos aproximadamente 0,1 logaritmos, siendo preferido entre 0,2 y 0,5 como se describe en la presente memoria.

25 **[0196]** En el caso en que se utilizan variantes pI para lograr la heterodimerización, mediante el uso de las regiones constantes de las cadenas pesadas, se proporciona un enfoque más modular para diseñar y purificar proteínas biespecíficas, incluidos los anticuerpos. Por lo tanto, en algunas modalidades, las variantes de heterodimerización (incluidas las variantes de heterodimerización pI y sesgadas) no están incluidas en las regiones variables, de modo que cada anticuerpo individual debe diseñarse. Además, en algunas modalidades, la
30 posibilidad de inmunogenicidad resultante de las variantes de pI se reduce significativamente al importar variantes de pI de diferentes isotipos de IgG de modo que el pI se cambia sin introducir inmunogenicidad significativa. Por lo tanto, un problema adicional a resolver es la elucidación de dominios constantes de pI bajo con alto contenido de

secuencia humana, por ejemplo, la minimización o evitación de residuos no humanos en cualquier posición particular. Como alternativa o además de las sustituciones isotópicas, la posibilidad de inmunogenicidad resultante de las variantes pl se reduce significativamente al utilizar sustituciones isostéricas (por ejemplo, Asn por Asp y Gln por Glu).

5 **[0197]** Como se tratará a continuación, un beneficio secundario que puede ocurrir con esta modificación de pl es también la extensión de la semivida sérica y el aumento de la unión de FcRn. Es decir, como se describe en la solicitud de publicación estadounidense n.º US 2012/0028304 (que se incorpora a modo de referencia en su totalidad), la reducción del pl de los dominios constantes de anticuerpos (incluidos los que se encuentran en anticuerpos y fusiones de Fc) puede conducir a una retención sérica más prolongada *in vivo*. Estas
10 variantes pl para aumentar la semivida sérica también facilitan los cambios de pl para la purificación.

[0198] Además, cabe señalar que las variantes pl aportan un beneficio adicional para el proceso de análisis y control de calidad de los anticuerpos biespecíficos, ya que la
15 capacidad de eliminar, minimizar y distinguir cuándo están presentes los homodímeros es significativa. De manera similar, es importante la capacidad de probar de manera confiable la reproducibilidad de la producción de anticuerpos heterodiméricos.

[0199] En general, las modalidades de uso particular se basan en conjuntos de variantes que incluyen variantes sesgadas, que fomentan la formación de heterodimerización sobre
20 la formación de homodimerización, junto con variantes de pl, que aumentan la diferencia de pl entre los dos monómeros para facilitar la purificación de heterodímeros a partir de homodímeros.

[0200] Las combinaciones de ejemplo de variantes pl se muestran en las figuras 4 y 5, y en la figura 30 de la solicitud de publicación estadounidense n.º 2016/0355608, las cuales se
25 incorporan en la presente memoria a modo de referencia en su totalidad y específicamente para la descripción de variantes pl. Las combinaciones preferidas de variantes pl se muestran en las figuras 3 y 4. Como se describe en la presente memoria y se muestra en las figuras, estos cambios se muestran en relación con IgG1, pero todos los isotipos se pueden alterar de esta manera, así como los híbridos de isotipos. En el caso en que el
30 dominio constante de la cadena pesada sea de IgG2-4, también se pueden utilizar R133E y R133Q.

[0201] En una modalidad, una combinación preferida de variantes de pl tiene un monómero (el lado Fab negativo) que comprende las variantes 208D/295E/384D/418E/421D (N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D cuando se relaciona con IgG1 humana) y un

segundo monómero (el lado scFv positivo) que comprende un conector scFv cargado positivamente, que incluye (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42). Sin embargo, como observarán los expertos en la técnica, el primer monómero incluye un dominio CH1, incluida la posición 208. Por consiguiente, en construcciones que no incluyen un dominio CH1 (por ejemplo, para anticuerpos que no utilizan un dominio CH1 en uno de los dominios), un conjunto de Fc de variante pl negativa preferida incluye las variantes 295E/384D/418E/421D (Q295E/N384D/Q418E/N421D cuando se relaciona con IgG1 humana).

[0202] Por consiguiente, en algunas modalidades, un monómero tiene un conjunto de sustituciones de la figura 8 y el otro monómero tiene un conector cargado (ya sea en forma de un conector scFv cargado porque ese monómero comprende un scFv o un conector de dominio cargado, según lo dicte el formato, que puede seleccionarse entre los representados en la figura 6).

[0203] En algunas modalidades, se realizan modificaciones en la bisagra del dominio Fc, incluidas las posiciones 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229 y 230 según la numeración de la UE. Por lo tanto, se pueden realizar mutaciones de pl y particularmente sustituciones en una o más de las posiciones 216-230, siendo útiles 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones. Nuevamente se contemplan todas las combinaciones posibles, solo o con otras variantes de pl en otros dominios.

[0204] Las sustituciones específicas que se utilizan para reducir el pl de los dominios bisagra incluyen, entre otras, una eliminación en la posición 221, una valina o treonina no natural en la posición 222, una eliminación en la posición 223, un ácido glutámico no natural en la posición 224, una eliminación en la posición 225, una eliminación en la posición 235 y una eliminación de una alanina no natural en la posición 236. En algunos casos, solo se realizan sustituciones pl en el dominio bisagra y, en otros, estas sustituciones se agregan a otras variantes pl en otros dominios en cualquier combinación.

[0205] En algunas modalidades, se pueden realizar mutaciones en la región CH2, incluidas las posiciones 233, 234, 235, 236, 274, 296, 300, 309, 320, 322, 326, 327, 334 y 339, según la numeración de la UE. Cabe señalar que se pueden realizar cambios en 233-236 para aumentar la función efectora (junto con 327A) en la cadena principal de IgG2. Nuevamente, se pueden realizar todas las combinaciones posibles de estas 14 posiciones; por ejemplo, un anticuerpo que se proporciona en la presente memoria puede incluir un dominio Fc variante con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de pl de CH2.

[0206] Las sustituciones específicas que se utilizan para reducir el pl de los dominios CH2 incluyen, entre otras, una glutamina o ácido glutámico no natural en la posición 274, una

fenilalanina no natural en la posición 296, una fenilalanina no natural en la posición 300, una valina no natural en la posición 309, un ácido glutámico no natural en la posición 320, un ácido glutámico no natural en la posición 322, un ácido glutámico no natural en la posición 326, una glicina no natural en la posición 327, un ácido glutámico no natural en la posición 334, una treonina no natural en la posición 339 y todas las combinaciones posibles dentro de CH2 y con otros dominios.

[0207] En esta modalidad, las modificaciones se pueden seleccionar de forma independiente y opcional de las posiciones 355, 359, 362, 384, 389, 392, 397, 418, 419, 444 y 447 (numeración de la UE) de la región CH3. Las sustituciones específicas que se utilizan para reducir el pI de los dominios CH3 incluyen, entre otras, una glutamina o ácido glutámico no natural en la posición 355, una serina no natural en la posición 384, una asparagina o ácido glutámico no natural en la posición 392, una metionina no natural en la posición 397, un ácido glutámico no natural en la posición 419, un ácido glutámico no natural en la posición 359, un ácido glutámico no natural en la posición 362, un ácido glutámico no natural en la posición 389, un ácido glutámico no natural en la posición 418, un ácido glutámico no natural en la posición 444 y una eliminación o ácido aspártico no natural en la posición 447.

[0208] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 incluye sustituciones de aminoácidos en uno de sus dominios Fc que reducen la unión a la proteína A. Dichas variantes de purificación producen heterodímeros con unión asimétrica a la proteína A, que a su vez se pueden utilizar para la separación de poblaciones heterodiméricas de homodímeros mediante un gradiente de pH. Las sustituciones de aminoácidos de purificación de ejemplo que reducen la unión a la proteína A incluyen, entre otras, H435R e Y436F (dominio CH3 de IgG1, numeración de la UE). Véase, por ejemplo, US2010331527, que se incorpora a modo de referencia en su totalidad, y específicamente para las descripciones pertinentes relacionadas con modificaciones del dominio Fc para reducir la unión de la proteína A.

3. Variantes isotópicas

[0209] Además, muchas modalidades de los anticuerpos heterodiméricos en cuestión dependen de la «importación» de aminoácidos pI en posiciones particulares de un isotipo de IgG a otro, reduciendo o eliminando así la posibilidad de que se introduzca inmunogenicidad no deseada en las variantes. Algunos de estos se muestran en la figura 21 de la publicación estadounidense 2014/0370013, que se incorpora a la presente a modo

de referencia. Es decir, IgG1 es un isotipo común para los anticuerpos terapéuticos debido a muchas razones, incluida una alta función efectora. Sin embargo, la región constante pesada de IgG1 tiene un pI más alto que el de IgG2 (8.10 versus 7.31). Al introducir residuos de IgG2 en posiciones particulares en la cadena principal de IgG1, el pI del monómero resultante se reduce (o aumenta) y además muestra una semivida sérica más prolongada. Por ejemplo, la IgG1 tiene una glicina (pI 5.97) en la posición 137, y la IgG2 tiene un ácido glutámico (pI 3.22); la importación del ácido glutámico afectará el pI de la proteína resultante. Como se describe a continuación, generalmente se requieren varias sustituciones de aminoácidos para afectar significativamente el pI del anticuerpo variante. Sin embargo, debe tenerse en cuenta, como se analiza más adelante, que incluso los cambios en las moléculas de IgG2 permiten una mayor semivida sérica.

[0210] En otras modalidades, se realizan cambios de aminoácidos no isotópicos, ya sea para reducir el estado de carga general de la proteína resultante (por ejemplo, cambiando un aminoácido de pI más alto a un aminoácido de pI más bajo), o para permitir adaptaciones en la estructura para la estabilidad, etc., como se describe más adelante.

[0211] Además, mediante la ingeniería pI de los dominios constantes pesados y ligeros, se pueden observar cambios significativos en cada monómero del heterodímero. Como se trata en la presente memoria, tener los pI de los dos monómeros que difieren en al menos 0,5 puede permitir la separación mediante cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico.

4. Cálculo del pI

[0212] El pI de cada monómero de los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria puede depender del pI del dominio constante de cadena pesada variante y del pI del monómero total, incluido el dominio constante de cadena pesada variante y el socio de fusión. Por lo tanto, en algunas modalidades, el cambio en pI se calcula sobre la base del dominio constante de cadena pesada variante, mediante el uso del gráfico de la figura 19 de la publicación estadounidense 2014/0370013. Como se trata en la presente memoria, el monómero a diseñar generalmente se decide según el pI inherente de las regiones Fv y de andamiaje. De manera alternativa, se puede comparar el pI de cada monómero.

5. Variantes de pI que también confieren una mejor unión de FcRn *in vivo*

[0213] En el caso en que la variante pI disminuya el pI del monómero, la variante pI puede tener el beneficio adicional de mejorar la retención de suero *in vivo*.

[0214] Aunque todavía están bajo estudio, se cree que las regiones Fc tienen semividas más largas *in vivo*, porque la unión a FcRn a pH 6 en un endosoma secuestra el Fc (Ghetie y Ward, 1997 *Immunol Today*. 18(12): 592-598, que se incorpora íntegramente a modo de referencia). Luego, el compartimento endosómico recicla el Fc a la superficie celular. Una vez que el compartimento se abre al espacio extracelular, el pH más alto, ~7,4, induce la liberación de Fc nuevamente a la sangre. En ratones, Dall'Acqua y cols. demostraron que los mutantes Fc con mayor unión de FcRn a pH 6 y pH 7,4 en realidad tenían concentraciones séricas reducidas y la misma semivida que el Fc de tipo salvaje (Dall'Acqua y cols. 2002, *J. Immunol*. 169:5171-5180, que se incorpora íntegramente a modo de referencia). Se cree que la mayor afinidad de Fc por FcRn a pH 7,4 impide la liberación de Fc nuevamente a la sangre. Por lo tanto, las mutaciones de Fc que aumentarán la semivida de Fc *in vivo* idealmente aumentarán la unión de FcRn a un pH más bajo mientras que aún permiten la liberación de Fc a un pH más alto. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el rango de pH de 6,0 a 7,4. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar residuos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn.

[0215] Recientemente se ha sugerido que los anticuerpos con regiones variables que tienen puntos isoeléctricos más bajos también pueden tener semividas séricas más largas (Igawa y cols., 2010 *PEDS*. 23(5): 385-392, que se incorpora íntegramente a modo de referencia). Sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre aún no se entiende bien. Además, las regiones variables difieren de un anticuerpo a otro. Las variantes de la región constante con pl reducido y semivida extendida proporcionarían un enfoque más modular para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos, como se describe en la presente memoria.

25 E. Variantes adicionales de Fc para una funcionalidad adicional

[0216] Además de las variantes de heterodimerización analizadas anteriormente, hay una serie de modificaciones útiles de aminoácidos Fc que se pueden realizar por diversas razones, incluidas, entre otras, la alteración de la unión a uno o más receptores FcγR, la alteración de la unión a los receptores FcRn, etc., como se tratará a continuación.

[0217] Por consiguiente, los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria (heterodiméricos, así como homodiméricos) pueden incluir dichas modificaciones de aminoácidos con o sin las variantes de heterodimerización descritas en la presente memoria (por ejemplo, las variantes pl y las variantes estéricas). Cada conjunto de variantes puede incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de cualquier proteína heterodimérica

particular.

1. Variantes de FcγR y FcRn

[0218] Por consiguiente, hay una serie de sustituciones de Fc útiles que pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. En determinadas modalidades, el anticuerpo en cuestión incluye modificaciones que alteran la unión a uno o más receptores FcγR (es decir, «variantes FcγR»). Las sustituciones que resultan en una mayor unión, así como en una menor unión pueden ser útiles. Por ejemplo, se sabe que una mayor unión a FcγRIIIa generalmente da como resultado un aumento de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana). De manera similar, la disminución de la unión a FcγRIIb (un receptor inhibitor) también puede ser beneficiosa en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos que se utilizan en los anticuerpos en cuestión incluyen aquellas enumeradas en las patentes estadounidenses n.º 8,188,321 (particularmente la figura 41) y 8,084,582, y las solicitudes de publicación estadounidenses n.º 20060235208 y 20070148170, las cuales se incorporan expresamente en la presente memoria a modo de referencia en su totalidad y específicamente para las variantes allí descritas que afectan la unión del receptor Fcγ. Las variantes particulares que se utilizan incluyen, de modo no taxativo, 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V y 299T. Dicha modificación puede incluirse en uno o ambos dominios Fc del anticuerpo en cuestión.

[0219] En algunas modalidades, el anticuerpo en cuestión incluye una o más modificaciones de Fc que aumentan la semivida sérica. Las sustituciones de Fc que se utilizan para aumentar la unión al receptor FcRn y aumentar la semivida sérica, como se describe específicamente en USSN 12/341.769, que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad, lo que incluye, entre otros, 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I o V/434S, 436V/428L, 259I/308F/428L y M252Y/S254T/T256E. Dicha modificación puede incluirse en uno o ambos dominios Fc del anticuerpo en cuestión.

2. Variantes de ablación

[0220] En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico incluye una o más

modificaciones que reducen o eliminan la unión normal del dominio Fc a uno o más o todos los receptores Fcγ (por ejemplo, FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar mecanismos de acción adicionales. Estas modificaciones se denominan «variantes de ablación de FcγR» o variantes «Fc knock out (FcKO o KO)». En estas modalidades, para algunas aplicaciones terapéuticas, es deseable reducir o eliminar la unión normal del dominio Fc a uno o más o todos los receptores Fcγ (por ejemplo, FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar mecanismos de acción adicionales. Es decir, por ejemplo, en muchas modalidades, particularmente en el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen a CD28 de forma monovalente, generalmente es deseable eliminar la unión de FcγRIIIa para eliminar o reducir significativamente la actividad de ADCC. En algunas modalidades, de los anticuerpos objeto descritos en la presente memoria, al menos uno de los dominios Fc comprende una o más variantes de ablación del receptor Fcγ. En algunas modalidades, de los anticuerpos en cuestión descritos en la presente memoria, ambos dominios de Fc comprenden una o más variantes de ablación del receptor Fcγ. Estas variantes de ablación se representan en la figura 5, y cada una puede incluirse o excluirse de forma independiente y opcional, con modalidades preferidas que utilizan variantes de ablación seleccionadas del grupo que consiste en: L234A/L235A/D265S, G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y E233P/L234V/L235A/G236del. Cabe señalar que las variantes de ablación a las que se hace referencia en la presente memoria eliminan la unión de FcγR, pero generalmente no la unión de FcRn.

