



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0706737-2 A2



(22) Data de Depósito: 25/01/2007
(43) Data da Publicação: 05/04/2011
(RPI 2100)

(51) Int.CI.:
C07K 16/00

(54) Título: MOLÉCULAS LIGANTES

(30) Prioridade Unionista: 20/01/2006 GB 0601513.5

(73) Titular(es): Erasmus University Medical Centre Rotterdam

(72) Inventor(es): Dubravka Drabek, Franklin Gerardus Grosveld, Richard Wilhelm Janssens, Roger Kingdon Craig

(74) Procurador(es): RICARDO PINHO

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007000258 de 25/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/085837de 02/08/2007

(57) Resumo: MOLÉCULAS LIGANTES A presente invenção refere-se à fabricação de complexos ligantes polipeptídeo mono, di e multivalentes, também complexos ligantes polipeptídeo mono, di ou multi-específicos e seus usos. A invenção também refere-se à fabricação e uso de um repertório diverso de domínios ligantes Vhespecíficos de antígeno derivados de bibliotecas de mostra de fago, animais transgênicos ou fontes naturais. Preferivelmente os domínios ligantes VH e os domínios de dimerização compreendem seqüências humanas. Os complexos de ligação de polipeptídeo compreendem domínios de homo ou hetero-dimerização com quatro domínios de ligação de antígeno [VHJ fundidos nos termini amino e carboxila dos domínios de dimerização preferivelmente usando peptídeos ligadores ou de articulação. Onde os complexos de ligação polipeptídeo carecem de funções efetoras CH2-CH3 eles são preferivelmente de menos que 120kDa em tamanho. Rotas de fabricação são aqui descritas.



P10706737-2

"MOLÉCULAS LIGANTES"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à geração de complexos ligantes polipeptídeos compreendendo domínios ligantes VH (como aqui definidos) ligados a ambos termini amino e carboxila de domínios de dimerização. Domínios ligantes VH e domínios de dimerização gerados usando os processos da presente invenção mostram inerente estabilidade estrutural e funcional com relação de complexos ligantes polipeptídeos derivados de scFv descritos na técnica anterior, assim 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 1091

de célula mamífera são altos e ameaçam limitar o potencial de terapias baseadas em anticorpo na ausência de alternativas aceitáveis. Uma variedade de organismos transgênicos são capazes de expressarem anticorpos inteiramente funcionais.

5 Estes incluem plantas, insetos, galinhas, cabras e gado. Fragmentos de anticorpo funcional podem ser fabricados em *E. coli* mas o produto genericamente tem baixa estabilidade em soro a menos que pegilado durante o processo de fabricação.

Complexos anticorpo bi-específico são moléculas 10 baseadas em Ig engenheiradas capazes de ligação de dois diferentes epítopos sobre os mesmos, ou diferentes抗ígenos. Proteínas de ligação bi-específicas incorporando anticorpos sozinhas ou em combinação com outros agentes ligantes mostram promessa para modalidades de tratamento onde funções 15 imunes humanas capturadas elicitam um efeito terapêutico, por exemplo, a eliminação de patógenos (Van Spriel et al., (1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669; Tacken et al., (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940; US 5 487 890), o tratamento de cancer (Glennie and van der Winkel, (2003) *Drug 20 Discovery Today*, 8, 503-5100); e imunoterapia (Van Spriel et al., (2000) *Immunol. Today*, 21, 391-397; Segal et al., (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6; Lyden et al., (2001) *Nat. Med.*, 7, 1194-1201).

Questões de fabricação são compostas onde um 25 produto anticorpo bi-específico é baseado em dois ou mais complexos H₂L₂. Por exemplo, co-expressão de dois ou mais conjuntos de genes de cadeia pesada e leve pode resultar na formação de até 10 diferentes combinações, somente uma das

quais é o desejado heterodímero (Suresh et al., (1986) Methods Enzymol., 121, 210-228).

Para endereçar a este assunto, um número de estratégias foram desenvolvidas para a produção em células mamíferas de formatos IgG bi-específicos de inteiro comprimento (BsIgG) que retêm função efetora de cadeia pesada. BsIgGs requerem cadeias pesadas "maçaneta e burado" para prevenir formação de heterodímero e utiliza cadeias-L idênticas para evitar desemparelhamento de cadeia-L (Carter, (2001) J. Immunol. Methods, 248, 7-15). Estratégias de reticulação química alternativas também foram descritas para a produção de complexos a partir de fragmentos de anticorpos cada um reconhecendo diferentes抗ígenos (Ferguson et al., (1995) Arthritis and Rheumatism, 38, 190-200) ou a reticulação de outras proteínas ligantes, por exemplo, colectinas, a fragmentos de anticorpos (Tacken et al., (2004) J. Immunol., 172, 4934-4940).

O desenvolvimento de diacorpos ou mini anticorpos (BsAb) genericamente carecendo de funções efetoras de cadeia pesada também supera redundância de heterodímero. Estes compreendem anticorpos de cadeia simples mínimos incorporando sítios de ligação V_H e V_L (scFv) que subsequentemente dobram e dimerizam para formação de um anticorpo bi-específico divalente, monovalente para cada um de seus抗ígenos alvos (Holliger et al., (1993) PNAS, 90, 6444-6448; Muller et al., (1998) FEBS Lett., 422, 259-264). Em um exemplo, domínios constantes-L e C_{H1} foram usados como domínios de heterodimerização para formação de mini - anticorpo bi-específico

(Muller et al., (1998) FEBS Lett., 259-264). Uma variedade de processos recombinantes baseados em sistemas de expressão de *E. coli* foram desenvolvidos para a produção de BsAbs (Hudson, (1999) Curr. Opin. Immunol., 11, 548-557), embora possa parecer que o custo e escala de produção de material anticorpo multivalente grau clínico permanece o impedimento primário para desenvolvimento clínico (Segal et al., (2001) J. Immunol. Methods, 248, 1-6).

Recentemente, o conceito BsAb foi estendido para 10 abranger anticorpos bi-específicos tetravalentes, di-diacorpos, onde os domínios V_H e V_L sobre cadeia H e L foram substituídos por pares engenheirados de domínios de ligação scFv. Tais construções, embora complexas para engenheirar, podem ser montadas em células mamíferas em cultura na ausência 15 de redundância de heterodímero (Lu et al., (2003) J. Immunol. Methods, 279, 219-232).