[0221] Como se sabe en la técnica, el dominio Fc de la IgG1 humana tiene la unión más alta a los receptores Fcγ y, por lo tanto, se pueden utilizar variantes de ablación cuando el dominio constante (o dominio Fc) en la estructura del anticuerpo heterodimérico es IgG1. De manera alternativa, o además de las variantes de ablación en un fondo IgG1, las mutaciones en la posición de glicosilación 297 (generalmente en A o S) pueden eliminar significativamente la unión a FcγRIIIa, por ejemplo. La IgG2 y la IgG4 humanas tienen una unión naturalmente reducida a los receptores Fcγ y, por lo tanto, esas estructuras se pueden utilizar con o sin las variantes de ablación.

F. Combinación de variantes heterodiméricas y Fc

[0222] Como observarán los expertos en la técnica, todas las variantes de heterodimerización mencionadas (incluidas las variantes sesgadas y/o de purificación) se

pueden combinar opcional e independientemente de cualquier manera, siempre que conserven su «cadena» o «partición de monómeros». Además, todas estas variantes pueden combinarse en cualquiera de los formatos de heterodimerización.

[0223] En el caso de variantes de pl, aunque en las figuras se muestran modalidades que encuentran un uso particular, se pueden generar otras combinaciones, siguiendo la regla básica de alterar la diferencia de pl entre dos monómeros para facilitar la purificación.

[0224] Además, cualquiera de las variantes de heterodimerización (variantes sesgadas y de purificación) también se combinan de forma independiente y opcional con variantes de ablación de Fc, variantes de Fc, variantes de FcRn, como se describe en general en la presente memoria.

[0225] La combinación de ejemplo de variantes que se incluyen en algunas modalidades de los anticuerpos heterodiméricos de formato 1+1 Fab-scFv-Fc, 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, 2+1 pila Fab₂-scFv-Fc y 2+1 mAb-scFv se incluyen en la figura 8. En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico incluye una combinación de variantes como se representa en la figura 8. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo heterodimérico de formato 1+1 Fab-scFv-Fc, 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, 2+1 pila Fab₂-scFv-Fc y 2+1 mAb-scFv que incluye la combinación de variantes de «plataforma X» representada en la figura 8. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo heterodimérico de formato 1+1 Fab-scFv-Fc, 2 + 1 Fab Anticuerpo en formato₂-scFv-Fc, 2+1 stack Fab₂-scFv-Fc y 2+1 mAb-scFv que incluye la combinación de variantes de «plataforma Y» representada en la figura 8.

G. Formatos de anticuerpos útiles

[0226] Como lo observarán los expertos en la técnica y se analizará con más detalle a continuación, los anticuerpos biespecíficos heterodiméricos que se proporcionan en la presente memoria pueden adoptar varias configuraciones diferentes, como se muestra de manera general en la figura 29.

[0227] Como observarán los expertos en la técnica, los formatos heterodiméricos de la invención pueden tener diferentes valencias y también ser biespecíficos. Es decir, los anticuerpos heterodiméricos de la invención pueden ser bivalentes y biespecíficos, o trivalentes y biespecíficos, donde el primer antígeno está unido por dos dominios de unión y el segundo antígeno por un segundo dominio de unión. Como se describe en la presente memoria, cuando el CD28 es uno de los antígenos objetivo, es preferible que el CD28 esté unido solo de forma monovalente.

[0228] La presente invención utiliza dominios de unión de CD28 en combinación con dominios de unión de CD20. Como podrán apreciar aquellos en la técnica, se puede utilizar cualquier colección de CDR anti-CD28, dominios ligeros variables y pesados variables anti-CD28, Fab y scFv como los que se muestran en cualquiera de las Figuras (véanse particularmente las figuras 15-24 y 26). De manera similar, se puede utilizar cualquiera de los dominios de unión del antígeno CD20, ya sea que se puedan utilizar CDR, dominios ligeros variables y pesados variables, Fab y scFv como se muestra en cualquiera de las figuras (por ejemplo, figura 30), combinados opcional e independientemente en cualquier combinación.

1. Formato 1+1 Fab-scFv-Fc

[0229] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria es el formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc» o «abridor de botellas», como se muestra en la figura 29A. El anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc incluye un primer monómero que es una cadena pesada «regular» (VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3), donde VH1 es un primer dominio pesado variable y CH2-CH3 es un primer dominio Fc. El Fab-scFv-Fc 1 + 1 también incluye una cadena ligera que incluye un primer dominio ligero variable VL1 y un dominio ligero constante CL. La cadena ligera interactúa con el VH1-CH1 del primer monómero para formar un primer dominio de unión a antígenos que es un Fab. El segundo monómero del anticuerpo incluye un segundo dominio de unión que es un Fv de cadena sencilla («scFv», como se define a continuación) y un segundo dominio Fc. El scFv incluye un segundo dominio pesado variable (VH2) y un segundo dominio ligero variable (VL2), donde el VH2 está unido al VL2 mediante un conector scFv que se puede cargar (ver, por ejemplo, la figura 6). El scFv se une a la cadena pesada mediante un conector de dominio (véase, por ejemplo, la figura 7). Los dos monómeros se unen mediante el uso de variantes de aminoácidos (por ejemplo, variantes de heterodimerización, analizadas anteriormente) en las regiones constantes (por ejemplo, el dominio Fc, el dominio CH1 y/o la región bisagra) que promueven la formación de anticuerpos heterodiméricos como se describe con más detalle a continuación. Esta estructura a veces se denomina en la presente memoria formato «abrebotellas», debido a su similitud visual con un abridor de botellas. En algunas modalidades, el anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 es un anticuerpo bivalente.

[0230] El actual formato «1 + 1 Fab-scFv-Fc» presenta varias ventajas distintivas. Como se sabe en la técnica, los análogos de anticuerpos que se basan en dos construcciones scFv

a menudo tienen problemas de estabilidad y agregación, que se pueden aliviar en la presente invención mediante la adición de un emparejamiento de cadena pesada y ligera «regular». Además, a diferencia de los formatos que se basan en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, no hay problemas con el emparejamiento incorrecto de cadenas pesadas y ligeras (por ejemplo, emparejamiento pesado 1 con ligero 2, etc.).

[0231] En algunas modalidades del anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc, uno del primer o segundo dominio de unión a antígenos es un dominio de unión a CD28 y el otro dominio de unión es un dominio de unión de CD20. En algunas modalidades donde el 1 + 1 Fab-scFv-Fc, es el scFv el que se une al CD28 y el Fab el que se une al CD20. en la figura 33 se muestran ejemplos de anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 en el formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc.

[0232] En algunas modalidades, el primer y segundo dominio Fc del anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc son dominios Fc variantes que incluyen variantes sesgadas de heterodimerización (por ejemplo, un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en las figuras 3 y 9). Las variantes sesgadas de heterodimerización particularmente útiles incluyen S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C (numeración de la UE)). En modalidades de ejemplo, uno de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el otro de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0233] En algunas modalidades, los dominios Fc variantes incluyen variantes de ablación (incluidas las que se muestran en la figura 5). En algunas modalidades, cada uno de los primeros y segundos dominios Fc variantes incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0234] En algunas modalidades, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes pl (incluidas las que se muestran en la figura 4). En modalidades de ejemplo, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer

monómero incluye variantes de pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0235] En modalidades de ejemplo, el anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 incluye modificaciones de aminoácidos de la «Plataforma X» como se muestra en la figura 8. En dichas modalidades, la bisagra CH1-CH2-CH3 del primer monómero comprende las variantes de aminoácidos L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, el segundo dominio Fc comprende las variantes de aminoácidos S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0236] En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (incluidos los que se muestran en la figura 6). En algunas modalidades, el anticuerpo en formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 que se proporciona en la presente memoria incluye variantes de FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0237] En modalidades de ejemplo de anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 con variantes de «Plataforma X», el primer dominio Fc incluye las variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q; cada uno de los dominios Fc primero y segundo incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K; y el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye las variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42). En algunas modalidades, el anticuerpo en formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 que se proporciona en la presente memoria incluye variantes de FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (incluidos los que se muestran en la figura 6).

[0238] En modalidades de ejemplo, el anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 incluye modificaciones de aminoácidos de la «Plataforma Y» como se muestra en la figura 8. En dichas modalidades, el primer dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos L234A/L235A/D265S/T366S/L368A/Y407V/H435R/Y436F, y el primer dominio Fc

comprende sustituciones de aminoácidos L234A/L235A/D265S/LT366W, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0239] En modalidades de ejemplo de anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 con variantes de la Plataforma Y, el primer dominio Fc incluye variantes sesgadas de heterodimerización T366S/L368A/Y407V y el segundo dominio Fc incluye variantes sesgadas de heterodimerización T366W; cada uno de los dominios Fc primero y segundo variantes incluye variantes de ablación L234A/L235A/D265S; y el segundo dominio Fc incluye variantes de purificación H435R/Y436F, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye variantes de FcRn M252Y/S254T/T256E, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (incluidos los que se muestran en la figura 6).

[0240] En modalidades de ejemplo, el anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc con variantes de la Plataforma J incluye además un scFv «grapado» (por ejemplo, un scFv anti-CD28 «grapado»). Los scFv «grapados» que muestran la estabilidad mejorada y/o la agregación reducida se describen adicionalmente con detalle en la presente memoria. en la figura 6 se proporcionan conectores grapados de ejemplo que son útiles para su inclusión en dichos scFv «grapados». En modalidades de ejemplo, el enlace grapado es GGGSGGSGGCPPCGGSGG (SEQ ID NO: 56).

[0241] En algunas modalidades, uno del primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se une a CD20 y el otro dominio de unión se une a CD28. Cualquier dominio de unión a CD28 adecuado se puede incluir en el anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc del sujeto, incluido cualquiera de los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria.

[0242] En algunas modalidades del formato 1+1 Fab-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene las CDR que se seleccionan de las siguientes:

(i) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 5;

(ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3

de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;

(x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;

(xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;

(xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;

(xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;

(xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335, y una región

determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;

5 (xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;

10 (xvii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;

15 (xviii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;

20 (xix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;

25 (xx) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380;

30 (xxi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395;

(xxii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada

variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;

5 (xxiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;

10 (xxiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;

15 (xxv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

20 (xxvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

25 **[0243]** En algunas modalidades del formato 1+1 Fab-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene las CDR que se seleccionan de las siguientes:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

30

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una

- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.
- [0244]**En algunas modalidades del formato 1+1 Fab-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes o una variante de estos:
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

[0245] En algunas modalidades, uno del primer dominio de unión o del segundo dominio de unión del anticuerpo con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc se une a CD20. En algunas modalidades del formato 1+1 Fab-scFv-Fc, el ABD anti-CD20 tiene las CDR que se

20 seleccionan de las siguientes:

- (i) una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (vhCDR1), una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio
- 25 de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;
- (ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3
- 30 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;
- (iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3

de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459;

(iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

(vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;

(vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 476;

(viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;

(ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;

(x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481, y una región

determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;

5 (xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484;

10 (xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

15 (xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;

20 (xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;

25 (xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o

30 (xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498.

[0246]En algunas modalidades del formato 1+1 Fab-scFv-Fc, el ABD anti-CD20 tiene las

CDR que se seleccionan de las siguientes:

- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y (ii) una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470.
- [0247]** En algunas modalidades del formato 1+1 Fab-scFv-Fc, el ABD anti-CD20 tiene un dominio de VH y VL que se selecciona de los siguientes:
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467 o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).
- [0248]** En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 comprende:
- (a) un dominio de unión a CD28 que comprende:
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
- 30 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
- (b) un dominio de unión a CD20 que comprende:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462.

[0249] La figura 10 muestra algunas secuencias de dominio Fc de ejemplo que son útiles en los anticuerpos con formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc. Las secuencias «monómero 1» representadas en la figura 10 generalmente se refieren al dominio Fc de la «cadena pesada Fab-Fc» y las secuencias «monómero 2» se refieren al dominio Fc de la «cadena pesada scFv-Fc». Además, las figuras 12 y 13 proporcionan dominios bisagra CH1, dominios CH1 y dominios bisagra de ejemplo que pueden incluirse en el primer o segundo monómero del formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc. Además, la figura 14 proporciona secuencias CL útiles que pueden utilizarse con este formato.

[0250] En la figura 33 se proporcionan anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 de ejemplo en el formato 1+1 Fab-scFv-Fc.

[0251] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 comprenden:

- a) un primer monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 405, 422, 427, 436, 453, 456, 461 y 485;
- 20 b) un segundo monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 406, 417, 418, 421, 428, 430, 432, 434, 438, 448, 468, 469 y 486; y
- c) una cadena ligera seleccionada de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 334, 366, 426 y 429.

[0252] En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en el formato 1+1 Fab-scFv-Fc es XENP42157 o una variante de este (véase la figura 33M). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en el formato 1+1 Fab-scFv-Fc incluye:

- a) un primer monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461; b)
- un segundo monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 469; y
- 30 c) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429. En algunas modalidades, la variante XENP42157 incluye una eliminación de una lisina de extremo C (-K) o lisina y glicina (-GK) en el primer monómero o segundo monómero.

2. Formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc

[0253] Un formato de anticuerpo heterodimérico se utiliza particularmente en los

anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria es el formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc (también denominado «formato scFV central») que se muestra en la figura 29B. Este formato de anticuerpo incluye tres dominios de unión a antígeno: dos porciones Fab y un scFv que se inserta entre las regiones VH-CH1 y CH2-CH3 de uno de los monómeros. En algunas modalidades de este formato, las porciones Fab se unen a CD20 y el dominio scFv «extra» se une a CD28. En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc es un anticuerpo trivalente.

[0254] En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, un primer monómero incluye una cadena pesada estándar (es decir, VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3), donde VH1 es un primer dominio pesado variable y CH2-CH3 es un primer dominio Fc. Un segundo monómero incluye otro primer dominio pesado variable (VH1), un dominio CH1 (y bisagra opcional), un segundo dominio Fc y un scFv que incluye un dominio ligero variable scFv (VL2), un conector scFv y un dominio pesado variable scFv (VH2). El scFv está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del segundo monómero y el extremo N del segundo dominio Fc mediante el uso de conectores de dominio opcionales (VH1-CH1-[conector opcional]-VH2-conector scFv-VH2-[conector opcional]-CH2-CH3, o la orientación opuesta para el scFv, VH1-CH1-[conector opcional]-VL2-conector scFv-VH2-[conector opcional]-CH2-CH3). Los conectores opcionales pueden ser cualquier conector peptídico adecuado, lo que incluye, por ejemplo, los conectores de dominio incluidos en la figura 7. Esta modalidad utiliza además una primera y una segunda cadena ligera que incluyen cada una un dominio ligero variable (VL1) y un dominio ligero constante (CL). La primera cadena ligera se asocia con el VH1-CH1 del primer monómero y la segunda cadena ligera se asocia con el VH1-CH1 del segundo monómero para formar dos Fab idénticos. En algunas modalidades, los Fab idénticos se unen a CD20. Al igual que muchas de las modalidades descritas en la presente memoria, estas construcciones pueden incluir variantes sesgadas, variantes pl, variantes de ablación, variantes Fc adicionales, etc. según se desee y se describe en la presente memoria.

[0255] En algunas modalidades, el primer y el segundo dominio Fc del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc son dominios Fc variantes que incluyen las variantes sesgadas de heterodimerización (p. ej., un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en las figuras 3 y 9). Las variantes sesgadas de heterodimerización particularmente útiles incluyen S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C (numeración

de la UE)). En modalidades de ejemplo, uno de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el otro de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0256] En algunas modalidades, los dominios Fc variantes incluyen variantes de ablación (incluidas las que se muestran en la figura 5). En algunas modalidades, cada uno de los primeros y segundos dominios Fc variantes incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0257] En algunas modalidades, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes pl (incluidas las que se muestran en la figura 4). En modalidades de ejemplo, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes de pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0258] En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-F que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (incluido aquellos que se muestran en la figura 6). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye variantes de FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0259] En modalidades de ejemplo el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc con variantes «Plataforma X», el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q; cada uno del primero y segundo dominio Fc variante incluyen variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K; y el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye variantes de FcRn

M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0260] En algunas modalidades, la bisagra CH1-CH2-CH3 del primer monómero comprende las variantes de aminoácidos L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, y el segundo dominio Fc comprende las variantes de aminoácidos S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0261] En modalidades de ejemplo, el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc incluye las modificaciones de aminoácidos de «Plataforma Y» según lo representado en la figura 8. En dichas modalidades, el primer dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A/L235A/D265S/T366S/L368A/Y407V/H435R/Y436F, y el primer dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A/L235A/D265S/LT366W, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0262] En modalidades de ejemplo del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc con variantes de Plataforma Y, el primer dominio Fc incluye variantes sesgadas de heterodimerización T366S/L368A/Y407V y el segundo dominio Fc incluye variantes sesgadas de heterodimerización T366W; cada uno del primero y segundo dominio Fc variante incluyen variantes de ablación L234A/L235A/D265S; y el segundo dominio Fc incluye variantes de purificación H435R/Y436F, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye las variantes FcRn M252Y/S254T/T256E, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye a conector scFv cargado (incluidos los que se muestran en la figura 6).