A estrutura de imunoglobulinas é bem conhecida na técnica. Maioria de imunoglobulinas naturais compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cadeias pesadas estão 20 ligadas umas às outras via ligações dissulfeto entre domínios de articulação localizados aproximadamente no meio do caminho ao longo de cada cadeia pesada. Uma cadeia leve está associada com cada cadeia pesada sobre o lado terminal N do domínio de articulação. Cada cadeia leve está normalmente 25 ligada a sua respectiva cadeia pesada através de uma ligação dissulfeto próxima do domínio de articulação.

Quando uma molécula Ig é corretamente dobrada, cada cadeia dobra em um número de domínios globulares distin-

tos ligados por mais seqüências polipeptídeos lineares. Por exemplo, a cadeia leve dobra em um domínio variável (V_L) e um constante (C_L). Cadeias pesadas têm um domínio variável simples V_H , adjacente ao domínio variável da cadeia leve, um 5 primeiro domínio constante, um domínio de articulação, e ainda dois ou três domínios constantes. Interação dos domínios variáveis de cadeia pesada (V_H) e leve (V_L) resulta na formação de uma região de ligação de antígeno (Fv). Genericamente, ambos V_H e V_L são requeridos para ótima ligação de 10 antígeno, embora dímeros de cadeia pesada e fragmentos terminais amino tenham sido mostrados reterem atividade na ausência de cadeia leve (Jaton et al., (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195).

Com o advento de novas técnicas de biologia molecular, a presença de anticorpo somente cadeia pesada (destituído de cadeia leve) foi identificada em distúrbios proliferativos de célula-B no homem (Heavy Chain Disease) e em sistemas modelos murinos. Análises de doença de cadeia pesada no nível molecular mostraram que mutações e supressões no 15 nível do genoma podem resultar em expressão imprópria do domínio C_H1 de cadeia pesada, originando a expressão de anticorpo somente cadeia pesada carecendo de habilidade para ligar cadeia leve (ver Hendershot et al., (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 761-767; Brandt et al., (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 20 25 4, 1270-1277).

Estudos separados sobre domínios V_H humanos isolados derivados de bibliotecas de fago (Ward et al., (1989) *Nature*, 341, 544-546) demonstraram ligação específica de an-

tígeno de domínios V_H mas que estes domínios genericamente mas não sempre provaram ser de solubilidade relativamente baixa (ver Jespers et al. (2004) J. Mol. Biol. 337, 893-903).

5 Estudos usando outras espécies de vertebrados mostraram que camelídeos, como um resultado de mutações naturais de genes, produzem dímeros somente de cadeia pesada IgG2 e IgG3 funcionais que são incapazes de ligarem cadeia leve devido à ausência da região de ligação de cadeia leve
10 C_H1 (Hamers-Casterman et al., (1993) Nature, 363, 446-448) e que espécies tais como tubarão produz iuma família de proteínas de ligação semelhante a somente cadeia pesada, provavelmente relacionada ao receptor de célula-T mamífera ou cadeia leve de imunoglobulina (Stanfield et al., (2004) Science, 305, 1770-1773).

15 Uma característica do anticorpo somente cadeia pesada camelídeo é o domínio V_H camelídeo, que provê aperfeiçoada solubilidade e estabilidade em relação ao domínio V_H humano natural. Domínios V_H humanos podem ser engenheirados para aperfeiçoadas características de solubilidade (ver Davies and Riechmann, (1996) Protein Eng., 9(6), 531-537; Lutz and Muyldermans, (1999) J. Immuno. Methods. 231, 25-38) ou solubilidade pode ser adquirida por seleção natural in vivo (ver Tanha et al., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780;
20 Jespers L, Schon O, James LC, Veprintsev D, Winter G., J Mol Biol. 2004 Apr 2; 337(4):893-903). Entretanto, onde domínios de ligação V_H foram derivados de bibliotecas de fagos, afinidades intrínsecas para antígeno permanecem na faixa de mi-

cromolar baixa a nanomolar alta, à despeito da aplicação de estratégias de aperfeiçoamento de afinidade envolvendo, por exemplo, randomização de ponto quente de afinidade (Yau et al., (2005) *J. Immunol. Methods*, 297, 213-224).

scFvs têm limitações devido a inerente instabilidade e ineficiência de dobra quando produzidos e recuperados de células hospedeiras, ou quando produzidos como intracorpos em um ambiente intracelular redutor (ver der Maur et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 45075-45085). Em contraste domínios V_H , tipificados por V_{HH} camelídeo, mostra alta estabilidade termodinâmica em relação a fragmentos de anticorpos convencionais (Dumoulin et al., (2002) *Protein Science*, 11, 500-515) e retém estabilidade funcional mesmo na presença de tensoativos não-iônicos e aniônicos, e condições desnaturantes ásperas como uréia (Dolk et al., (2005) *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 442-450), importantes características para a recuperação de complexos de anticorpo funcionais em alto rendimento a partir de ambientes de fabricação duros, e a manutenção de integridade estrutural e funcional de produto *in vivo* e *in vitro*. Domínios de anticorpo V_H engenheirados ou camelisados também mostram o potencial para maior penetração de alvo de agentes infecciosos que maiores fragmentos de anticorpos convencionais (Stijlemans et al., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 1256-1261) e, quando usado como um "intracorpo", retém estabilidade funcional e estrutural intracelular, bloqueando a produção de retrovírus suíno por células PK15 em cultura (Dekker et al., (2003) *J. Virol.* 77, 12132-12139). Anticorpos V_H camelídeos também são

caracterizados por um laço CDR3 modificado. Este laço CDR3 é, em média, maior que aqueles encontrados em anticorpos não-camelídeos e é uma característica considerada ser uma maior influência sobre afinidade e especificidade de antígeno no total, que parece compensar a ausência de um domínio V_L nas espécies de anticorpos somente cadeia pesada camelídeos (Desmyter et al., (1996) Nat. Struct. Biol., 3, 803-811, Riechmann and Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28).

Recentemente, processo para a produção de anticorpos somente cadeia pesada em mamíferos transgênicos foi desenvolvido (ver WO02/085945 e WO02/085944). Anticorpo somente cadeia pesada funcional de potencialmente qualquer classe (IgM, IgG, IgD, IgA, ou IgE) e derivado de qualquer mamífero (incluindo homem) pode ser produzido a partir de mamíferos transgênicos (preferivelmente camundongos) como um resultado de desafio de antígeno.

Anticorpos monoclonais somente cadeia pesada podem ser recuperados de células B do baço através de tecnologia de clonagem padrão ou recuperados de ARNm de célula B através de tecnologia de mostra de fago (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544-546). Anticorpos somente cadeia pesada derivados de camelídeos ou animais transgênicos são de alta afinidade. Estudos estruturais baseados em anticorpos elevados em camundongos transgênicos como um resultado de desafio de antígeno mostram que diversidade de anticorpos V_H humanos camelisados é grandemente dirigida através de processos de maturação in vivo, com dependência sobre eventos de recombi-

nação VDJ e mutação somática. Entretanto, diferente do VHH camelídeo, o laço CDR3 está ausente de VH humano camelizado onde a região CDR3 é derivada de regiões D e J humanas (ver Janssen et al., (2006) PNAS 103(41):15130-5. Epub 2006 Oct 5 2* e PCT/GB2005/002892).

Uma característica importante e comum dos domínios V_H encontrados em anticorpos somente cadeia pesada, tais como anticorpos somente cadeia pesada V_{HH} camelídeos e anticorpos somente cadeia pesada V_H humanos camelizados, é que 10 cada região se liga a um monômero sem dependência sobre dimerização com uma região V_L para ótima solubilidade e afinidade de ligação. Estas características parecem particularmente apropriadas para a produção de agentes de bloqueio e agentes de penetração de tecido (para uma revisão ver, Hol- 15 liger, P. & Hudson, P.J. (2005) Nature Biotechnology 23, 1126-1136).

Entretanto, os benefícios de domínios V_H encontrados em anticorpos somente cadeia pesada ainda têm de ser usados para vantagem em desenho de proteínas multiméricas como reagentes, terapêuticos e diagnósticos, embora dois domínios V_H presos por uma região de articulação de anticorpo natural tenham sido mostrados reterem características ligan-tes dentro de construções bi-específicas ou bivalentes (Con- 20 rath et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7346-7352).

A incorporação de múltiplos domínios de ligação em combinação com um domínio de dimerização tem clara vantagem sobre abordagens paralelas usando scFvs que têm de ser engenheirados a partir de domínios V_H e V_L com o potencial asso- 25

ciado de perda de especificidade e avidez, o aumentado risco de antigenicidade devido à presença de peptídeos ligadores, e inerente falta de estabilidade em relação a domínios de ligação V_H. Domínios de ligação V_H derivados de famílias de genes relacionados a anticorpo tais como receptores de célula-T ou a família de imunoglobulina de tubarão também provêm alternativas para scFv para a geração de moléculas ligantes bi- ou multi-específicas.

A presença de domínios constantes C_H2 e C_H3 de cadeia pesada provê as bases para a dimerização estável vista em anticorpos naturais, e provê sítios de reconhecimento para glicosilação pós-traducional em adição a funções efetoras de cadeia pesada. Domínios de dimerização C_H2-C_H3 têm sido usados no desenho de homodímeros monoespecíficos tetraméricos ou homodímeros bi-específicos bivalentes carreando domínios de ligação scFv em seus termini amino e carboxila (ver Jendreyko et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819) ou combinações de domínios de ligação scFv e proteínas de ligação de receptor (Biburger et al. (2005) J. Mol. Biol. 346, 1299-1311). Domínios C_H2-C_H3 também têm sido usados para construção de homodímeros bi-específicos bivalentes usando-domínios V_{HH} llama e V_H camelizado encontrados em anticorpos somente cadeia pesada (PCT/GB2005/002892).

Permanece uma necessidade na técnica de aperfeiçoamento sobre tecnologia scFv disponível e provimento de complexos de ligação de polipeptídeo mono - valente, bi - valente ou multi - valente específicos de antígeno, solúveis e estruturalmente estáveis. Domínios de dimerização podem com-

preender domínios de dimerização C_H2-C_H3 de imunoglobulina engenheirada ou natural carecendo de função efetora de cadeia pesada, por exemplo, C_H2-C_H3 derivado de IgG4 (ver, Bruggemann, M. et al., J. Ex. Med. (1987) 166, 1351-1361).

5 Preferivelmente domínios de dimerização outros que não C_H2-C_H3 são incorporados. Preferivelmente, o resultante complexo de ligação polipeptídeo é de menos que 120 kDa em peso molecular de modo a maximizar penetração de tecido quando administrado in vivo.

10 Breve Resumo da Invenção

A presente invenção provê um processo para uso de domínios ligantes VH (como aqui definido) sozinhos ou em combinação com outros domínios ligantes, mas excluindo scFVs, para produção de um complexo ligante polipeptídeo.

15 De acordo com a invenção é provido um complexo de ligação polipeptídeo compreendendo um dímero de uma primeira cadeia pesada e uma segunda cadeia pesada, onde cada cadeia pesada compreende um domínio de ligação VH terminal amino (como aqui definido); um domínio de ligação VH terminal carboxi (como aqui definido); e um domínio de dimerização preferivelmente carecendo de funcionalidade de dimerização C_H2-C_H3.

20 O termo "domínio de ligação VH" como aqui usado inclui domínios de ligação VH naturais, por exemplo como expresso por um locus de cadeia pesada sozinho como um resultado de recombinação entre segmentos de genes V, D e J simples seguida subseqüentemente por mutação somática. O termo "domínio de ligação VH" abrange qualquer domínio de ligação

de antígeno ocorrendo naturalmente derivado de um vertebrado, incluindo tubarão, camelídeo e humano. Onde o domínio de ligação VH é tomado de um camelídeo ou outro anticorpo somente cadeia pesada natural, ele é referido como um domínio 5 V_{HH} . Onde o domínio VH é tomado ou derivado de um anticorpo outro que não um anticorpo somente cadeia pesada, ele é referido como um domínio V_H . "Domínio de ligação VH" inclui domínios V_H ou V_{HH} que foram alterados através de seleção ou engenharia para alterar suas características. Por exemplo, 10 estabilidade sob certas condições ou solubilidade podem ter sido alteradas. O domínio VH também pode ter sido alterado através de seleção ou engenharia para parecer mais de perto a um domínio V_H ou V_{HH} de uma outra espécie. Por exemplo, uma região V de um domínio V_H humano foi alterada para parecer 15 mais de perto a uma região V encontrada em um domínio V_{HH} camelídeo. O termo "domínio de ligação VH" também inclui homólogos, derivados ou fragmentos de proteínas, que são capazes de funcionarem como um domínio VH, por exemplo, um domínio de ligação VL. Todas tais realizações são incluídas na 20 invenção.