[0263] En modalidades de ejemplo, el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc con variantes de Plataforma Y incluye además un scFv «grapado» (p. ej., aun scFv anti-CD28 «grapado»). Los scFv «grapados» que muestran la estabilidad mejorada y/o la agregación reducida se describen adicionalmente con detalle en la presente memoria. en la figura 6 se proporcionan conectores grapados de ejemplo que son útiles para su inclusión en dichos scFv «grapados». En modalidades de ejemplo, el enlace grapado es GGGGSGGSGGCPPCGGSGG (SEQ ID NO: 56).

[0264] En algunas modalidades, el scFv del segundo monómero del anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc es un dominio de unión a CD28 y el VH1 del primer monómero y el VL de la primera cadena ligera, y el VH1 del segundo monómero y el VL1 de la segunda cadena ligera forman cada uno un dominio de unión que se une a CD20. Puede incluirse cualquier dominio de unión a CD28 adecuado en el anticuerpo con formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc del sujeto, lo que incluye los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria.

[0265] En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

- 10 (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2 y una vlCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2 y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de
- 20 aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que
- 25 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que
- 30 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una

- secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que
- 10 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que
- 15 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que
- 20 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una
- 25 secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- 30 (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que
5 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que
10 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

[0266] En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc tiene un dominio VH y VL
15 que se selecciona de los siguientes:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que
20 comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que
25 comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una
30 vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

[0267] En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes o una variante de estos:

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- 30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un
5 VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

[0268] En algunas modalidades, el VH1 del primer y segundo monómero y el VL1 de la cadena ligera común del anticuerpo con formato 2+1 Fab₂-scFv-Fc forman cada uno un dominio de unión que se une a CD20. En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un domino VH y VL que se selecciona de
10 los siguientes:

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de
15 aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que
20 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que
25 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que
30 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467.

[0269] En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470.

[0270] En algunas modalidades del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).
- [0271]**En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 comprende:
- 30 (a) un dominio de unión a CD28 que comprende:
 - (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una

vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y

(b) dos dominios de unión a CD20, cada uno de los cuales comprende:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462.

[0272] La figura 11 muestra algunas secuencias de dominio Fc de ejemplo que son útiles con el formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc. Las secuencias del «monómero 1» que se representan en la figura 11 comúnmente hacen referencia al dominio Fc de la «cadena pesada Fab-Fc» y las secuencias del «monómero 2» hacen referencia al dominio Fc de la «cadena pesada Fab-scFv-Fc». Además, las figuras 12 y 13 proporcionan domino de CH1-bisagra, dominios CH1, y dominios de bisagra de ejemplo que se pueden incluir en el primer o segundo monómero del formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc. Además, la figura 14 proporciona secuencias CL útiles que pueden utilizarse con este formato. Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 de ejemplo en el formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc se representan en la figura 34.

[0273] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 comprenden:

- a) un primer monómero seleccionado de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: a) un primer monómero que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 427;
- b) un segundo monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representa por las SEQ ID NO: 488 y 493;
- c) una primera cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429; y
- d) una segunda cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429.

3. Formato 1 + 1 CLC

[0274] Un formato de anticuerpo heterodimérico se utiliza particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria es el formato «1 + 1 Cadena ligera común» o «1 + 1 CLC», que se ilustra en la figura 29C. El anticuerpo con formato 1 + 1 CLC incluye un primer monómero que incluye un VH1-CH1-bisagra-CH2-

- CH3, donde VH1 es un primer dominio pesado variable y CH2-CH3 es un primer dominio Fc; un segundo monómero que incluye un VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3, donde VH2 es un segundo dominio pesado variable y CH2-C3 es un segundo dominio Fc; y un tercer monómero «cadena ligera común» que comprende VL-CL, donde VL es un dominio ligero variable común y CL es un dominio ligero constante. En dichas modalidades, los pares VL con el VH1 para formar un primer dominio de unión con una especificidad de unión al primer antígeno; y los pares VL con el VH2 para formar un segundo dominio de unión con una especificidad de unión al segundo antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 1 + 1 CLC es un anticuerpo bivalente.
- 10 **[0275]** En algunas modalidades, el primer y el segundo dominio Fc del formato 1 + 1 CLC son dominios Fc variantes que incluyen variantes sesgadas de heterodimerización (p. ej., un conjunto de las sustituciones de aminoácidos como se muestra en las figuras 3 y 9). Las variantes sesgadas de heterodimerización particularmente útil incluyen S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368E/K370S : S364K; T411T/E360E/Q362E :
 15 D401K; L368D/K370S : S364K/E357L; K370S : S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V : T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C (numeración de la UE). En modalidades de ejemplo, uno de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el otro de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización
 20 S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.
- 25 **[0276]** En algunas modalidades, los dominios Fc variantes incluyen variantes de ablación (incluidas las que se muestran en la figura 5). En algunas modalidades, cada uno de los primeros y segundos dominios Fc variantes incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.
- 30 **[0277]** En algunas modalidades, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer o el segundo monómero incluyen variantes pl (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 4). En modalidades de ejemplo, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer o el segundo monómero incluyen variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0278]En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 1 + 1 CLC que se proporciona en la presente memoria incluye variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0279]En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q; cada uno del primero y segundo dominio Fc variante incluyen variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K; y el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0280]En algunas modalidades, la bisagra CH1-CH2-CH3 del primer monómero comprende las variantes de aminoácidos L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, y el segundo dominio Fc comprende las variantes de aminoácidos S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0281]En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 1 + 1 CLC que se proporciona en la presente memoria incluye además variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0282]En algunas modalidades, uno del primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se une a CD20 y el otro dominio de unión se une a CD28. Cualquier dominio de unión a CD20 y dominio CD28 adecuados se pueden incluir en el anticuerpo con formato 1 + 1 CLC del sujeto, incluidos cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse, por ejemplo, las figuras 15-24, 26 y 30).

4. Formato 2 + 1 CLC

[0283]Otro formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria es el formato «2 + 1 Cadena ligera común» o «2 + 1 CLC», que se representa en la figura 29D. El formato 2 + 1 CLC incluye un primer monómero que incluye un VH1-CH1-conector-VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, donde los VH1 son cada uno un primer dominio pesado variable y CH2-CH3 es un primer dominio Fc; un segundo monómero que incluye un VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3, donde VH2 es un segundo dominio pesado variable y CH2-CH3 es un

segundo dominio Fc; y un tercer monómero que incluye un VL-CL de «cadena ligera común», donde VL es un dominio ligero variable común y CL es un dominio ligero constante. Los pares VL donde cada uno de los VH1 del primer monómero forman dos primeros dominios de unión, cada uno con una primera especificidad de unión al primer antígeno; y los VL con los VH2 forman un segundo dominio de unión con una especificidad de unión al segundo antígeno. El conector del primer monómero puede ser cualquier conector adecuado, incluido cualquiera de los conectores de dominio o combinaciones estos descritos en la figura 7. En algunas modalidades, el conector es EPKSCGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 87). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 CLC es un anticuerpo trivalente.

[0284]En algunas modalidades, el primer y el segundo dominio Fc del formato 2 + 1 CLC son dominios Fc variantes que incluyen variantes sesgadas de heterodimerización (p. ej., un conjunto de las sustituciones de aminoácidos como se muestra en las figuras 3 y 9). Las variantes sesgadas de heterodimerización particularmente útiles incluyen S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C (numeración de la UE)). En modalidades de ejemplo, uno de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el otro de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0285]En algunas modalidades, los dominios Fc variantes incluyen variantes de ablación (incluidas las que se muestran en la figura 5). En algunas modalidades, cada uno de los primeros y segundos dominios Fc variantes incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0286]En algunas modalidades, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer o el segundo monómero incluyen variantes pl (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 4). En modalidades de ejemplo, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer o el segundo monómero incluyen variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D,

donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0287] En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 CLC que se proporciona en la presente memoria incluye además variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

5 **[0288]** En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q; cada uno del primero y segundo dominio Fc variante incluyen variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K; y
10 N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 CLC que se proporciona en la presente memoria incluye además variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0289] En algunas modalidades, el CH1-bisagra-CH2-CH3 del segundo monómero
15 comprende variantes de aminoácidos L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, y el primer dominio Fc comprende variantes de aminoácidos S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

20 **[0290]** En algunas modalidades, cada uno de los dos primeros dominios de unión se une a CD20 y el segundo dominio de unión se une a CD28. Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el anticuerpo con formato 2 + 1 CLC del sujeto, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las
25 figuras 15-24, 26, y 30).

5. Formato 2+1 mAb-scFv

[0291] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión es el formato 2 + 1 mAb-scFv
30 que se muestra en la figura 29E. Este formato de anticuerpo incluye tres dominios de unión a antígeno: dos porciones Fab y un scFv que está unido al extremo C de una de las cadenas pesadas. En algunas modalidades de este formato, las porciones Fab se unen cada una a CD20, en este caso, CD20 humano, y el dominio scFv «extra» scFv se une a CD28. Es decir, este formato mAb-scFv es un anticuerpo trivalente.

- [0292]** En estas modalidades, la primera cadena o monómero comprende, del extremo N al C, VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, el segundo monómero comprende, del extremo N al C, VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3-conector de dominio-dominio scFv, donde el dominio scFv comprende un segundo VH (VH2), un segundo VL (VL2) y un conector scFv. Al igual que para todos los dominios scFv en la presente memoria presentados, el dominio scFv puede estar en cualquier orientación, del extremo N al C, conector VH2-scFv-VL2 o conector VL2-scFv-VH2. Por consiguiente, el segundo monómero puede comprender, desde el extremo N al C, VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3-conector de dominio-VH2-conector scFv-VL2 o VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3-conector de dominio-VL2-conector scFv-VH2. La composición también comprende una primera y una segunda cadena ligera que son cada una, VL1-CL. En estas modalidades, el VH1 del primer monómero y el VL1 de la primera cadena ligera, y el VH1 del segundo monómero y el VL1 de la segunda cadena ligera forman cada uno un primer ABD, y el VH2-VL2 forman un segundo ABD. En algunas modalidades, los primeros ABD se unen a CD20 y el segundo ABD se une al CD28 humano.
- [0293]** En algunas modalidades, el primer y el segundo dominio Fc del anticuerpo con formato 2+1 mAb-scFv son dominios Fc variantes que incluyen variantes sesgadas de heterodimerización (p. ej., un conjunto de las sustituciones de aminoácidos como se muestra en las figuras 3 y 9). Las variantes sesgadas de heterodimerización particularmente útiles incluyen S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C (numeración de la UE)). En modalidades de ejemplo, uno de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el otro de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.
- [0294]** En algunas modalidades, los dominios Fc variantes incluyen variantes de ablación (incluidas las que se muestran en la figura 5). En algunas modalidades, cada uno de los primeros y segundos dominios Fc variantes incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0295] En algunas modalidades, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes pl (incluidas las que se muestran en la figura 4). En modalidades de ejemplo, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes de pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0296] En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv que se proporciona en la presente memoria incluye a conector scFv cargado (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 6). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv que se proporciona en la presente memoria incluye variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0297] En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q; cada uno del primero y segundo dominio Fc variante incluyen variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K; y el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer monómero incluye variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv que se proporciona en la presente memoria incluye un conector scFv cargado (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv que se proporciona en la presente memoria incluye variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0298] En algunas modalidades, el scFv del segundo monómero del anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv es un dominio de unión a CD28, y el VH1 del primer monómero y el VL1 de la primera cadena ligera, y el VL1 del segundo monómero y el VL1 de la segunda cadena ligera forman cada uno dominios de unión a CD20. Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

[0299] Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD28 en el anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc en cuestión, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria. En algunas modalidades del formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2 y una vlCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2 y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de

de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

5 **[0300]** En algunas modalidades del formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que
10 comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y
15 una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una
20 vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y
25 una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
30

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una

una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

- 5 (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

[0301] En algunas modalidades del formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes o una variante de estos:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- 5 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- 15 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- 25 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

[0302] En algunas modalidades, el VH1 del primer y segundo monómero y el VL1 de la cadena ligera común del anticuerpo con formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc forman cada uno un dominio de unión que se une a CD20. En algunas modalidades del formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un domino VH y VL que se selecciona de los

siguientes:

- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467.

[0303]En algunas modalidades del formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un domino VH y VL que se selecciona de los siguientes:

- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ

- ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;
- 5 (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o
- 10 (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470.
- [0304]** En algunas modalidades del formato 2 + 1 mAb-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes o una variante de estos:
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- 30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).
- 20 **[0305]** En algunas modalidades, el anticuerpo con formato anti-CD20 x anti-CD28 mAb-scFv comprende:
- (a) un dominio de unión a CD28 que comprende:
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una
- 25 vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
- (b) dos dominios de unión a CD20, cada uno de los cuales comprende:
- 30 (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una

vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462.

[0306] Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 de ejemplo en el formato 2 + 1 mAb-scFv se representan en la figura 36.

[0307] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 comprenden:

- 5 a) un primer monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 405, 422, 427, 436, y 516;
- b) un segundo monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 14, 416, 494, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514 y 515;
- 10 c) una primera cadena ligera que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 334, 366, 426, y 429; y
- d) una segunda cadena ligera que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 334, 366, 426, y 429.

15 6. 2+1 stackFab₂-scFv-Fc

[0308] Un formato de anticuerpo heterodimérico se utilizó particularmente en los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión son los anticuerpos con formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc (figura 29F). Este formato de anticuerpo incluye tres dominios de unión a antígeno: dos porciones Fab y un dominio de unión scFv. Cada una de las porciones Fab incluye una primera y una segunda cadena ligera variable común. Este formato de anticuerpo heterodimérico se utiliza particularmente en los anticuerpos trispecíficos en cuestión de la presente memoria.

[0309] El formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc incluye un primer monómero, un segundo monómero, una primera cadena ligera común y una segunda cadena ligera común. El primer monómero incluye desde el extremo N al de extremo C, el scFv-conector-CH2-CH3, donde CH2-CH3 es un primer dominio Fc. El segundo monómero incluye desde el extremo N al de extremo C, VH1-CH1-conector-VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3 donde los VH1 son cada uno un primer dominio pesado variable y CH2-CH3 es un segundo dominio Fc. Cada una de las primeras y segundas cadenas ligeras comunes incluyen desde el extremo N al extremo C, VL1-CL, donde VL1 es un primer dominio ligero variable y CL es un dominio ligero constante. Además, el scFv comprende un segundo dominio VH (VH2), un conector scFv y un segundo dominio ligero variable (VL2). En este formato, uno del VH1 del segundo monómero y el VL1 de la primera cadena ligera común, y el otro del VH1 del segundo monómero y el VL1 de la segunda cadena ligera común forman cada uno un primer dominio

de unión a antígeno, y el segundo dominio pesado variable y el segundo dominio ligero variable forman un segundo dominio de unión a antígeno. En algunas modalidades, los primeros dominios de unión a antígenos se unen a CD20, y el segundo dominio de unión a antígenos se une a CD28.