Alternativamente, o complexo de ligação polipeptídeo pode compreender um dímero de uma primeira cadeia pesada e uma segunda cadeia pesada, onde cada cadeia pesada compreende um ou mais domínios de ligação de VH terminal amino adicionais em tandem e separados por um domínio de articulação; e um ou mais domínios de ligação VH terminal carboxi adicionais em tandem e separados por um domínio de articulação.

Para aplicações terapêuticas, o domínio de dimerização é preferivelmente de origem humana, e pode, dependendo da aplicação, compreender sítios de glicosilação naturais ou engenheirados para aperfeiçoar estabilidade de plasma ou alternativamente pode carecer de todos os sítios de modificação pós-traducional para aperfeiçoar depuração de plasma ou para reduzir mascaramento de modo a aperfeiçoar reconhecimento de alvo e ligação. Onde critérios de performance in vivo, tal como penetração de tecido ou depuração de plasma, são requeridos, o tamanho do complexo de ligação polipeptídeo total preferivelmente não deve ser maior que 120 kDa.

Onde o complexo de ligação de polipeptídeo comprendendo domínios de ligação VH é para ser usado como um intracorpo (ver Dekker et al. (2003) J. Virol. 77, 12132-12139), características de sinalização intracelular, adicionais podem ser incorporadas para determinar, por exemplo, localização intranuclear ou em membrana (ver, por exemplo, Jendreyo et al., (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819). Para propósitos de fabricação, peptídeos sinais também podem ser incorporados em vetores nos termini amino de complexos de ligação de polipeptídeo de modo a facilitar síntese e secreção do complexo polipeptídeo montado a partir de células de produção de escolha (por exemplo, células de levedura, inseto ou mamíferas). O domínio de dimerização pode compreender um homodímero ou um heterodímero.

Em uma realização, o domínio de dimerização da primeira cadeia pesada é diferente daquele da segunda cadeia pesada, de modo que o complexo de ligação de polipeptídeo é

um heterodímero compreendendo diferentes polipeptídeos (heterodímeros). Em uma realização alternativa, o domínio de dimerização da primeira cadeia pesada é o mesmo como aquele da segunda cadeia pesada, de modo que o complexo de ligação 5 polipeptídeo é um homodímero compreendendo dois polipeptídeos idênticos (homodímeros). Os domínios VH da invenção podem mostrar a mesma especificidade ou eles podem mostrar diferente especificidade. Onde o complexo de ligação de polipeptídeo compreende quatro domínios VH, estes podem ser mono 10 - específicos tetravalentes, bi - específicos bivalentes, tri - específicos ou tetra - específicos. Onde existem mais que quatro domínios VH, então complexos de ligação polipeptídeo são imaginados os quais mostram maiores níveis crescentes de especificidade em linha com o número de adicionais 15 domínios VH. Por exemplo, um complexo polipeptídeo com oito domínios VH pode mostrar octa - especificidade.

Onde rápida depuração ou aperfeiçoada penetração de tecido é requerida, então preferivelmente, o complexo de ligação polipeptídeo é de menos que 120 kDa em tamanho. Em 20 uma realização alternativa, um ou mais, mas nem todos os domínios VH podem estar substituídos com uma classe alternativa de domínio de ligação de polipeptídeo. Preferivelmente, o domínio de ligação alternativo é uma citocina, um fator de crescimento, um antagonista ou agonista de receptor ou um 25 ligante.

Preferivelmente, o domínio de dimerização e/ou os domínios de ligação de terminal amino ou carboxi de uma ou ambas cadeias pesadas são separados por um domínio de arti-

culação flexível.

A invenção também provê um ácido nucléico isolado codificando a primeira cadeia pesada, segunda cadeia pesada ou ambas cadeias pesadas da invenção. A invenção também provê 5 um vetor compreendendo o ácido nucléico isolado. A invenção ainda provê uma célula transformada com o vetor.

Em uma outra realização, a invenção provê um processo para a produção do complexo de ligação de polipeptídeo da invenção, compreendendo cultura de uma célula hospedeira transformada com um vetor compreendendo um ácido nucléico codificando uma primeira cadeia pesada, segunda cadeia pesada ou ambas cadeias pesadas.

Os domínios de ligação VH, domínios de dimerização ou polipeptídeos ligadores da invenção podem ser produzidos 15 através de uma rota sintética, tal como química de peptídeo ou conjugação química. O complexo de ligação polipeptídeo pode ser pegilado para aperfeiçoar estabilidade in vivo. A invenção também provê uma composição farmacêutica compreendendo um complexo de ligação polipeptídeo de acordo com a 20 invenção. A invenção também provê um processo de tratamento de um paciente através de administração de uma composição farmacêutica ou um vetor da invenção a um paciente.

A invenção também provê o uso de um complexo de ligação polipeptídeo de acordo com a invenção na preparação 25 de um medicamento para profilaxia ou tratamento de doença. A invenção também provê uso de um complexo de ligação polipeptídeo da invenção como um diagnóstico, um reagente, uma ab- zima, um agente inibidor, um reagente citoquímico, um agente

de formação de imagem ou um intracorpo.

Um complexo de ligação polipeptídeo compreende um domínio de dimerização configurado com domínios de ligação VH em ambos termini amino e carboxila da molécula. Opcionalmente o domínio de dimerização e o domínio de ligação VH são separados por um ligador polipeptídeo flexível. Configurações preferidas compreendem complexos de ligação VH polipeptídeo mono-específicos tetravalentes e complexos de ligação VH polipeptídeo bi-específicos bivalentes (ver Figs 1 a 5).

O domínio de ligação VH pode ser derivado de qualquer vertebrado embora seja preferivelmente de origem humana. Tais domínios de ligação VH podem ser derivados de fontes naturais como camelídeo, animais transgênicos ou tubarão ou selecionados de arranjos de biblioteca sintética tais como bibliotecas de mostra de VH de levedura ou fago. Domínios de ligação VH podem ser engenheirados para aperfeiçoamento de características físicas como solubilidade e estabilidade, ou humanizados para evitar ou reduzir antigenicidade. A definição de VH abrange qualquer domínio de ligação de polipeptídeo natural derivado de cadeia pesada de imunoglobulina, cadeia leve de imunoglobulina, receptor de célula-T ou molécula similar, mas exclui moléculas scFv engenheiradas onde o sítio de ligação é engenheirado a partir de domínios V_H e V_L de um anticorpo tetramérico (H₂L₂).

O domínio de dimerização compreende um homodímero ou heterodímero derivado de uma fonte natural, preferivelmente humana, que é estável sob condições fisiológicas. O domínio de dimerização pode naturalmente incorporar adição

de funções efetoras ou pode ser engenheirado para incorporar adicionais funções efetoras. Estes podem incluir mas não são limitados a sítios para modificações pós-traducionais (fosforilação e glicosilação), sítios para pegilação, enzimicos, 5 citotóxicos, e formação de imagem, estimulador imune e funções de ligação de receptor.

A presente invenção também provê um vetor(es) compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificando o complexo de ligação polipeptídeo VH e domínio de di-merização da invenção e uma célula hospedeira transformada com um tal vetor(es).

É também provido o uso de um complexo de ligação polipeptídeo da invenção, na preparação de um medicamento. Os complexos de ligação de polipeptídeo da invenção também 15 podem ser usados como agentes de formação de imagem, diagnósticos, reagentes, abzimas ou agentes inibidores. É também provida uma composição farmacêutica compreendendo o complexo de ligação de polipeptídeo de acordo com a invenção, e um carreador farmacologicamente apropriado. O complexo de 20 ligação polipeptídeo da invenção também pode ser usado como um intracorpo se liberado para a célula alvo como um vetor capaz de direcionar a síntese intracelular do complexo de ligação polipeptídeo na célula alvo, ou liberado como um complexo protéico para tomada celular e subsequente função 25 intracelular dentro de célula alvo.

Descrição Detalhada da Invenção

Os presentes inventores previamente mostraram (ver WO 02/085945, WO 02/085944 e PCT/GB2005/002892) que animais

transgênicos, em particular camundongos, podem ser gerados usando "micro loci" para produzir anticorpos somente cadeia pesada VH específicos - classe, ou uma mistura de diferentes classes de anticorpos somente cadeia pesada VH que são secretados por plasma ou células B em resposta a desafio de antígeno. Estes então podem ser usados tanto para gerar um suprimento confiável de anticorpo somente cadeia pesada, específico - classe usando tecnologia de hibridoma estabelecida ou como uma fonte de domínios de ligação V_{HH} camelídeo funcionais ou domínios de ligação somente cadeia pesada V_H , solúveis, de origem humana. Similarmente domínios de ligação VH da requerida especificidade podem ser obtidos de bibliotecas de mostra construídas similarmente ou de levedura, fago.

Domínios VH funcionais podem ser clonados e expressos em sistemas bacteriais para geração de domínios de ligação VH com retenção de ligação, especificidade e afinidade de antígeno. Além disso, domínios de ligação VH retêm funcionalidade se presentes no terminus amino ou carboxila de um domínio de dimerização. Estas características têm sido usadas para construção de moléculas de ligação VH de homodímero bi-específicas bi-valentes usando a região de dimerização C_H2-C_H3 de cadeia pesada de imunoglobulina como um domínio de homo dimerização (ver PCT/GB2005/002892).

Tomadas juntas, estas observações têm importantes implicações para a engenharia aperfeiçoada e simplificada de anticorpos através de uso de domínios VH solúveis, funcio-

nalmente estáveis. Complexos de ligação VH mono - específicos tetra - valentes, ou complexos de ligação VH bi - específicos bi - valentes podem ser montados usando domínios de homo- ou hetero - dimerização e podem ser expressos e montados usando células em cultura (por exemplo, células bacterianas, levedura, inseto, planta, ou mamíferas) ou através de organismos transgênicos (por exemplo, mamífero, inseto, planta, etc.) sem a necessidade de extensiva engenharia anterior do domínio de ligação (scFv), a necessidade de reticulação química ou a necessidade de separar o produto de misturas heterólogas de domínios de ligação desemparelhados.

Domínios VH são pequenos (aproximadamente 15 kDa) em relação a domínios de ligação scFv (28 kDa) ou Fab (55 kDa). Diferencial de tamanho e a presença ou de outro modo de função efetora de cadeia pesada tem efeito marcado sobre as fármaco - cinéticas e biodistribuição de complexos de proteína in vivo. Assim complexos de ligação polipeptídeo solúveis pequenos, que mostram rápida penetração em tecido e alta retenção em alvo, carecem de algumas ou todas as funções efetoras e são rapidamente depurados da corrente sanguínea são superiores em algumas circunstâncias clínicas a moléculas IgG grandes com pobre penetração de tecido, associadas com funções efetoras, e longas meias-vidas em soro (ver Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) *Nature Biotechnology*, 23, 1126-1136 para revisão extensiva). O uso de domínios de dimerização C_H2-C_H3 mais naturais adiciona função efetora de cadeia pesada a complexos de ligação de polipeptídeo VH. O uso de um domínio C_H2-C_H3 derivado de IgG4 ou

domínios de homo- ou hetero - dimerização alternativos permite restrições de tamanho serem engenheiradas em uma maneira controlada na ausência de função efetora de cadeia pesada, mas com a incorporação de adicionais características funcionais desejadas como requerido.