5 **[0310]**En modalidades de ejemplo, el primer y segundo dominio Fc son dominios Fc variantes. En algunas modalidades, el primer y el segundo dominio Fc del anticuerpo con formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc son dominios Fc variantes que incluyen variantes sesgadas de heterodimerización (p. ej., un conjunto de las sustituciones de aminoácidos como se muestra en las figuras 3 y 9). Las variantes sesgadas de heterodimerización particularmente
 10 útiles incluyen S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L; K370S: S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C (numeración de la UE)). En modalidades de ejemplo, uno de los primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el otro de los
 15 primeros o segundos dominios Fc variantes incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S y el segundo dominio Fc variante incluye las variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q, donde la numeración
 20 está de acuerdo con la numeración de la UE. En modalidades de ejemplo, el primer dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización S364K/E357Q y el segundo dominio Fc variante incluye variantes sesgadas de heterodimerización L368D/K370S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0311]En algunas modalidades, los dominios Fc variantes incluyen variantes de ablación
 25 (incluidas las que se muestran en la figura 5). En algunas modalidades, cada uno de los primeros y segundos dominios Fc variantes incluye las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0312]En algunas modalidades, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del primer
 30 monómero incluye variantes pl (incluidas las que se muestran en la figura 4). En modalidades de ejemplo, el dominio constante (CH1-bisagra-CH2-CH3) del segundo monómero incluye variantes pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0313]En modalidades de ejemplo, el CH1-bisagra-CH2-CH3 del primer monómero

comprende variantes de aminoácidos S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, el segundo dominio Fc comprende variantes de aminoácidos

L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K

5 , donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0314] En algunas modalidades, el scFv del anticuerpo con formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye a conector scFv cargado (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 6). En algunas modalidades, el anticuerpo con formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc que se proporciona en la presente memoria incluye
10 variantes FcRn M428L/N434S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

[0315] En algunas modalidades, el scFv del primer monómero del anticuerpo con formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc es un dominio de unión a CD28 y uno del VH1 del segundo monómero y el VL de la primera cadena ligera común, y el otro VH1 del segundo monómero
15 y el VL1 de la segunda cadena ligera común forman cada uno un dominio de unión que se une a CD20. Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 adecuado en el 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véase, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

[0316] Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD28 en el anticuerpo 2+1 stackFab₂-scFv-Fc en cuestión, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD28 que se proporciona en la presente memoria. En algunas modalidades del formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:
20 (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2 y una vlCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2 y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

30 (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que

5 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que

10 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que

15 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que

20 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que

25 comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que

30

comprende una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que comprende una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que comprende una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que comprende una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que comprende una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vICDR1, una vICDR2, y una vICDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

[0317] En algunas modalidades del formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que

comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

[0318] En algunas modalidades del formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, el ABD anti-CD28 tiene

un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes o una variante de estos:

- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; o
- i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331; o
- 30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y (ii) un VL que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y (ii) un VL que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395; o
- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.
- 20 **[0319]**En algunas modalidades, el VH1 del primer y segundo monómero y el VL1 de la cadena ligera común del anticuerpo con formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc forman cada uno de un dominio de unión que se une a CD20. En algunas modalidades del formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un domino VH y VL que se selecciona de los siguientes:
- 25 (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3, respectivamente, de un VL que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1, una vlCDR2, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de

aminoácidos de una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vhCDR1, una vhCDR2, y una vhCDR3, respectivamente, de un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de una vLCDR1, una vLCDR2, y una vLCDR3, respectivamente, de un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467.

[0320] En algunas modalidades del formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un dominio VH y VL que se selecciona de los siguientes:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446; o

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

- (i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470.

[0321] En algunas modalidades del formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc, los ABD anti-CD20 incluyen cada uno un domino VH y VL que se selecciona de los siguientes o una variante de estos:

- 10 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y (ii) un VL que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- 20 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y (ii) un VL que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482; o
- 30 (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; o
- (i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y (ii) un VL que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o

(i) un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y (ii) un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498 (figura 30).

10 **[0322]** En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 comprende:

(a) un dominio de unión a CD28 que comprende:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y

(b) dos dominios de unión a CD20, cada uno de los cuales comprende:

(i) un VH que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (ii) un VL que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462.

25 **[0323]** Los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 en el formato 2+1 stackFab₂-scFv-Fc se representan en la figura 35.

[0324] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 comprenden:

un primer monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de la SEQ ID NO: 499;

30 un segundo monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 428, 432, 434, 438, 448;

una primera cadena ligera que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de la SEQ ID NO: 429; y

una segunda cadena ligera que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se

7. Formatos scFv duales

[0325] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión es el formato scFv dual, como se sabe en la técnica y que se muestra en la figura 29G. En esta modalidad, el anticuerpo biespecífico heterodimérico está formado por dos monómeros scFv-Fc (ambos en formato (conector vh-scFv-vl-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3) o (conector vl-scFv-vh-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3), o con un monómero en una orientación y el otro en la otra orientación.

[0326] En este caso, todos los ABD están en formato scFv. Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en el formato scFv dual, lo que incluye los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporciona en la presente memoria.

[0327] Además, los dominios Fc del formato scFv dual comprenden variantes sesgadas (por ejemplo, un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en la figura 4, con variantes sesgadas particularmente útiles que se seleccionan del grupo que consiste en S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), opcionalmente variantes de ablación (incluidas las que se muestran en la figura 5), opcionalmente conectores scFv cargados (incluidos los que se muestran en la figura 6) y la cadena pesada comprende variantes pl (incluidas las que se muestran en la figura 4).

[0328] En algunas modalidades, el formato scFv dual incluye variantes sesgadas, variantes pl y variantes de ablación. Por consiguiente, algunas modalidades incluyen formatos que comprenden: a) un primer monómero que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y un scFv que se une a un primer antígeno (VH1-scFv conector-VL1-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3 o VL1-scFv conector-VH1-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3) y b) un primer monómero comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, y un scFv que se une a un segundo antígeno (VH1-scFv conector-VL1-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3 o VL1-scFv conector-VH1-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3). Las variantes pl pueden ser como se describe en la presente memoria, pero las más comunes serán conectores scFv

cargados de carga opuesta para cada monómero. Se pueden incluir opcionalmente variantes de FcRn, particularmente 428L/434S.

[0329] Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el anticuerpo con formato scFv dual, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporciona en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

8. Formato scFv-mAb de un solo brazo

[0330] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria es el formato mAb-scFv de un brazo que se muestra en la figura 29H. Este formato incluye: 1) un primer monómero que comprende un dominio Fc «vacío»; 2) un segundo monómero que incluye un primer dominio pesado (VH) variable, un dominio scFv (un segundo dominio de unión a antígeno) y un dominio Fc, donde el dominio scFv está unido al extremo N del primer dominio pesado variable; y 3) una cadena ligera que incluye un primer dominio ligero variable y un dominio ligero constante. El primer dominio pesado variable y el primer dominio ligero variable forman un primer dominio de unión a antígenos y el scFv es un segundo dominio de unión a antígeno. En este formato, uno del primer dominio de unión a antígenos y el segundo dominio de unión se une a CD28, y el otro dominio de unión a antígenos se une a CD20. Como para muchas de las modalidades de la presente memoria, estas construcciones incluyen variantes sesgadas, variantes pl, variantes de ablación, variantes Fc adicionales, etc., como se desea y describe en la presente memoria.

[0331] Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el formato con anticuerpo scFv-mAb de un solo brazo, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y los dominios de unión a CD28 que se proporciona en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

9. Formato scFv-mAb

[0332] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión que se proporcionan en la presente memoria es el formato mAb-scFv que se muestra en la figura 29I. En esta modalidad, el formato se basa en el uso de una unión de extremo N de un scFv a uno de los monómeros, formando así un tercer dominio de unión a antígeno, donde las porciones Fab de los dos monómeros se unen cada una a un objetivo y el dominio scFv «extra» se une a un objetivo

diferente.

- [0333]** En esta modalidad, el primer monómero comprende una primera cadena pesada (que comprende un dominio pesado variable y un dominio constante), con un scFv unido covalentemente en el extremo de extremo N que comprende un dominio ligero variable scFv, un conector scFv y un dominio pesado variable scFv en cualquier orientación ((conector vh1-scFv-vl1-[conector de dominio opcional]-vh2-CH1-bisagra-CH2-CH3) o (con el scFv en la orientación opuesta) ((conector vl1-scFv-vh1-[conector de dominio opcional]-vh2-CH1-bisagra-CH2-CH3)). El segundo monómero comprende una cadena pesada VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3. Esta modalidad utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos. Como para muchas de las modalidades de la presente memoria, estas construcciones incluyen variantes sesgadas, variantes pl, variantes de ablación, variantes Fc adicionales, etc., como se desea y describe en la presente memoria.
- [0334]** Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el formato de anticuerpo scFv-mAb, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y los dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

10. Anticuerpos biespecíficos no heterodiméricos

- [0335]** Como observarán los expertos en la técnica, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria también pueden incluirse en formatos biespecíficos no heterodiméricos (véase la figura 29J). En este formato, el anti-CD20 x anti-CD28 incluye: 1) un primer monómero que comprende un VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3; 2) un segundo monómero que comprende un VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3; 3) una primera cadena ligera que comprende un VL1-CL; y 4) una segunda cadena ligera que comprende un VL2-CL. En dichas modalidades, VH1 y VL1 forman un primer dominio de unión a antígenos y VH2 y VL2 forman un segundo dominio de unión a antígeno. Uno de los primeros o segundos dominios de unión a antígenos se une a CD28 y el otro dominio de unión a antígenos se une a CD20.
- [0336]** Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 en el formato de anticuerpo biespecífico no heterodimérico, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse,

p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

11. Un scFv central con un solo brazo

[0337] Un formato de anticuerpo heterodimérico se utilizan particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión que se proporciona en la presente memoria es el formato de scFV central de un solo brazo que se muestra en la figura 29K. En esta modalidad, un monómero comprende solo un dominio Fc, mientras que el otro monómero incluye un dominio Fab (un primer dominio de unión a antígeno), un dominio scFv (un segundo dominio de unión a antígeno) y un dominio Fc, donde el dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y el dominio Fc.

[0338] En esta modalidad, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, con un scFv que comprende un dominio ligero variable scFv, un conector scFv y un dominio pesado variable scFv. El scFv se une covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc mediante el uso de conectores de dominio, en cualquier orientación, VH1-CH1-[conector de dominio opcional]-VH2-conector scFv-VL2-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3 o VH1-CH1-[conector de dominio opcional]-VL2-conector scFv-VH2-[conector de dominio opcional]-CH2-CH3. El segundo monómero comprende un dominio Fc (CH2-CH3). Esta modalidad utiliza además una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con la cadena pesada para formar un Fab. Como para muchas de las modalidades de la presente memoria, estas construcciones incluyen variantes sesgadas, variantes pl, variantes de ablación, variantes Fc adicionales, etc., como se desea y describe en la presente memoria.

[0339] Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el formato scFV central de un solo brazo, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporciona en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

12. Formato mAb-Fv

[0340] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión que se proporciona en la presente memoria es el formato mAb-Fv (figura 29L). En esta modalidad, el formato se basa en el uso de una unión de extremo C de un dominio pesado variable «extra» a un monómero y la unión de

extremo C de un dominio ligero variable «extra» al otro monómero, formando así un tercer dominio de unión a antígenos (es decir, un dominio Fv «extra»), donde las porciones Fab de los dos monómeros se unen a CD28 y el dominio Fv «extra» se une a CD20.

[0341] En esta modalidad, el primer monómero comprende una primera cadena pesada, que comprende un primer dominio pesado variable y un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio Fc, con un primer dominio ligero variable unido covalentemente al extremo C del primer dominio Fc mediante el uso de un conector de dominio (vh1-CH1-bisagra-CH2-CH3-[conector opcional]-vl2). El segundo monómero comprende un segundo dominio pesado variable, un segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio Fc y un tercer dominio pesado variable unido covalentemente al extremo C del segundo dominio Fc mediante el uso de un conector de dominio (vh1-CH1-bisagra-CH2-CH3-[conector opcional]-vh2. Esta modalidad utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que incluyen dos Fv idénticos. Los dos dominios variables unidos al extremo C constituyen el tercer Fv «extra». Como para muchas de las modalidades de la presente memoria, estas construcciones incluyen variantes sesgadas, variantes pl, variantes de ablación, variantes Fc adicionales, etc., como se desea y describe en la presente memoria.

[0342] Además, los dominios Fc del formato mAb-Fv comprende variantes sesgadas (p. ej., un conjunto de las sustituciones de aminoácidos como se muestra en la figura 3, es decir que las variantes sesgadas particularmente útiles se seleccionan del grupo que consiste en S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368E/K370S : S364K; T411T/E360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L, K370S : S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V : T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C), opcionalmente variantes de ablación (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 5), opcionalmente conectores scFv cargados (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 6) y la cadena pesada comprende variantes pl (lo que incluye aquellos que se muestran en la figura 4).

[0343] Se pueden incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el formato mAb-Fv, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

13. Formato Fv central

[0344] Un formato de anticuerpo heterodimérico que se utiliza particularmente en los

anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 en cuestión que se proporcionan en la presente memoria es el formato Fv central que se muestra en la figura 29M. En esta modalidad, el formato se basa en el uso de un dominio Fv insertado, formando así un tercer dominio de unión a antígenos «extra», donde las porciones Fab de los dos monómeros se unen a CD20 y el dominio Fv central «extra» se une a CD28. El dominio Fv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de los monómeros, proporcionando así un tercer dominio de unión a antígenos, donde cada monómero contiene un componente del Fv (por ejemplo, un monómero comprende un dominio pesado variable y el otro un dominio ligero variable del dominio Fv central «extra»).

10 **[0345]**En esta modalidad, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1, un dominio Fc y un dominio ligero variable adicional. El dominio ligero variable adicional está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc mediante el uso de conectores de dominio (vh1-CH1-
15 [conector opcional]-vl2-bisagra-CH2-CH3). El otro monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc y un dominio pesado variable adicional (vh1-CH1-[conector opcional]-vh2-bisagra-CH2-CH3). El dominio pesado variable adicional se une de forma covalente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer
20 dominio Fc mediante el uso de conectores del dominio. Esta modalidad utiliza una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesada para formar dos Fab idénticos que se unen a CD20. El dominio pesado variable adicional y el dominio ligero variable adicional forman un Fv central «extra» que se une a CD28. Como para muchas de las modalidades de la presente
25 memoria, estas construcciones incluyen variantes sesgadas, variantes pl, variantes de ablación, variantes Fc adicionales, etc., como se desea y describe en la presente memoria.

[0346]Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 en el formato Fv central, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos
30 (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

14. Formato tridente

[0347]En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria están en el formato «tridente» como se describe en

general en WO2015/184203, que se incorpora expresamente por la presente a modo de referencia en su totalidad y en particular para las figuras, leyendas, definiciones y secuencias de «dominios oromotores de heterodímeros» o «HPD», incluidas las secuencias de «bobina K» y «bovina E». Los tridentes se basan en el uso de dos HPD diferentes que se asocian para formar una estructura heterodimérica como componente de la estructura, véase la figura 29N. En esta modalidad, el formato tridente incluye una cadena pesada y ligera «tradicional» (por ejemplo, VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3 y VL1-CL), una tercera cadena que comprende un primer «dominio de unión de tipo diacuerpo» o «DART®», VH2-(conector)-VL3-HPD1 y una cuarta cadena que comprende un segundo DART®, VH3-(conector)-(conector)-VL2-HPD2. El VH1 y VL1 forman un primer ABD, el VH2 y VL2 forman un segundo ABD, y el VH3 y VL3 forman un tercer ABD. En algunos casos, como se muestra en la figura 29N, el segundo y tercer ABD se unen al mismo antígeno.

[0348] Se puede incluir cualquier dominio de unión a CD20 y dominio de unión a CD28 adecuado en el formato tridente, lo que incluye cualquiera de los dominios de unión a CD20 y dominios de unión a CD28 que se proporcionan en la presente memoria o una variante de estos (véanse, p. ej., las figuras 15-24, 26, y 30).

V. Ácidos nucleicos

[0349] En otra modalidad, se proporcionan en la presente memoria composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria. Una composición de ácido nucleico puede referirse a uno o múltiples polinucleótidos.

[0350] Como lo observarán los expertos en la técnica, las composiciones de ácidos nucleicos dependerán del formato y el andamiaje de la proteína heterodimérica. Así, por ejemplo, cuando el formato requiere tres secuencias de aminoácidos, como para los formatos 1+1 Fab-scFv-Fc o 2+1 Fab₂-scFv-Fc, se pueden incorporar tres polinucleótidos en uno o más vectores de expresión para su expresión. En modalidades de ejemplo, cada polinucleótido se incorpora en un vector de expresión diferente.

[0351] Como se sabe en la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los componentes de los dominios de unión y los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden incorporar en vectores de expresión como se sabe en la técnica, y dependiendo de las células hospedadoras utilizadas para producir los anticuerpos heterodiméricos de la invención. Generalmente, los ácidos nucleicos están unidos operativamente a cualquier

número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores seleccionables, sitios de unión ribosómica, inductores, etc.). Los vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos o integradores.

[0352] Los polinucleótidos y/o vectores de expresión de la invención se transforman luego en cualquier número de diferentes tipos de células hospedadoras como es bien conocido en la técnica, lo que incluye células de mamíferos, bacterias, levaduras, insectos y/o hongos, encontrando las células de mamíferos (por ejemplo, células CHO) uso en muchas modalidades.