A auto associação de proteínas para formar dímeros e oligômeros de maior ordem através de tipos distintos de interface proteína - proteína requerendo interações não-covalentes facilita muitas funções biológicas (Ofran, Y. & Rost, B. (2003) *J. Mol. Biol.* 325, 377-387). Especifica dimerização de proteína é integral para função biológica, estrutura e controle (ver Marianayagam et al. (2004) *TIBS*, 29, 618-625). Zípers leucina representam um motivo estrutural bem caracterizado capaz de formar homo- e hetero-dímeros (Landschulz et al., (1988) *Science*, 240, 1759-1764). Domínio de cadeia pesada C_H1 e domínio constante de cadeia leve formam heterodímeros estáveis. Os termini carboxila de certas proteínas transcricionais eucarióticas, como a proteína de ligação TATA, foram homodímeros estáveis (Coleman et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13842-13860). Numerosos outros domínios de dimerização foram identificados e caracterizados (ver Brown, J.H. (2006) *Protein Science* 15, 1-13). Alguns, mas não todos, são apropriados para o desenvolvimento de complexos de ligação polipeptídeo. Domínios de dimerização preferidos são de origem humana, preferivelmente produzidos em tecidos especializados de modo que eles são improváveis de estarem presentes como contaminantes homólogos durante fabricação em diversos sistemas de produção de proteína. Al-

ternativamente, o domínio de dimerização quando presente na proteína natural deve ter uma localização nuclear ou cito-plasmica de modo que proteína endógena pode ser segregada de um produto proteína de ligação polipeptídeo dimerizada destinada para secreção via o caminho secretório usando processos de ligação de membrana intracelular natural. Preferivelmente associação / dissociação do dímero polipeptídeo não é dependente de fosforilação.

Complexos de ligação de polipeptídeo VH, especialmente aqueles de origem humana, têm aplicações de ampla variação no campo de cuidados de saúde como medicamentos, agentes de formação de imagem, diagnósticos, abzimas e reagentes, com paralelas aplicações agrícolas, ambientais e industriais.

Anticorpos somente cadeia pesada e seus fragmentos

O domínio de ligação VH específico de antígeno da invenção pode ser clonado de, por exemplo, ARNm isolado de uma célula produzindo anticorpo de um animal transgênico imunizado como descrito acima. Seqüências de domínio de ligação VH clonadas também podem ser isoladas de arranjos de fagos (Ward et al., (1989) *Nature*, 341, 544-546) ou bibliotecas de arranjo similares, por exemplo, usando sistemas baseados em levedura (Boder and Wittrup, (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-7). Domínios de ligação VH específicos de antígeno então podem ser fabricados tanto sozinhos ou como proteínas de fusão em sistemas de expressão alternativos ou de levedura, bacterianos, escaláveis. Seqüências codificando domínios de ligação VH também podem ser clonadas a partir de

hibridomas caracterizados derivados através de procedimentos clássicos a partir de camundongos transgênicos imunizados. Estes então podem ser usados para a produção de domínios de ligação VH específicos de antígeno e seus derivados.

5 Alternativamente, fragmentos contendo domínio VH podem ser gerados de cadeias pesadas imunoglobulina isoladas, anticorpos somente cadeia pesada derivados de animais transgênicos ou fontes naturais (tubarões e camelídeos) usando tecnologia de clivagem química ou enzimática e subsequente separação do fragmento contendo domínio VH dos outros 10 produtos de clivagem (Jaton et al., (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195).

Onde o domínio de ligação VH é isolado de um hibridoma caracterizado, a seqüência de domínio de ligação VH 15 derivada de ARNm pode ser diretamente克lonada em um vetor de expressão sem recorrer a adicionais etapas de seleção necessárias usando fago e outros sistemas de mostra para caracterizar e otimizar a afinidade do domínio de ligação VH selecionado.

20 Sistemas de produção para domínios de ligação VH incorporando regiões efetoras e de dimerização de cadeia pesada incluem células mamíferas em cultura (por exemplo, hibridomas de célula-B, células CHO), plantas (por exemplo, milho), cabras, coelhos, gado, carneiro, e galinhas transgênicas 25 e larvas de insetos apropriadas para tecnologia de rearing mass. Outros sistemas de produção, incluindo infecção com vírus (por exemplo, baculovírus em larvas de insetos e linhas de células), são alternativas para cultura de células

e abordagens de linha germe. Outros processos de produção também serão familiares para aqueles versados na técnica. Processos apropriados para a produção de anticorpo somente cadeia pesada camelídeo ou domínios de ligação VH sozinhos 5 são conhecidos na técnica. Por exemplo, domínios de ligação VH camelídeos foram produzidos em sistemas bacterianos e homodímeros somente cadeia pesada camelídeos foram produzidos em hibridomas e células mamíferas transfetadas (ver Reichmann and Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-10 38).

Processos também são bem estabelecidos para a expressão de domínios de ligação V_H humanos engenheirados derivados usando tecnologia de mostra de fago (Tantha et al., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780 e referências ali).

15 Larvas de insetos de linhas de moscas transgênicas foram mostradas produzirem fragmentos de anticorpos somente cadeia pesada funcionais com características não distingíveis do mesmo anticorpo produzido por células mamíferas (PCT/GB2003/0003319).

20 A presente invenção também provê um vetor(es) compreendendo uma proteína de ligação de polipeptídeo, ou seu fragmento, codificando domínios de ligação de VH e o domínio(s) de dimerização de acordo com a presente invenção.

A presente invenção também provê uma célula hospedeira transformada com vetores de acordo com a presente invenção.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um complexo de ligação polipeptídeo compreendendo um domínio

de ligação VH específico de antígeno fundido nas extremidades terminais carboxila e amino de um domínio de dimerização carecendo de função(ões) efetora de cadeia pesada C_H2-C_H3. Estes complexos de ligação de polipeptídeo retêm a função 5 fisiológica conferida pelo domínio(s) de ligação VH específico de antígeno em combinação com adicionais funções de alvejamento ou efetoras naturalmente presentes ou engenheiradas no domínio de dimerização. Tais complexos de ligação de polipeptídeo podem estar na forma de complexos de ligação 10 tetraméricos mono - específicos, complexos de ligação bi - específicos bivalentes, ou complexos de ligação tetra - específicos. Domínios de ligação VH estão presentes nos termini 15 amino e carboxi da molécula de ligação (ver Figura 1 por exemplo). Domínios de dimerização podem ser homodímeros ou heterodímeros dependente do desenho requerido do complexo de ligação polipeptídeo funcional final.

As vantagens deste arranjo são múltiplas. A presença de dois ou mais domínios VH atuando em uma maneira cooperativa provê uma molécula ligante de maior afinidade e avidez que um VH 20 simples sozinho. Não somente o produto VH tetramérico (por exemplo, um medicamento) terá maior potencial potência que a forma VH monomérica ou dimérica, um complexo de ligação polipeptídeo mono - específico tetravalente montado como um homodímero proteína pode ser produzido a partir de uma seqüência de gene clonado simples como um produto simples livre de seqüências de ligação contaminantes desemparelhadas. Um complexo de ligação polipeptídeo bi - específico bivalente pode facilitar reticulação de diferentes alvos enquanto 25

retendo o efeito cooperativo benéfico de dois domínios de ligação VH para cada antígeno. Por exemplo, um complexo polipeptídeo bi - específico pode ser utilizado para aperfeiçoar interações célula - célula ou interações célula / patógeno. Nesta realização, os complexos polipeptídeos da invenção podem ser utilizados, por exemplo, para ponte entre dois tipos de células tal como um eritrócito e um patógeno (ver Taylor et al., (1991) PNAS 88, 3305-3309). Bifuncionalidade pode ser usada para simultaneamente inibir dois componentes de um caminho de enzima (Jendreyko et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819).

Bifuncionalidade pode ser usada para colocar uma metade efetora em proximidade com uma célula alvo. Preferivelmente, o domínio de ligação VH na extremidade terminal amino de cada domínio é idêntico e aqueles na extremidade terminal carboxila são idênticos (mas reconhecem um diferente antígeno ou epítopo para aquele na extremidade terminal amino), facilitando ligação cooperativa de pares de domínios de ligação VH.

O termo 'metade efetora' como aqui usado inclui qualquer metade que media um desejado efeito biológico sobre uma célula. A metade efetora é preferivelmente solúvel e pode ser um peptídeo, polipeptídeo ou proteína ou pode ser uma estrutura não-peptídica. Por exemplo, a metade efetora pode ser uma enzima, hormônio, citocina, droga, pró-droga, toxina, em particular uma toxina proteína, um radionuclido em uma estrutura quelante, um agente de formação de imagem, albumina ou um agente inibidor. A metade efetora pode ser uma

célula, por exemplo, uma célula T, um peptídeo, polipeptídeo ou proteína ou pode ser uma estrutura não-peptídica. A metade efetora associada com o domínio de ligação VH pode ser celular, protéica, orgânica ou inorgânica em natureza, dependendo do efeito desejado.

Albumina, imunoglobulinas ou outras proteínas de soro podem ser utilizadas como uma metade efetora para aumentar a estabilidade ou propriedades fármaco - cinéticas e/ou fármaco - dinâmicas do domínio de ligação VH específico de antígeno (Sung et al., (2003) J. Interferon Cytokine Res., 23 (1):25-36; Harmsen et al. (2005) Vaccine, 23(41) 4926-4934). Alternativamente, a metade efetora pode ser uma estrutura PEGilada ou uma estrutura glicosilada naturalmente de modo a aperfeiçoar propriedades fármaco - dinâmicas.

15 Domínios de Dimerização de Polipeptídeo

Os presentes inventores também reconheceram que as propriedades de qualquer complexo de ligação polipeptídeo não são justo dependentes dos domínios de ligação VH incorporados no complexo de ligação polipeptídeo final. O tamanho do complexo total tem significante influência sobre as fármaco - cinéticas do complexo in vivo e a facilidade de fabricação. Além disso, o domínio de dimerização, dependente do desenho do complexo de ligação de polipeptídeo, pode compreender adicional atividade efetora. Como tal, em um segundo aspecto da invenção, o complexo polipeptídeo compreende um domínio de dimerização que é limitado em tamanho de modo a beneficiar penetração de tecido. O segundo aspecto da presente invenção provê um domínio de dimerização, onde o domí-

nio de dimerização pode compreender um homodímero, ou um heterodímero. Preferivelmente, a dimerização é através de interações não-covalentes.

Domínios de dimerização são ligados covalentemente
5 a domínios de ligação VH nos termini amino e carboxila de domínio de dimerização.

Opcionalmente, o complexo de ligação polipeptídeo inclui domínios semelhantes a articulação flexíveis naturais ou engenheirados ligando os domínios de ligação VH e o domínio de dimerização. A presença de regiões de articulação facilita a função independente dos domínios de ligação VH no resultante complexo de ligação de polipeptídeo.
10

Opcionalmente, o domínio de dimerização pode compreender outras funções úteis, ou pode ser engenheirado para
15 incorporar adicionais características tais como seqüências de reconhecimento para glicosilação, pegilação, ligação de receptor de superfície de célula, ou rótulos para anticorpo ou reconhecimento de proteína ligante. Domínios de dimerização podem ser engenheirados para otimizar associação através
20 de introdução ou eliminação por exemplo de adicionais resíduos cisteína.

Pequenos domínios de dimerização como zíperes leucina podem estar presentes como monômeros ou pares tandem para aperfeiçoar estabilidade. Adicionais domínios VH podem
25 ser usados para ligar domínios de dimerização tandem.

Preferivelmente, o domínio de dimerização tem um tamanho não maior que 60 kDa e o tamanho do complexo de ligação de polipeptídeo é aproximadamente 120 kDa de modo a

aperfeiçoar penetração de tecido.

Domínios de dimerização preferidos compreendem domínios pequenos de proteínas naturais (humanas). Estas incluem os pequenos motivos zíperes leucina de 30 aminoácidos presentes em muitas proteínas reguladoras de gene (Landschulz et al. (1988) *Science*, 240, 1759-1764). Esta abordagem foi previamente usada para a produção de heterodímeros F(ab')₂ bis-específicos (Kostelny et al., (1992) *J. Immunology* 148, 1547-1553). Zíperes podem ser engenheirados para aumentar a especificidades de um dado evento de heterodimerização (Loriaux et al., (1993) *PNAS* 90, 9046-9050).

Um domínio de dimerização de acordo com o primeiro e segundo aspectos da invenção pode ser qualquer proteína, fragmento de peptídeo ou seqüência consenso capaz de formar uma interação homo ou heterodímero proteína - proteína, tal como aquela vista entre região C_H2-C_H3 das regiões constantes de cadeia pesada de imunoglobulina, o domínio C_H1 de uma cadeia pesada de imunoglobulina e a região constante de uma cadeia leve de imunoglobulina, ou a homodimerização do domínio terminal carboxila de 180 aminoácidos da proteína de ligação TATA (Coleman et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13842-13849); VCAM e VLA-4; integrinas e proteínas de matriz extracelular; integrinas e moléculas de superfície de célula como CD54 ou CD102; domínios de heterodimerização de zíper leucina; glutationa transferases; e domínios SRCR provêm exemplos alternativos.