[0353] En algunas modalidades, los polinucleótidos que codifican cada monómero están contenidos cada uno dentro de un único vector de expresión, generalmente bajo controles promotores diferentes o iguales. En modalidades de uso particular en la presente invención, cada uno de estos polinucleótidos está contenido en diferentes vectores de expresión. Como se muestra en la presente memoria y en el documento US 62/025,931, que se incorpora por la presente a modo de referencia, se pueden utilizar diferentes proporciones de vectores para impulsar la formación de heterodímeros. Es decir, sorprendentemente, si bien las proteínas comprenden primer monómero: segundo monómero: cadenas ligeras (en el caso de muchas de las modalidades en la presente memoria descritas que tienen tres polipéptidos que comprenden el anticuerpo heterodimérico) en una proporción 1:1:2, estas no son las proporciones que dan los mejores resultados.

[0354] Los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria se elaboran cultivando células hospedadoras que comprenden el/los vectores de expresión como se conoce bien en la técnica. Una vez producidos, se realizan pasos de purificación de anticuerpos tradicionales, incluido un paso de cromatografía de intercambio iónico. Como se trata en la presente memoria, tener los pI de los dos monómeros que difieren en al menos 0,5 puede permitir la separación mediante cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico. Es decir, la inclusión de sustituciones pI que alteran el punto isoeléctrico (pI) de cada monómero de manera que cada monómero tenga un pI diferente y el heterodímero también tenga un pI distinto, facilitando así la purificación isoeléctrica del heterodímero «1+1 Fab-scFv-Fc» (por ejemplo, columnas de intercambio aniónico, columnas de intercambio catiónico). Estas sustituciones también ayudan en la determinación y el control de cualquier homodímero de scFv-Fc y mAb dual contaminante después de la purificación (por ejemplo, geles IEF, cIEF y columnas IEX analíticas).

VI. Funcionalidad biológica y bioquímica de los anticuerpos anti-CD28 x anti-CD20

[0355] Generalmente, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 descritos en la presente memoria se administran a pacientes con un cáncer asociado a CD20 (por ejemplo, malignidad de linfocitos B), y se evalúa la eficacia de varias maneras como se describe en la presente memoria. De este modo, si bien se pueden realizar ensayos estándar de eficacia, como carga cancerosa, tamaño del tumor, evaluación de la presencia o extensión de metástasis, etc., los tratamientos inmunooncológicos también se pueden evaluar basándose en evaluaciones del estado inmunológico. Esto se puede llevar a cabo de diversas manera, lo que incluye ensayos *in vitro* e *in vivo*.

A. Composiciones de anticuerpos para administración *in vivo*

[0356] Las formulaciones de los anticuerpos descritos en la presente memoria se preparan para su almacenamiento al mezclar un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores aceptables desde un punto de vista farmacéutico opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ej., complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no-iónicos tales como TWEEN[™], PLURONICS[™] o polietilenglicol (PEG).

VII. Tratamientos

[0357] Una vez preparadas, las composiciones de la invención encuentran uso en varias aplicaciones oncológicas, al tratar el cáncer, generalmente al mejorar las respuestas inmunes (por ejemplo, activación y proliferación de linfocitos T), particularmente cuando se usan con terapias contra el cáncer tales como anticuerpos biespecíficos. En algunas modalidades, los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria mejoran las respuestas inmunes (por ejemplo, la activación y proliferación de linfocitos T) al proporcionar coestimulación agonista de los linfocitos T en el microambiente de las células que sobreexpresan CD20.

[0358] En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria se administran con una terapia antitumoral que incluye, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos anti-antígeno asociado a tumores (TAA).

A. Combiterapias de anti-CD20 x anti-CD28

[0359] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria se administran con un anticuerpo multiespecífico que se une a los linfocitos T, como los que se unen a CD3, CD20 y CD79b humanos. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico que interactúa con los linfocitos T es la molécula CD79b x CD20 X CD3 que se muestra en la FIG. 32. Otros anticuerpos trispecíficos anti-CD79b x anti-CD20 X anti-CD3 se describen en el documento WO2022/200443 que se incorpora en la presente memoria a modo de referencia.

[0360] En algunas modalidades, un método para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de este un ligador de linfocitos T, donde:

(A) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de este comprende:

(a) un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446;

(ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3

que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

5 (iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

10 (iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470; y

(b) un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28 que comprende:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

20 (ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

30 (iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

22;

(iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una
5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

(v) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que
10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(vi) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una
15 vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y

(B) el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o un
20 fragmento de anticuerpo de este.

[0361]En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria se administran en combinación con el anticuerpo
25 CD79b X CD20 X CD3 que comprende: (A) un dominio de unión a CD79b que comprende CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 524, 525 y 526; y CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 528, 529 y 530; (B) un dominio de unión a CD20 que comprende CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 540, 541 y 542; y CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 544, 545 y 546; y (C) un dominio de unión a CD3 que comprende CDR de cadena
30 pesada de la SEQ ID NO: 532, 533 y 534; y CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 536, 537 y 538.

[0362]En algunas modalidades, un método para tratar neoplasias malignas de linfocitos B en un paciente que lo necesita, comprende administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de estos y un ligador de

linfocitos T, donde:

- A) anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 comprende: i) un primer dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH1 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (b) un VL1 que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y ii) un segundo dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH2 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) un VL2 que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
- B) el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo de este y comprende: (a) un dominio de unión a antígenos que se une a CD79b que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 524, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 525, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 526; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 528, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 529, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 530; (b) un dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 540, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 541, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 542; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 544, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 545, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 546; y (c) un dominio de unión a antígenos que se une a CD3 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 532, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 533, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 534; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 536, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 537, y una vlCDR3 que tiene

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 538.

[0363]En algunas modalidades, un método para mejorar la proliferación de linfocitos T comprende poner en contacto las células con:

- 5 A) anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 que comprende: i) un primer dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH1 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (b) un VL1 que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y ii) e: (a) un VH2 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) un VL2 que comprende una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
- 15 B) un ligador de linfocitos T, donde el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende: (a) un dominio de unión a antígenos que se une a CD79b que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 524, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 525 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 526; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 528, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 529 y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 530; (b) un dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 540, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 541 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 542; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 544, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 545 y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 546; y (c) un dominio de unión a antígenos que se une a CD3 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 532, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 533 y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 534;
- 20
- 25
- 30

y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 536, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 537 y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 538.

[0364]En algunas modalidades, un método para aumentar los linfocitos T de memoria central en un paciente que padece una neoplasia maligna de linfocitos B comprende administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de este, y un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo, donde:

- A) anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 comprende: i) un primer dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH1 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y (b) un VL1 que comprende una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y ii) un segundo dominio de unión a antígenos que tiene: (a) un VH2 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (b) un VL2 que comprende una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
- B) anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende: (a) un dominio de unión a antígenos que se une a CD79b que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 524, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 525, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 526; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 528, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 529, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 530; (b) un dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 540, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 541, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 542; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 544, una vICDR2 que tiene una secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 545, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 546; y (c) un dominio de unión a antígenos que se une a CD3 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 532, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 533, y una
 5 vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 534; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 536, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 537, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 538.

[0365] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se
 10 proporcionan en la presente memoria se administran en combinación con el anticuerpo CD79b X CD20 X CD3 que comprende: (A) un dominio de unión a CD79b que comprende un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 523 y un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 527; (B) un dominio de unión a CD20 que comprende un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 539 y un VL
 15 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 543; y (C) un dominio de unión a CD3 que comprende un VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 531 y un VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 535.

[0366] En algunas modalidades, un método para tratar neoplasias malignas de linfocitos B en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una combinación de
 20 un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de estos y un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo, donde:

- (a) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:
 - (i) el dominio de unión a antígenos CD20 que comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos
 25 de la SEQ ID NO: 459; y
 - (ii) el dominio de unión a antígenos CD28 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; y
- (b) el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo
 30 comprende:
 - (i) el dominio de unión a antígenos CD79b que comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 523; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 527;
 - (ii) el dominio de unión a antígenos CD20 que comprende un VH2 que tiene una secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 539; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 543; y

(iii) el dominio de unión a antígenos CD3 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 531; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 535.

[0367] En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria se administran en combinación con el anticuerpo CD79b X CD20 X CD3 que comprende: (i) un primer monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 520; (ii) un segundo monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 521; y (iii) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 522.

[0368] En algunas modalidades, un método para tratar neoplasias malignas de linfocitos B en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de estos y un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo, donde:

(a) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) un primer polipéptido monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461;

(ii) un segundo polipéptido de monómero de que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 469;

(iii) un primer polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429; y

(b) el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) un cuarto polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 520;

(ii) un quinto polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 521; y

(iii) un segundo polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 522.

[0369] En la interacción de linfocitos T/APC clásica, hay una primera señal que se proporciona a través de la reactividad de TCR con péptido-MHC (señal 1) y una segunda señal que se proporciona a través de la reticulación de CD28 mediante CD80/CD86 que se expresa en APC (señal 2) que juntos activan completamente los linfocitos T (véase la figura

31A). Por el contrario, solo se proporciona la primera señal en el tratamiento con anticuerpos que interactúan con los linfocitos T CD3 y que se dirigen a un antígeno asociado al tumor (TAA) (es decir, anticuerpos trispecíficos anti-CD3 x anti-CD20 x anti-CD79b) (véase la figura 31B).

5 **[0370]** Sin limitarnos a ninguna teoría de funcionamiento en particular, se cree que los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 que se proporcionan en la presente memoria pueden mejorar la respuesta antitumoral de un anticuerpo trispecífico anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 al mejorar la activación, potencia y persistencia de los linfocitos T, así como al superar la inmunosupresión dentro del microambiente tumoral (véase el
10 Ejemplo 4). Por lo tanto, en una modalidad, se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar neoplasias malignas de células cancerosas en un paciente mediante la administración al paciente de un anticuerpo biespecífico anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3, y un anti-CD20 x anti-CD28 que se proporciona en la presente memoria.

[0371] Por consiguiente, la combinación de un anticuerpo biespecífico anti-CD79b x anti-
15 CD20 x anti-CD3 y un anticuerpo biespecífico anti-CD20 x anti-CD28 es útil en el tratamiento o la prevención de una variedad de neoplasias malignas de linfocitos B, lo que incluye (pero no limitado a) las siguientes: linfoma de linfocitos B, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), un linfoma de células del manto (MCL), un linfoma folicular (FL), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC),
20 linfoma linfocítico pequeño (SLL), macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiple (MM), linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas o células de plasmacitoma. En algunas modalidades, la neoplasia maligna de linfocitos B descrita en la presente memoria es una forma recidivante o refractaria del cáncer.

25

B. Modalidades administrativas

[0372] Los anticuerpos que se proporcionan en la presente memoria se administran a un sujeto, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración subcutánea, intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En
30 algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x anti-CD28 y los anticuerpos anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 se administran de forma concurrente o secuencial.

C. Modalidades de tratamient

[0373] En los métodos de la invención, la terapia se utiliza para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección.

[0374] Por «respuesta terapéutica positiva» se entiende una mejora de la enfermedad o afección y/o una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un aumento en la muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de células neoplásicas; (5) inhibición (es decir, desaceleración hasta cierto punto, preferentemente detención) del crecimiento del tumor; (6) un aumento en la tasa de supervivencia del paciente; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.

[0375] Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección determinada pueden determinarse mediante criterios de respuesta estandarizados específicos para esa enfermedad o afección. La respuesta del tumor se puede evaluar para detectar cambios en la morfología del tumor (es decir, carga tumoral general, tamaño del tumor y similares) mediante el uso de técnicas de detección como la resonancia magnética (IRM), la radiografía, la tomografía computarizada (TC), la gammagrafía ósea, la endoscopia y la toma de muestras de biopsia tumoral, incluida la aspiración de médula ósea (BMA) y el recuento de células tumorales en la circulación.

[0376] Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejoría de los síntomas asociados a la enfermedad.

[0377] El tratamiento según la presente invención incluye una «cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico» de los medicamentos utilizados. Una «cantidad desde un punto de vista profiláctico» se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado profiláctico deseado.

[0378] Una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico es también aquella en la que los efectos beneficiosos terapéuticamente compensan los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o de la parte del anticuerpo.

[0379] Una «cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico» para la terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema

modelo animal que predice su eficacia en tumores humanos.

[0380] De manera alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o inducir la apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por el profesional experto. Una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de sus síntomas y la composición o vía de administración particular seleccionada.

[0381] Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma unitaria de dosificación tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente distintas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

[0382] Las especificaciones de las formas unitarias de dosificación de la presente invención están dictadas y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de preparación de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

[0383] Las dosis eficaces y las pautas posológicas para los anticuerpos biespecíficos utilizados en la presente invención dependen de la enfermedad o afección que se va a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la técnica. Un intervalo de ejemplo, no limitante para una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de anticuerpos biespecíficos anti-CD20 X anti-CD28 o anticuerpos biespecíficos anti-CD20X anti-CD3 que se describen en la presente memoria es de aproximadamente 0,001-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-5 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,001-2 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-1 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1 o aproximadamente 10 mg/kg. En algunas modalidades, cada uno de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 X anti-CD28 o los anticuerpos biespecíficos anti-CD20X anti-CD3 descritos en la presente memoria se

pueden administrar de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg por dosis.

[0384] Todas las referencias mencionadas en la presente se incorporan mediante esta referencia en sus totalidades.

5 **[0385]** Si bien se han descrito anteriormente modalidades particulares de la invención con fines ilustrativos, los expertos en la técnica observarán que se pueden realizar numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

10 **[0386]** A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar la presente invención a ninguna aplicación o teoría de funcionamiento particular. Para todas las posiciones de la región constante analizadas en la presente invención, la numeración está de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat (Kabat y cols., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Servicio de
15 Salud Pública de los Estados Unidos, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, que se incorpora en su totalidad a modo de referencia). Los expertos en la técnica de anticuerpos observarán que esta convención consiste en una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, lo que permite una referencia normalizada a posiciones conservadas en familias de inmunoglobulinas. Por consiguiente,
20 las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada, según lo definido por el índice de la UE, no corresponderán necesariamente a su secuencia secuencial.

[0387] Las técnicas científicas generales y específicas se describen en las publicaciones estadounidenses 2015/0307629, 2014/0288275 y WO2014/145806, todas las cuales se incorporan expresamente a modo de referencia en su totalidad y particularmente para las
25 técnicas descritas en ellas.

Ejemplo 1: Dominios de unión a CD28

[0388] Las secuencias de CD28 humano, de ratón y de macaco cangrejero se muestran en la figura 1 y son útiles para el desarrollo de dominios de unión a antígenos CD28 reactivos
30 cruzados para facilitar el desarrollo clínico.

1A: Nuevos dominios de unión a CD28

[0389] Un enfoque considerado para evitar el superagonismo asociado con TGN1412 fue generar nuevos dominios de unión a CD28 que tuvieran menor afinidad de unión a CD28 y/o unión a un epítipo de CD28 diferente al de TGN1412. En una campaña para generar

estos nuevos dominios de unión a CD28, se analizaron bibliotecas de fagos de novo internas contra CD28.

1A(a): Clon 1A7 derivado de fago

5 **[0390]** Cabe señalar que esta biblioteca de fagos utilizó un VL de línea germinal humana con diversidad introducida en el LC DR3. Las secuencias de aminoácidos del clon 1A7 derivado de fago de ejemplo se muestran en la figura 15.

10 **[0391]** Los clones derivados de fagos se formatearon como mAb bivalentes para investigar sus características de unión. Los plásmidos que contienen los dominios pesado variable y ligero variable de clones seleccionados se construyeron mediante ensamblaje de Gibson y se subclonaron en un vector de expresión pTT5 que contiene la secuencia codificante para las regiones constantes de IgG1 (con variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S67K). Se transfectó el ADN en HEK293E para su expresión y los mAb bivalentes resultantes se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de proteína A.

15 **[0392]** La afinidad de los mAb bivalentes derivados de fagos para CD28 se evaluó mediante el uso de Octet, un método basado en interferometría de biocapa (BLI). Los pasos experimentales para Octet generalmente incluyen lo siguiente: inmovilización (captura del ligando en un biosensor); asociación (inmersión de los biosensores recubiertos con ligando en pocillos que contienen el analito); y disociación (devolución de los biosensores al pocillo que contiene el tampón). La constante de disociación aparente resultante (K_{Dapp}) se muestra
20 en la figura 28 para XENP28428 (basado en el clon 1A7) y comparadores adicionales derivados de fagos.

[0393] Se investigó la unión de los mAb bivalentes derivados de fagos al CD28 de la superficie celular. Las PBMC humanas se incubaron con concentraciones indicadas de
25 XENP28428 o mAb derivados de fagos comparadores durante 1 hora a 4 °C. Luego, las células se tiñeron con anticuerpo secundario específico del fragmento F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana AffiniPure Alexa Fluor® 647 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Penn.) durante 1 hora a 4 °C y se analizaron por citometría de flujo. Los datos (figura 28) muestran que los mAb derivados de fagos pudieron unirse a las PBMC humanas, aunque con una
30 unión máxima mucho más débil que el mAb anti-CD28 de la técnica anterior HuTN228 (XENP27181, cuyas secuencias se representan en la figura 27).

1A (b): 1A7 no es superagonístico

[0394] El posible superagonismo de XENP28428 se evaluó mediante secado al aire según

el protocolo de Stebbings (Stebbing R. y cols. 2007). El secado al aire de los artículos de prueba se logró secándolos en un SpeedVac™ durante 2 horas a temperatura ambiente. Las PBMC humanas se trataron durante 24 horas con 10 µg de XENP28428 secado al aire (mAb 1A7 CD28 original α) y se comparó la actividad con el superagonista TGN1412 (XENP29154; cuyas secuencias se muestran en la figura 27) o el control PBS. El TGN1412 secado al aire promovió la secreción de IFN γ de PBMC humanas no estimuladas. En comparación, el nivel de IFN γ en las PBMC tratadas con XENP28428 secado al aire se mantuvo similar al control negativo de PBS (los datos se muestran en la figura 37).

10 1A(c): Ingeniería de variantes de afinidad 1A7

[0395] Con el objetivo de optimizar los bsAb CD20 x CD28 como se describe en el Ejemplo 5, se desarrollaron numerosas variantes de afinidad 1A7 mediante la ingeniería de variantes VH (secuencias ilustrativas como se muestra en la figura 16 y secuencias adicionales como se muestra en la figura 22), variantes VL (secuencias ilustrativas como se muestra en la figura 17 y secuencias adicionales como se muestra en la figura 23), secuencias de consenso para las cuales se muestran en la figura 24, y combinaciones de las mismas (secuencias ilustrativas para las cuales se muestran en la figura 18). La afinidad monovalente de variantes ilustrativas, en el contexto de scFv, se muestra en la figura 25. Estas secuencias pueden incluir además modificaciones «grapadas» para que puedan usarse en un scFv «grapado». En las figuras 19-21 se muestran ejemplos ilustrativos de dichas variantes VH y VL (y combinaciones VH/VL) con modificaciones «básicas».

1B: Dominios de unión a CD28 adicionales

[0396] Las secuencias para dominios de unión a CD28 adicionales que pueden encontrar uso en los bsAb CD20 x CD28 de la invención se muestran en la figura 26.

25

Ejemplo 2: Dominios de unión a CD20

[0397] Las secuencias para el CD20 humano, de ratón y macaco cangrejero se representan en la figura 2 y son útiles para el desarrollo de dominios de unión a CD20 de reacción cruzada para facilitar el desarrollo clínico.

30 [0398] Las secuencias para los dominios de unión a CD20 que se pueden utilizar en los bsAb CD20 x CD28 de la invención se representan en la figura 30.

Ejemplo 3: Ingeniería del bsAb CD20 x CD28

[0399] Los linfocitos T requieren múltiples señales para su activación y diferenciación completas. Como se muestra en la figura 31A, la señal 1, promovida por el reconocimiento

de un complejo péptido-MHC (pMHC) por el receptor de linfocitos T (TCR), es absolutamente necesaria para la activación de los linfocitos T. La señal 2, la cual se complementa con la señal 1 y la amplifica, se proporciona comúnmente mediante la interacción de los ligandos de CD28, CD80 y CD86 con el propio CD28. Aunque el acoplamiento de CD28 es inerte, cuando se combina con la activación de la señal 1, este mejora la activación, la supervivencia, y las señales de proliferación de los linfocitos T, lo que incluye la secreción de IL2 (véase la figura 31). Como CD80 y CD86 son expresados naturalmente por células presentadoras de antígenos profesionales, el grado de coestimulación de CD28 en el entorno tumoral puede ser muy variable. Al crear esta nueva clase de anticuerpos biespecíficos CD28 dirigidos a tumores, se puede imitar la interacción CD80/CD86 con CD28, lo que proporciona una fuente de señal 2. En particular, la señal puede ser proporcionada por el reconocimiento natural de TCR:pMHC de las células tumorales, o puede ser proporcionada por la combinación del CD28 biespecífico con un ligador de linfocitos T CD3 (que puede imitar la señal 1). Como hay un número cada vez mayor de activadores de linfocitos T CD3 en desarrollo clínico para neoplasias malignas de linfocitos B, sería útil desarrollar bsAb CD20 x CD28 para complementarse con dichas moléculas.

3A: Formatos

20 3A(a): 1 + 1 Fab-scFv-Fc

[0400]El formato Fab-scFv-Fc 1 + 1 (representado esquemáticamente en la figura 29A) comprende un primer monómero que comprende un Fv de cadena sencilla («scFv») con una primera especificidad de unión a antígenos unido covalentemente a un primer dominio Fc heterodimérico, es decir, scFv-dominio conector-CH2-CH3, un segundo monómero que comprende una cadena pesada, es decir, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, donde CH2-CH3 es un segundo dominio Fc heterodimérico complementario al primer dominio Fc heterodimérico, y una cadena ligera (LC) transfectada por separado de modo que se forma un dominio Fab que tiene una segunda especificidad de unión a antígenos con el dominio pesado variable. Las secuencias de bsAb CD20 x CD28 ilustrativos (basados en los dominios de unión como se describe en los Ejemplos 1 y 2) en el formato 1 + 1 Fab-scFv-Fc se muestran en la figura 33.

3A(b): 2 + 1 Fab2-scFv-Fc

[0401]El formato 2 + 1 Fab2-scFv-Fc (representado esquemáticamente en la figura 29B) comprende un primer monómero que comprende un primer dominio VH unido

covalentemente a un scFv (que tiene una primera especificidad de unión a antígeno) unido covalentemente a un primer dominio Fc heterodimérico, es decir, VH1-conector de dominio CH1-conector de dominio scFv-CH2-CH3, un segundo monómero que comprende un segundo dominio VH unido covalentemente a un segundo dominio Fc heterodimérico complementario, es decir, VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3, y un LC transfectado por separado de modo que los dominios Fab que tienen una segunda especificidad de unión a antígenos se forman con los dominios VH. Las secuencias para los bsAb CD20 x CD28 ilustrativos (en función de los dominios de unión como se describe en los Ejemplos 1 y 2) en el formato 2 + 1 Fab₂-scFv-Fc se representan en la figura 34.

10

3A (c): 2 + 1 stackFab₂-scFv-Fc

[0402]El formato 2 + 1 stackFab₂-scFv-Fc (representado esquemáticamente en la figura 29F) comprende un primer monómero que comprende un primer dominio VH acoplado de forma covalente a un segundo dominio VH unido de forma covalente a un primer dominio heterodimérico Fc, es decir, VH1-CH1-dominio-conector-VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3, un segundo monómero que comprende un scFv (que tiene una especificidad de unión al primer antígeno) unido de forma covalente a un segundo dominio Fc heterodimérico complementario, es decir, scFv-dominio conector-CH2-CH3, y un LC transfectado de forma separada de modo que los dominios Fab que tienen una especificidad de unión al segundo antígeno se forman con los dominios VH. Las secuencias para los bsAb CD20 x CD28 ilustrativos (en función de los dominios de unión como se describe en los ejemplos 1 y 2) en el formato 2 + 1 stackFab₂-scFv-Fc se representan en la figura 35.

15

20

3A(d): 2 + 1 mAb-scFv

[0403]El formato 2 + 1 mAb-scFv (representado esquemáticamente en la figura 29E) comprende un primer monómero que comprende un dominio VH unido de forma covalente a un primer dominio Fc heterodimérico unido de forma covalente a un scFv (que tiene una especificidad de unión al primer antígeno) es decir, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-dominio conector-scFv, un segundo monómero que comprende un dominio VH unido de forma covalente a un segundo dominio Fc heterodimérico complementario, es decir, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, y un LC transfectado de forma separada de modo que los dominios Fab que tienen una especificidad de unión al segundo antígeno se forman con los dominios VH. Las secuencias para los bsAb CD20 x CD28 ilustrativos (en función de los dominios de unión como se describe en los ejemplo 1 y 2) en el formato 2 + 1 mAb-scFv se representan

25

30

en la figura.

3B: Plataformas

5 **[0404]** Cualquier número de enfoques de heterodimerización como los conocidos en la técnica podrían encontrar uso en los formatos biespecíficos, en combinación con cualquier número de enfoques para purificar heterodímeros de homodímeros contaminantes, incluidos aquellos representados en las Figuras 3-4. Independientemente del formato bsAb, los anticuerpos biespecíficos CD28 son monovalentes para CD28 e incorporan variantes Fc diseñadas para eliminar la unión de FcγR y evitar un posible superagonismo. Estas
10 variantes de Fc incluyen las que se muestran en la figura 5. Cualquiera de los numerosos conectores conocidos en la técnica puede resultar útil para unir los dominios VH y VL del scFv. Finalmente, puede ser útil maximizar la semivida sérica de los bsAb, y cualquiera de las numerosas variantes que extienden la semivida, tal como se conocen en la técnica, pueden encontrar uso en estos bsAb.

15 **[0405]** Se utilizaron dos plataformas, en la presente memoria denominadas Plataforma X y Plataforma Y.

3B(a): Plataforma X

[0406] La Plataforma X (como se describe en la figura 8) utiliza las redes troncales 1 u 11 en la figura 10 o la red troncal de la Plataforma X en la figura 11. Específicamente, esta
20 plataforma utiliza las variantes Fc heterodiméricas L368D/K370S (en un primer monómero): S364K/E357Q (en un segundo monómero; típicamente el monómero con un scFv). Un monómero (normalmente el monómero que comprende L368D/K370S o el monómero que no incluye un scFv) incluye además variantes de pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D para aumentar la carga negativa de la cadena. El scFv utiliza un conector (GKPGS)₄ con
25 carga positiva (SEQ ID NO: 42) entre los dominios VH y VL para aumentar la carga positiva de la cadena que comprende el scFv. En conjunto, estos dos enfoques permiten una fácil purificación de heterodímeros a partir de homodímeros contaminantes. Las variantes de ablación de FcγR utilizadas en esta plataforma son las sustituciones E233P/L234V/L235A/G236_/S267K en el primer y segundo monómero. En algunos casos,
30 esta plataforma incluye las variantes de extensión de semivida M428L/N434S.

3B(b): Plataforma Y

[0407] La plataforma Y (como se describe en la figura 8) utiliza las estructuras principales 13 o 14 en la figura 10 o la estructura principal de la plataforma J en la figura 11.

Específicamente, esta plataforma utiliza las variantes Fc heterodiméricas T366S/L368A/Y407V (en un primer monómero): T366W (en un segundo monómero). Un monómero (normalmente el monómero que comprende Fab) incluye además H435R/Y436F para facilitar la purificación. El scFv puede utilizar un conector

5 GGSEKSSSGSGSESKSTGGS (SEQ ID NO: 55) (sin grapar) o un conector GGGGSGGSGGCPPCGGSGG (SEQ ID NO: 56) (grapado) entre los dominios VH y VL. Al utilizar el último conector scFv grapado, VH y VL incluyen además modificaciones de «grapa»/sustituciones de cisteína para formar puentes disulfuro con el conector. Las

10 L234A/L235A/D265S tanto los primeros monómeros como en los segundos. En algunos casos, esta plataforma incluye las variantes de extensión de semivida M252Y/S254T/T256E. Las secuencias de bsAb CD20 x CD28 ilustrativos en la Plataforma J se representan en la figura 33 como XENP42156, XENP42157, XENP42159 y XENP42160 y en la figura 36 como XENP42162 y XENP42163.

15 **[0408]** Cabe señalar que los componentes de la Plataforma X y la Plataforma Y se pueden mezclar y combinar. Por ejemplo, la Plataforma Y puede utilizar el conector (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 42) de la Plataforma X, por ejemplo, XENP42158 y XENP42161, secuencias como las que se muestran en la figura 33. Además, cada una de las Plataformas X y Y pueden utilizar variantes alternativas (por ejemplo, conectores scFv alternativos, variantes de

20 extensión de semivida alternativas, variantes de ablación de FcγR alternativas, etc.).

Ejemplo 4: Caracterización *in vitro* de los bsAb CD20 x CD28

[0409] A menos que se especifique lo contrario, el anticuerpo trispecífico (triAb) CD79b x CD20 x CD3 ilustrativo utilizado en los experimentos en la presente memoria descritos son

25 las secuencias bsAb CD79b x CD20 x CD3 representadas en la figura.

[0410] Las líneas de células cancerosas utilizadas fueron OCI-Ly-10, Carnaval, Daudi, Ramos, Jeko y WIL2-S. Los niveles de densidad del antígeno de la superficie celular se estimaron mediante FACS mediante el uso de perlas marcadas con fluorescencia según lo recomendado por el protocolo QuickCal (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Se

30 combinaron 50.000 células por pocillo y perlas MESF con mAb marcados durante 30 minutos a 4 °C. Luego, las células se lavaron y se fijaron en PFA al 1 %. Se realizó citometría de flujo para determinar la unión de anticuerpos y se realizaron cálculos de densidad de antígeno mediante el uso del software QuickCal® V.2.3. (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Los datos que representan la densidad de antígeno en las distintas líneas

celulares se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Densidad de antígenos de líneas celulares cancerosas

	Jeko	Ramos	Daudi	OCI-Ly-10	Carnaval	WIL2-S
CD86	27K	16K	97K	24K	282K	90K
CD80	1K	0	14K	8K	14K	11K
CD79b	1,2M	466K	304K	153K	264K	10K
CD20	1,2M	900K	726K	1M	1,2M	275K

5 **4A: LOS BSAB CD20 X CD28 SE COMBINAN PRODUCTIVAMENTE CON LOS TRIAB CD79B X CD20 X CD3**

10 **[0411]** Los bsAb CD20 x CD28 se diseñaron y produjeron con varios dominios de unión a CD20 (incluidos CD20-A_H1.202_L1.113 de alta afinidad, CD20-A_H1L1 de baja afinidad, CD20-B y CD20-C, secuencias como se muestra en la figura) y dominios de unión a CD28 de afinidades variables (1A7_H1.14_L1.71, 1A7_H1_L1.71 y 1A7_H1_L1.71 respectivamente con afinidades de unión a CD28 de 37 nM, 96 nM y 180 nM, secuencias como se muestra en la figura) en los formatos 1 + 1 Fab-scFv-Fc y 2 + 1 mAb-scFv (en la Plataforma X y la Plataforma J) (secuencias que se muestran en las figuras y). Para investigar su actividad, los bsAb CD20 x CD28 se emparejaron con un ligador de linfocitos T CD79b x CD20 x CD3 ilustrativo.

15 **[0412]** Las células cancerosas Carnaval, OCI-Ly-10 y Ramos se incubaron con linfocitos T (relación efector:objetivo 1:1) en presencia de XENP42157 o XENP42160 y un triAb CD79B x CD20 x CD3. En un primer conjunto de experimentos, se combinaron 1 µg/ml de activadores de linfocitos T con una titulación de dosis de bsAb CD20 x CD28. En otro conjunto de experimentos, se combinaron 1 µg/ml de bsAb CD20 x CD28 con una titulación de ligadores de linfocitos T CD3. La secreción de IL2 por los linfocitos T se evaluó después de 24 horas, cuyos datos se muestran en las figuras 38-39.

25 **Ejemplo 5: Mejora de CD20 X CD28 de la citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por CD79bXCD20XCD3**

[0413] Se evaluó la capacidad del bsAb CD20 X CD28 para mejorar la citotoxicidad mediada por linfocitos T mediante el uso de ensayos de cocultivo de linfocitos pan-T derivadas de donantes sanos en una proporción E:T de 1:1 en las líneas celulares CARNAVAL y OCI-Ly10 que expresan CD79b/CD20. Se analizaron linfocitos T de donantes sanos n=3 en

ensayos de citotoxicidad de cocultivo de linfocitos T/tumor con los anticuerpos indicados y líneas celulares objetivo que expresan mKate2. La citotoxicidad se midió durante 6 días. En un tratamiento combinado, los bsAb CD20 X CD28 mejoraron la citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por CD79bXCD20XCD3 de las células tumorales de una manera dependiente de la concentración en una relación E:T de 1:1 en las líneas celulares CD79b⁺CD20⁺, OCI-Ly10 y CARNAVAL, pero no en la línea celular K562 (véase la figura 40). En comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79bXCD20XCD3, el tratamiento combinado de CD79bXCD20XCD3 con 10 nM de bsAb CD20 X CD28 cambió los valores de citotoxicidad de EC₅₀ en las células CARNAVAL y OCI-Ly10 de 31,8 a 40,3 veces, respectivamente. No se observó ningún aumento de la citotoxicidad inducida por CD79bXCD20XCD3 en ninguna de las líneas celulares analizadas con el anticuerpo de control NullxCD28, lo que demuestra que CD20 es necesario para el aumento de la citotoxicidad mediada por linfocitos T mediada por bsAb CD20 X CD28. En las células K562, ni CD79bXCD20XCD3, bsAb CD20 x CD28 ni su combinación mostraron un efecto sobre la citotoxicidad mediada por linfocitos T (véase la figura 40A).

[0414] La capacidad de bsAb CD20 x CD28 para mejorar la activación de los linfocitos T se evaluó mediante el uso de CD25, medido como área CD25-FITC/pocillo durante 6 días. En un tratamiento combinado, los bsAb CD20 x CD28 mejoraron la activación de linfocitos T inducida por CD79bXCD20XCD3 de una manera dependiente de la concentración en una relación de E:T de 1:1 en las líneas celulares CD79b⁺CD20⁺, OCI-Ly10, y CARNAVAL, pero no en la línea celular K562 (véase la figura 40B). En comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79bXCD20XCD3, el tratamiento combinado de CD79bXCD20XCD3 con 10 nM de bsAb CD20 X CD28 cambió la EC₅₀ de activación de linfocitos T de 4,71 nM a 0,092 nM en OCI-Ly10 (51,2 veces) y de 0,76 nM a 0,041 nM en CARNAVAL (18,4 veces). No hubo mejora de la citotoxicidad inducida por CD79bXCD20XCD3 en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba con al anticuerpo de control NullxCD28, lo que demuestra que se necesita de CD20 para la mejora mediada por bsAb CD20 x CD28 de la activación de linfocitos T (véase la figura 40B).

[0415] La sinergia se evaluó de forma independiente para cada donante de linfocitos T individual (n = 3-6) mediante el uso de un modelo 4PL con resultados comparables para las áreas más altamente sinérgicas. Se observó una fuerte sinergia en condiciones de concentraciones medias a altas de bsAb CD20XCD28 y CD79bXCD20XCD3 en las líneas celulares CARNAVAL y OCI-Ly10 (véase la figura 40C).

Ejemplo 6: Actividad antitumoral *in vivo*

[0416] Se probó el efecto de los bsAb CD20XCD28 en combinación con CD79bXCD20XCD3 en xenoinjertos DLBCL OCI-Ly10 subcutáneos (SC) en ratones NSG. Las células tumorales se implantaron el día 0, los linfocitos T se inyectaron el día 13 y la dosificación se realizó los días 14, 17, 20, 24, 27, 31, 34, 38, 41, 45 y 48 (período de dosificación indicado por la barra debajo del eje X). Para los tratamientos combinados, la dosis indicada de bsAb CD20 x CD28 se combinó con CD79bXCD20XCD3 en una dosis de 1 mg/kg.

[0417] La TGI (inhibición del crecimiento tumoral) de los xenoinjertos DLBCL SC OCI-Ly10 se calculó el día 31, cuando al menos dos tercios de los ratones por grupo permanecían en estudio. El tratamiento con bsAb CD20 x CD28 a 0,5 mg/kg no resultó en eficacia antitumoral (2 % TGI, ns). El tratamiento con el anticuerpo CD79bxCD20xCD3 en una dosis de 0,3 mg/kg solo o en combinación con bsAb CD20 x CD28 en cualquier dosis probada no afectó el crecimiento del tumor OCI-Ly10 en comparación con el tratamiento de control DPBS (no se muestran los datos). El tratamiento con CD79bXCD20XCD3 en una dosis de 1 mg/kg resultó en un TGI subóptimo, estadísticamente pero no biológicamente significativo, del 44 %, en comparación con el tratamiento de control con DPBS. La combinación de CD79bXCD20XCD3 en una dosis de 1 mg/kg con bsAb CD20 x CD28 a 0,02, 0,1 y 0,5 mg/kg resultó en un TGI significativo del 50 %, 49 % y 75 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control DPBS.

[0418] El día 38, la combinación de CD79bXCD20XCD3 en una dosis de 1 mg/kg con bsAb CD20 x CD28 a 0,5 mg/kg mejoró estadísticamente la eficacia antitumoral en comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79bXCD20XCD3. Los tratamientos combinados de dosis más bajas no dieron como resultado una inhibición adicional del crecimiento tumoral en comparación con CD79bXCD20XCD3 en monoterapia en una dosis de 1 mg/kg. El tratamiento combinado de CD79bXCD20XCD3 en una dosis de 1 mg/kg con bsAb CD20 x CD28 a 0,5 mg/kg resultó en un TR del 97 % con 2 de 8 respuestas parciales y 6 de 8 respuestas completas en el día 62 (véase la figura 41).

Ejemplo 7: Mejora de CD20 X CD28 de CD79bXCD20XCD3-citotoxicidad mediada por linfocitos T en líneas celulares que expresan niveles bajos de CD20 y CD79b

[0419] Las líneas de células cancerosas utilizadas fueron WILL-2 y NALM6. Los niveles de densidad del antígeno de la superficie celular se estimaron mediante FACS mediante el uso de perlas marcadas con fluorescencia según lo recomendado por el protocolo QuickCal

(Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Se combinaron 50 000 células por pocillo y perlas MESF con mAb marcados durante 30 minutos a 4 °C. Luego, las células se lavaron y se fijaron en PFA al 1 %. Se realizó citometría de flujo para determinar la unión de anticuerpos y se realizaron cálculos de densidad de antígeno mediante el uso del software QuickCal® V.2.3. (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Los datos que representan la densidad de antígeno en las distintas líneas celulares se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Densidad de antígenos de líneas celulares cancerosas

	WILL-2	NALM6
CD20	4.000	Detección por debajo del límite
CD79b	2.000	~130

[0420] Se evaluó la capacidad de bsAb CD20 x CD28 de mejorar la citotoxicidad mediada por linfocitos T mediante el uso de ensayos de cocultivos de linfocitos derivados de donantes en una relación E:T de 5:1 en las líneas celulares WILL-2 y NALM6 que expresan CD79b bajo/ CD20 bajo. Se analizaron linfocitos T de donantes sanos n=3-6 en ensayos de citotoxicidad de cocultivo de linfocitos T/tumor con los anticuerpos indicados y líneas celulares objetivo que expresan mKate2. La citotoxicidad se midió durante 6 días. En un tratamiento combinado, el anticuerpo monoclonal CD20 X CD28 mejoró la citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por CD79bXCD20XCD3 de las células tumorales de una manera dependiente de la concentración en una relación E:T de 5:1 en las líneas celulares CD79b+CD20+, WILL-2 y NALM6 (véase la figura 43 A). En comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79bXCD20XCD3, el tratamiento combinado de CD79bXCD20XCD3 con 10 nM de bsAb CD20 X CD28 cambió el % máximo de citotoxicidad del 23,6 % al 68,4 % en WILL-2 (EC50 cambió 9,2 veces) y del 42,1 % al 74,1 % en células NALM6 (EC50 cambió 6,5 veces). No hubo mejora de la citotoxicidad inducida por CD79bXCD20XCD3 en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba con el anticuerpo de control NullxCD28, lo que demuestra que se necesita de CD20 para la mejora mediada por bsAb CD20 x CD28 de la citotoxicidad mediada por linfocitos T (véase la figura 42A).

[0421] La activación de linfocitos T inducida por bsAb CD20 x CD28 mejorada con CD79bXCD20XCD3 también se midió por la expresión de CD25 de manera dependiente de la concentración en una relación E:T de 5:1 en las líneas celulares CD79b+CD20+,

WILL-2 y NALM6 (véase la figura 43B). En comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79bXCD20XCD3, el tratamiento combinado de CD79bXCD20XCD3 con 10 nM bsAb CD20 x CD28 cambió los valores de EC50 de activación de linfocitos T en las células WILL-2 y NALM6 de 69,7 a 4,9 veces, respectivamente. No hubo mejora de la activación de linfocitos T inducida por CD79bXCD20XCD3 en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba con el anticuerpo de control NullxCD28, lo que demuestra que se necesita de CD20 para la mejora mediada por bsAb CD20 x CD28 de la citotoxicidad mediada por linfocitos T (véase la figura 42B).

[0422] La sinergia se evaluó de forma independiente para cada donante de linfocitos T individual (n = 3) mediante el uso de un modelo 4PL con resultados comparables para las áreas más altamente sinérgicas. Se observó una fuerte sinergia en condiciones de altas concentraciones de bsAb CD20XCD28 y CD79bXCD20XCD3 en las líneas celulares WILL-2 y NALM6 (véanse la figuras 42C y 42D).

Ejemplo 8: Mejora de CD20 X CD28 de la activación, proliferación y liberación de citocinas de linfocitos T inducidos por CD79bXCD20XCD3

[0423] Se evaluó la capacidad del bsAb CD20 x CD28 de mejorar la activación y proliferación de linfocitos T mediante el uso de ensayos de cocultivo de linfocitos pan-T derivados del donante sano en una relación E:T de 1:1 en líneas celulares CARNAVAL y OCI-Ly10 que expresan CD79b/CD20. Se analizaron linfocitos T de donantes sanos n=3 en ensayos de citotoxicidad de cocultivo de linfocitos T/tumor con los anticuerpos indicados y líneas celulares objetivo que expresan mKate2. La activación de linfocitos T se midió como %CD25 y la proliferación de linfocitos T se midió como el % de células que mostraron dilución CellTrace Violet en comparación con los linfocitos T no estimulados.

[0424] En un tratamiento combinado, el bsAb CD20 x CD28 mejoró la activación y proliferación de linfocitos T inducidos por CD79bXCD20XCD3 de una manera que depende de la concentración en una relación E:T de 1:1 en las líneas celulares CD79b+CD20+, OCI-Ly10, y CARNAVAL (véase la figura 43A). Se evaluó la capacidad del bsAb CD20 x CD28 de mejorar la liberación de citocinas mediante el uso de ensayos de cocultivo de linfocitos pan-T derivados del donante sano en una relación E:T de 1:1 en las líneas celulares CARNAVAL y OCI-Ly10 que expresan CD79b/CD20. Se analizaron linfocitos T de donantes sanos n=3 en ensayos de citotoxicidad de cocultivo de linfocitos T/tumor con los anticuerpos indicados y líneas celulares objetivo durante 72 horas. Las citocinas se midieron mediante el uso de iQue Qbeads® Human PlexScreen (Sartorius) para medir interferón (IFN)- γ , IL-2

y factor de necrosis tumoral (TNF) α , de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En un tratamiento combinado, la liberación de citocinas mejorada inducida por CD79bXCD20XCD3 y mejorada por bsAb CD20 X CD28 IFN- γ de IFN- γ , IL-2 y TNF- α de una manera dependiente de la concentración en una relación E:T de 1:1 en las líneas celulares CD79b+CD20+, OCI-Ly10 y CARNAVAL (véase la figura 43B).

Ejemplo 9: Mejora de CD20 X CD28 de la activación, diferenciación y liberación de citocinas de linfocitos T inducidos por CD79bXCD20XCD3

[0425] La capacidad del anticuerpo monoclonal CD20 X CD28 de mejorar la proliferación, activación y diferenciación de linfocitos T mediada por TCE se evaluó mediante el uso de ensayos de cocultivo de linfocitos pan-T derivados de donantes sanos y líneas celulares de linfoma, CARNAVAL u OCI-Ly10, en una relación E:T de 1:1. Los linfocitos T de n = 2 donantes sanos se probaron en ensayos de citotoxicidad de cocultivo de linfocitos T/tumor con los anticuerpos terapéuticos indicados y las líneas celulares diana durante 72 horas. Se recogieron sobrenadantes para medir las citocinas secretadas. Las citocinas se midieron mediante el uso del kit Human proinflamatorio Panel 1 de Meso Scale Discovery (MSD) para medir interferón (IFN)- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral (TNF) α , de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD4/PE-Cy7, anti-CD8/PerCP-Cy5.5, anti-CD69/PE, anti-CD25/APC, anti-CD45RA/Alexa Fluor 700, anti-CD45RO/BV605, anti-CD197 (CCR7)/AF488 y anti-CD19/BV786 y se analizaron mediante citometría de flujo. Para medir la proliferación de linfocitos T, se evaluó la dilución de CTV. La intensidad de fluorescencia de CTV se reduce a través de divisiones celulares posteriores (aproximadamente hasta la mitad de la etiqueta fluorescente de las células originales) con cada división celular y aparece como un pico discreto en un gráfico de histograma. Para medir el nivel de activación de los linfocitos T, se midió el porcentaje absoluto de células que expresaban CD25 para los linfocitos T CD4+ o CD8+. Para evaluar la diferenciación de linfocitos T, se determinó el porcentaje absoluto de linfocitos T sin tratar (CCR7+CD45RO-), linfocitos T de memoria central (TCM; CCR7+CD45RO+), linfocitos T de memoria efectoras (TEM; CCR7-CD45RO+) y linfocitos T efectoras (TE; CCR7-CD45RO-) para linfocitos T CD4+ o CD8+.

[0426] En un tratamiento combinado, el bsAb CD20 X CD28 mejoró la proliferación de linfocitos T inducida por CD79b X CD20 X CD3. En comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79b X CD20 X CD3, el tratamiento combinado de CD79b X CD20 X CD3 con 10 nM bsAb CD20 x CD28 tuvo un efecto más fuerte sobre la proliferación de

linfocitos pan-T, CD8+ y CD4+. El bsAb CD20 X CD28 no tuvo efecto sobre la proliferación de linfocitos T en ausencia de TCE. De igual modo, no hubo aumento de la citotoxicidad inducida por CD79b X CD20 X CD3 en ninguna de las líneas celulares analizadas con el anticuerpo de control CD20xNull o NullxCD28, lo que demuestra que la unión de CD20 y CD28 es necesaria para el aumento de la proliferación de linfocitos T mediada por bsAb CD20 x CD28 (véanse la figuras 44A y 44B). Los datos representativos de 1 donante de linfocitos T de 2 donantes se analizaron por duplicado.

[0427] En un tratamiento combinado, el anticuerpo monoclonal CD20 X CD28 mejoró la activación de los linfocitos T inducida por CD79bXCD20XCD3, medida por la expresión de CD25 en un cocultivo de linfocitos pan-T y células de linfoma, CARNAVAL u OCI-Ly10, en una relación E:T de 1:1. En comparación con el tratamiento en monoterapia con el anticuerpo monoclonal CD79b X CD20 X CD3, el tratamiento combinado de CD79b X CD20 X CD3 con 10 nM del anticuerpo monoclonal CD20 X CD28 aumentó la activación de los linfocitos T en los cocultivos T pan y CARNAVAL u OCI-Ly10 en un 31 o 44 % en los linfocitos T CD4+ y en un 28 o 19 % en los linfocitos CD8+, respectivamente. No hubo mejora de la activación de linfocitos T inducida por CD79b X CD20 X CD3 con el anticuerpo de control CD20xNull o NullxCD28, lo que demuestra que la reticulación de CD20 y CD28 es necesaria para la mejora de la activación de linfocitos T mediada por bsAb CD20 x CD28 (véase la figura 44C). Los datos son el promedio +/- DE de 2 donantes se analizaron por duplicado.

[0428] En un tratamiento combinado, el anticuerpo monoclonal CD20 X CD28 mejoró la disminución inducida por CD79b X CD20 X CD3 en los linfocitos T sin tratar y el aumento de los linfocitos T de memoria central (TCM). La combinación de CD79b X CD20 X CD3 con 10 nM de bsAb CD20 x CD28 aumentó aún más el porcentaje de linfocitos TCM en comparación con el tratamiento de monoterapia con CD79b X CD20 X CD3, con una disminución concurrente de linfocitos T sin tratar, linfocitos T de memoria efectores (TEM) y linfocitos T efectores (TE). El bsAb CD20 x CD28 no tuvo ningún efecto en la diferenciación de linfocitos T en la ausencia de TCE. No hubo ninguna mejora de la diferenciación de linfocitos T inducida por CD79b X CD20 X CD3 con el anticuerpo de control CD20xNull o NullxCD28, lo que demuestra que se necesita la unión a CD20 y CD28 para la mejora mediada por bsAb CD20 x CD28 de la diferenciación de linfocitos T (véanse las figuras 44D, 44E, y 44F). Se analizaron por duplicado los datos que son el promedio +/- DE de 2 donantes. Linfocitos T sin tratar (CCR7+CD45RO-), T de memoria central (TCM; CCR7+CD45RO+), T de memoria efectora (TEM; CCR7-CD45RO+) y T efectores (TE; CCR7-CD45RO-).

[0429] En un tratamiento combinado, el bsAb CD20 X CD28 mejoró el aumento inducido por CD79b X CD20 X CD3 de IFN- γ , IL-2 y TNF- α en el sobrenadante de cocultivos de linfocitos pan-T y células CARNAVAL u OCI-Ly10 en dos dosis diferentes de CD79b X CD20 X CD3 (véase la figura 44G). CARNAVAL: CD79bXCD20XCD3 Dosis 1: 0,1 nM, dosis 2: 0,5 nM. OCI-Ly10: CD79bXCD20XCD3 Dosis 1: 1 nM, dosis 2: 5 nM.

MODALIDADES

La descripción también aborda los siguientes aspectos:

Modalidad 1. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende:

- 10 (a) un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20, donde el primer dominio de unión a antígenos comprende:
 - (i) una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (vhCDR1), una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;
 - (ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;
 - (iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459.
 - (iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vlCDR1), una vlCDR2 y una vlCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;
 - (v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471, y una región

determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

5 (vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;

10 (vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

15 (viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;

20 (ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;

25 (x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;

30 (xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484;

(xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable

- (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;
- 5 (xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;
- 10 (xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;
- 15 (xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- 20 (xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498; y
- 25 (b) un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28, donde el segundo dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3
- 30 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (ii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3

de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(iii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(iv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(v) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(vi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(vii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(viii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

(ix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, y una región

determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;

5 (x) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;

10 (xi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

15 (xii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;

20 (xiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;

25 (xiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;

30 (xv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;

(xvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable

- (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;
- 5 (xvii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- 10 (xviii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- 15 (xix) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;
- 20 (xx) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380;
- 25 (xxi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395;
- 30 (xxii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vICDR1), una vICDR2 y una vICDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;

- (xxiii) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;
- (xxiv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;
- (xxv) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o
- (xxvi) una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un dominio de cadena pesada variable (VH2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera (vLCDR1), una vLCDR2 y una vLCDR3 de un dominio de cadena ligera variable (VL2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

Modalidad 2. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 1, donde

- (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446;
- (ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

(iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

(iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

(ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

(iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

(iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

- 5 (v) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos
- 10 de la SEQ ID NO: 8; o
- (vi) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vICDR2 que tiene una secuencia de
- 15 aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

Modalidad 3. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 1 o 2, donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

- 20 (i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;
- (ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;
- 25 (iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459;
- (iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;
- (v) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;
- 30 (vi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;
- (vii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;
- (viii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y un VL1 que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;
- (ix) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;
- (x) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y un VL1 que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;
- (xi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484;
- (xii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;
- 10 (xiii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;
- (xiv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;
- (xv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y un VL1 que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (xvi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498; y
- (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene
- 20 una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 25 (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que
- 30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;

- (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;
- 5 (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- 10 (xiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;
- (xiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;
- (xv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;
- 15 (xvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;
- (xvii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- 20 (xviii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;
- (xx) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- 25 (xxi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395;
- (xxii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;
- 30 (xxiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;
- (xxiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;
- (xxv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(xxvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

Modalidad 4. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-3, donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

(i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 443;

(ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 451;

(iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 459;

(iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 467;

(v) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 471; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 472;

(vi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 473; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 474;

(vii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 475; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 472;

(viii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 477; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 478;

(ix) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 479; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 480;

(x) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la

- SEQ ID NO: 481; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 482;
- (xi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 483; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 484;
- (xii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 487; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 467;
- (xiii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 489; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 490;
- (xiv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 491; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 492;
- (xv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 495; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 496; o
- (xvi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 497; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 498; y
- (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5;
- (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5;
- (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;
- (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;
- (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la

- SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5;
- (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 75;
- (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 79;
- (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 111;
- (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 75;
- (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 79;
- (xiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 320; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 324;
- (xiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 327; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 331;
- (xv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 335; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 339;
- (xvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 343; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %

- idéntica a la SEQ ID NO: 347;
- (xvii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 351; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 355;
- 5 (xviii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 359; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 355;
- (xix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 367; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %
- 10 idéntica a la SEQ ID NO: 371;
- (xx) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 375; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 380; o
- (xxi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la
- 15 SEQ ID NO: 391; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 395;
- (xxii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 399; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 403;
- 20 (xxiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 407; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 411;
- (xxiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 415; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %
- 25 idéntica a la SEQ ID NO: 419;
- (xxv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 423; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5; o
- (xxvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la
- 30 SEQ ID NO: 431; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 435.

Modalidad 5. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-4, donde:

- (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;
 - (ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;
 - (iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
 - (iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; y
- (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
 - (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
 - (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
 - (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
 - (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
 - (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
 - (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
 - (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
 - (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
 - (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
 - (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o
 - (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

Modalidad 6. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-5, donde el primer dominio de unión a antígenos es un diacuerpo, un Fab, un F(ab')₂, un Fc, un Fabc, un Fv, un scFv o un andamiaje proteico.

5

Modalidad 7. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-6, donde el segundo dominio de unión a antígenos es un diacuerpo, a Fab, a F(ab')₂, a Fc, a Fabc, a Fv, a scFv, o un andamiaje proteico.

10 Modalidad 8. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-7, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo.

Modalidad 9. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-8, donde el anticuerpo es un anticuerpo de IgG o un fragmento de este.

15

Modalidad 10. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-9, donde el anticuerpo comprende un primer dominio Fc y un segundo dominio Fc.

20 Modalidad 11. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 10, donde uno del primer y segundo dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido T366W, y el otro del primer y segundo dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos T366S/L368A/Y407V, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

25 Modalidad 12. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 10, donde el primer y el segundo dominio Fc comprenden una o más sustituciones de aminoácidos L234A/L235A/D265S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

30 Modalidad 13. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 10, donde el primer o segundo dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos H435R/Y436F, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

Modalidad 14. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 10, donde el primer y el segundo dominio Fc comprenden sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de las siguientes: S364K/E357Q; L368D/K370S; S364K; L368D/K370S;

S364K; L368E/K370S; D401K; T411E/K360E/Q362E; T366W; y T366S/L368A/Y407V, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

5 Modalidad 15. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-14, donde el primer dominio de unión a antígenos es un Fab y el segundo dominio de unión a antígenos es un scFv grapado.

Modalidad 16. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-15, donde:

- 10 (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y
- 15 (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.
- 20

Modalidad 17. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-16, donde:

- 25 (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; y
- (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.
- 30

Modalidad 18. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la modalidad 2.

Modalidad 19. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de la modalidad 18.

5 Modalidad 20. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de la modalidad 19.

Modalidad 21. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este que comprende:

- a) un primer monómero que comprende, desde el extremo N al extremo C, un VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3, donde el VH1 es el primer dominio de cadena pesada variable y CH2-CH3 es un primer dominio Fc; y
- 10 b) un segundo monómero que comprende:
 - i) un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un segundo dominio de cadena pesada variable (VH2), un conector y un segundo dominio de cadena ligera variable (VL2), y
 - 15 ii) un segundo dominio Fc, donde el scFv está unido covalentemente al extremo N del segundo dominio Fc mediante el uso de un conector de dominio;
- c) una cadena ligera que comprende, desde el extremo N al extremo C, VL1-CL, donde VL1 es el primer dominio de cadena ligera variable y CL es un dominio de cadena ligera constante,
- 20 donde el VH1 y el VL1 juntos forman un primer dominio de unión a antígenos y el VH2 y el VL2 juntos forman un segundo dominio de unión, y
- donde el primer dominio de unión a antígenos se une a CD20 y el segundo dominio de unión a antígenos se une a CD28.

25 Modalidad 22. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 21, donde:

- (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:
 - (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y una vlCDR1 que tiene
 - 30 una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446;
 - (ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3

que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

5 (iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

10 (iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

20 (ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

30 (iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vLCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vLCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vLCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

22;

(iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una
5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

(v) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que
10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o

(vi) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una
15 vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

20

Modalidad 23. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la modalidad 21 o 22, donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

(i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;

25 (ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;

(iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459;

(iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que
30 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;

(v) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 471; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;

(vi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 473; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 474;

- (vii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 475; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472;
- (viii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 477; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 478;
- 5 (ix) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 479; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 480;
- (x) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 481; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 482;
- (xi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 483; y un VL1 que
- 10 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 484;
- (xii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 487; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467;
- (xiii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 489; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 490;
- 15 (xiv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 491; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 492;
- (xv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 495; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 496; o
- (xvi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 497; y un VL1 que
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 498; y
- (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:
- (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 30 (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que

- tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que
- 5 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111;
- (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- 10 (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (xiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 320; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324;
- (xiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 327; y un VL2 que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 331;
- (xv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339;
- (xvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347;
- 20 (xvii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xviii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 359; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 355;
- (xix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 367; y un VL2 que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 371;
- (xx) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 375; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 380; o
- (xxi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 391; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 395;
- 30 (xxii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 399; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 403;
- (xxiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 407; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 411;
- (xxiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 415; y un VL2

que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 419;

(xxv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 423; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(xxvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 431; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 435.

Modalidad 24. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-23, donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

10 (i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 443;

(ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %
15 idéntica a la SEQ ID NO: 451;

(iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 459;

(iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la
20 SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 467;

(v) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 471; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 472;

25 (vi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 473; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 474;

(vii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 475; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %
30 idéntica a la SEQ ID NO: 472;

(viii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 477; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 478;

(ix) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la

SEQ ID NO: 479; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 480;

(x) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 481; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %

5 idéntica a la SEQ ID NO: 482;

(xi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 483; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 484;

10 (xii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 487; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 467;

(xiii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 489; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 490;

15 (xiv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 491; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 492;

(xv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 495; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %

20 idéntica a la SEQ ID NO: 496; o

(xvi) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 497; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 498; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

25 (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5;

(ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %

30 idéntica a la SEQ ID NO: 5;

(iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;

(iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la

- SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;
- (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5;
- (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 75;
- (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 79;
- (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 111;
- (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 75;
- (xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 79;
- (xiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 320; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 324;
- (xiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 327; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 331;
- (xv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 335; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %

idéntica a la SEQ ID NO: 339;

(xvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 343; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 347;

5 (xvii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 351; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 355;

(xviii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 359; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %
10 idéntica a la SEQ ID NO: 355;

(xix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 367; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 371;

(xx) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la
15 SEQ ID NO: 375; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 380; o

(xxi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 391; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 395;

20 (xxii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 399; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 403;

(xxiii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 407; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %
25 idéntica a la SEQ ID NO: 411;

(xxiv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 415; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 419;

(xxv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la
30 SEQ ID NO: 423; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5; o

(xxvi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 431; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 435.

Modalidad 25. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-24, donde:

(a) el primer dominio de unión a antígenos comprende:

- 5 (i) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 439; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 443;
- (ii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 447; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 451;
- 10 (iii) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; o
- (iv) un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 463; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 467; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende:

- 15 (i) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (ii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (iii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- 20 (iv) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (v) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
- (vi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un VL2 que
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (vii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- (viii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75;
- 30 (ix) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (x) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79;
- (xi) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que

tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; o

(xii) un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

5 Modalidad 26. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-25, donde:

(a) un primer monómero que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 405, 422, 427, 436, 453, 456, 461, y 485;

10 b) se selecciona un segundo monómero de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 406, 417, 418, 421, 428, 430, 432, 434, 438, 448, 468, 469 y 486; y

c) una cadena ligera que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se representan por medio de las SEQ ID NO: 334, 366, 426, y 429.

15 Modalidad 27. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-26, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento de este.

Modalidad 28. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-27, donde el anticuerpo es un anticuerpo de IgG o un fragmento de este.

20 Modalidad 29. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-28, donde uno del primer y el segundo dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos T366W, y el otro del primer y el segundo dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos T366S/L368A/Y407V, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

25 Modalidad 30. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-29, donde el primer y el segundo dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos L234A/L235A/D265S, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

30 Modalidad 31. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-30, donde el primer o segundo dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos H435R/Y436F, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

Modalidad 32. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-31, donde el primer y el segundo dominio Fc comprenden las sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de las siguientes: S364K/E357Q; L368D/K370S; S364K; 5 L368D/K370S; S364K; L368E/K370S; D401K; T411E/K360E/Q362E; T366W; y T366S/L368A/Y407V, donde la numeración está de acuerdo con la numeración de la UE.

Modalidad 33. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-32, donde:

10 (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y

15 (b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

20

Modalidad 34. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21-33, donde:

25 (a) el primer dominio de unión a antígenos comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; y

(b) el segundo dominio de unión a antígenos comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

30

Modalidad 35. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las modalidades 21 a 34, donde el primer monómero comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461, el segundo monómero comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

469 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429.

Modalidad 36. Un método para tratar neoplasias malignas de linfocitos B en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo de estos y un ligador de linfocitos T, donde:

(A) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de este comprende:

(a) un primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende:

10 (i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 441; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 442; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 444, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 446;

15 (ii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 449; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 450; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 452, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 454;

20 (iii) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; o

25 (iv) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 464; una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 465; y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 466; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 356, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 357, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 470; y

(b) un segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28 que comprende:

(i) una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una vhCDR2

5

10

15

20

25

30

de la SEQ ID NO: 22; y

(B) el ligador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo de este.

5 Modalidad 37. El método de la modalidad 36, donde el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) el primer dominio de unión a antígenos que se une a CD20 comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 440, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 457, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 458; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 460, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 445, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 462; y

(ii) el segundo dominio de unión a antígenos que se une a CD28 comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

20

Modalidad 38. El método de la modalidad 36 o 37, donde el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(a) un dominio de unión a antígenos que se une a CD79b que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 524, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 525, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 526; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 528, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 529, y una vlCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 530;

(b) un dominio de unión a antígenos que se une a CD20 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 540, una vhCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 541, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 542; y una vlCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 544, una vlCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID NO: 545, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 546; y

(c) un dominio de unión a antígenos que se une a CD3 que comprende una vhCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 532, una vhCDR2 que tiene una
 5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 533, y una vhCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 534; y una vICDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 536, una vICDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 537, y una vICDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 538.

10

Modalidad 39. El método de cualquiera de las modalidades 36-38, donde el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(a) el dominio de unión a antígenos CD20 que comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos
 15 de la SEQ ID NO: 459; y

(b) el dominio de unión a antígenos CD28 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

20

Modalidad 40. El método de cualquiera de las modalidades 36-39, donde el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(a) el dominio de unión a antígenos CD79b que comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 523; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 527;

25

(b) el dominio de unión a antígenos CD20 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 539; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 543; y

(c) el dominio de unión a antígenos CD3 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 531; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos
 30 de la SEQ ID NO: 535.

Modalidad 41. El método de cualquiera de las modalidades 36 a 40, donde:

(a) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) el dominio de unión a antígenos CD20 que comprende un VH1 que tiene una secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 455; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 459; y

(ii) el dominio de unión a antígenos CD28 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos

5 de la SEQ ID NO: 79; y

(b) el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) el dominio de unión a antígenos CD79b que comprende un VH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 523; y un VL1 que tiene una secuencia de aminoácidos
10 de la SEQ ID NO: 527;

(ii) el dominio de unión a antígenos CD20 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 539; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 543; y

(iii) el dominio de unión a antígenos CD3 que comprende un VH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 531; y un VL2 que tiene una secuencia de aminoácidos
15 de la SEQ ID NO: 535.

Modalidad 42. El método de cualquiera de las modalidades 36-41, donde el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:

20 (a) un primer polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461;

(b) un segundo polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 469; y

(c) un polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
25 NO: 429.

Modalidad 43. El método de cualquiera de las modalidades 36-42, donde el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende:

30 (a) un primer polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 520;

(b) un segundo polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 521; y

(c) un polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 522.

Modalidad 44. El método de cualquiera de las modalidades 36-43, donde:

(a) el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) un primer polipéptido monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 461;

(ii) un segundo polipéptido de monómero de que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 469;

(iii) un primer polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 429; y

(b) el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo comprende:

(i) un cuarto polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 520;

(ii) un quinto polipéptido de monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 521; y

(iii) un segundo polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 522.

Modalidad 45. El método de cualquiera de las modalidades 36-44, donde el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo de este y el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo de este se administran juntos en una única composición o se administran por separado en dos o más composiciones diferentes.

Modalidad 46. El método de cualquiera de las modalidades 36-45, donde el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo de este y el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo de este se administran por vía subcutánea o intravenosa.

Modalidad 47. El método de cualquiera de las modalidades 36-46, donde el anticuerpo anti-CD20 x anti-CD28 o el fragmento de anticuerpo de este y el anticuerpo anti-CD79b x anti-CD20 x anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo de este se administran de forma simultánea o secuencial.

Modalidad 48. El método de cualquiera de las modalidades 36-47, donde la neoplasia

maligna de linfocitos B es linfoma de linfocitos B, linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), un linfoma de células del manto (MCL), un linfoma folicular (FL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiple (MM), linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas o plasmacitoma.