Complexos de ligação polipeptídeos exemplares de acordo com o primeiro e segundo aspectos da invenção são ú-

teis para marcação citoquímica, processos de alvejamento ou terapia. Por exemplo:

1. Se um domínio de ligação VH específico de antígeno terminal aminoalveja um marcador de superfície de célula de câncer, o VH terminal carboxila pode ligar uma metade efetora compreendendo uma enzima de conversão de pró-droga. O domínio de ligação VH específico de antígeno terminal amino liga-se ao alvo e o VH terminal carboxila coloca a metade efetora em proximidade com o alvo de modo que a metade efetora pode exercer um efeito biológico sobre o alvo na presença da pró-droga (por exemplo, nitro redutase ou DT diaforase com CB1954);

2. Se os domínios de ligação VH terminal amino e carboxila alvejam uma citocina (por exemplo, TNF α), todos os quatro domínios de ligação atuando cooperativamente atuarão com maior avidez e afinidade que um monômero ou dímero VH sozinho. Alternativamente os domínios de ligação VH terminal amino podem ligar uma citocina e os domínios carboxila albumina de soro de modo a aperfeiçoar a meia-vida em soro do complexo ativo.

O termo 'domínio de ligação' como aqui usado com relação a todos os aspectos acima da presente invenção inclui qualquer domínio de ligação de polipeptídeo que tenha atividade efetora em um meio fisiológico. Um tal domínio de ligação de polipeptídeo também tem de ter a habilidade para ligar-se a um alvo sob condições fisiológicas.

Um domínio de ligação VH pode compreender um domínio VH camelídeo ou pode compreender um domínio VH obtido de

um não-camelídeo. Preferivelmente, o domínio de ligação VH é um domínio de ligação VH humano. Domínios de ligação VH são preferivelmente de origem de célula B, derivada de animais transgênicos ou camelídeos (como descrito acima) como oposto a domínios VH derivados de bibliotecas de fagos sintéticos, desde que o anterior será de maior afinidade devido sua geração em resposta a desafio de antígeno *in vivo* via rearranjo VDJ e mutação somática.

De acordo com o terceiro aspecto da invenção algumas ou todos os domínios de ligação VH podem ser substituídos por domínios de ligação de proteína alternativos. Preferivelmente substituição ocorre nos termini amino ou carboxila mas não ambos.

Tais domínios de ligação incluem domínios que podem mediar ligação ou adesão a uma superfície de célula. Domínios apropriados que podem ser usados nos complexos polipeptídeos da invenção são moléculas mamíferas, procarióticas e de adesão de célula viral, citocinas, fatores de crescimento, antagonistas ou agonistas de receptores, ligantes, receptores de superfície de célula, fatores reguladores, proteínas estruturais e peptídeos, proteínas de soro, proteínas secretadas, proteínas associadas plasmalemma, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos protozoários, antígenos parasíticos, lipoproteínas, glicoproteínas, hormônios, neurotransmissores, fatores coagulantes e semelhantes, mas excluindo Fvs de cadeia simples engenheirada.

Seqüências de polinucleotídeos, vetores e células hospedeiras

A presente invenção também provê uma seqüência de polinucleotídeos codificando qualquer um dos complexos de ligação polipeptídeo da presente invenção, um vetor compreendendo uma ou mais das seqüências de polinucleotídeos referidas acima e uma célula hospedeira transformada com um vetor ou vetores codificando o complexo de ligação de polipeptídeo da presente invenção. Os polinucleotídeos preferivelmente incluem seqüências que permitem o complexo de ligação de polipeptídeo expresso ser secretado como homo ou heterodímeros no meio no qual a célula hospedeira está crescendo.

10 A célula hospedeira pode incluir mas não é limitada a células hospedeiras bacterianas e de levedura, inseto, planta e mamíferas.

Além disso, a presente invenção provê um organismo transgênico expressando pelo menos um complexo de ligação polipeptídeo homo- ou hetero-dímero da presente invenção. O organismo transgênico pode ser um vertebrado não-humano ou mamífero, uma planta ou um inseto.

A produção de complexos de ligação de polipeptídeo para aplicações de cuidados de saúde requer sistemas de fabricação de grande escala, exemplos dos quais são discutidos em detalhes acima. Tais sistemas incluem plantas (por exemplo, milho), gado e ovelhas transgênicos, e galinhas, também larvas de insetos apropriadas para tecnologia de massa rearing. Outros sistemas de produção, incluindo infecção com vírus (por exemplo, baculovírus em larvas de insetos e linhas de células) como uma alternativa para cultura de célula e abordagens de linha germe também serão familiares para a-

queles versados na técnica.

Estes processos e outros processos apropriados conhecidos na técnica, podem ser usados para a produção dos complexos de ligação de polipeptídeo da invenção. Produção 5 de homodímeros e/ou heterodímeros pode ser obtida usando estes processos.

Usos de Complexos de Ligação de Polipeptídeo da Invenção

Complexos de ligação de polipeptídeo da invenção 10 têm um grande número de aplicações. Por exemplo, os complexos de ligação de polipeptídeo da invenção compreendem complexos de polipeptídeo mono- bi- e multi - específicos. Estes complexos são particularmente vantajosos, por exemplo, como terapêuticos para o tratamento, prevenção e diagnóstico 15 de doenças. Os complexos de ligação polipeptídeo da invenção são úteis para marcação citoquímica, processos de alvejamento, terapia e diagnósticos.

Em terapia de mono-anticorpo, escape de patógeno, por exemplo, devido a uma mutação conduzindo a perda de um 20 sítio de ligação simples, abolirá o efeito terapêutico do anticorpo. A produção de complexos de ligação de polipeptídeo bi-específicos bivalentes reconhecendo diferentes抗ígenos sobre o mesmo patógeno pode superar este problema. O uso de dois domínios de ligação VH tendo diferentes especificidades nos complexos de ligação de polipeptídeo da invenção também pode ser utilizado para aperfeiçoar ambas interações célula - célula e interações célula / patógeno.

Nesta realização, os complexos de polipeptídeo da

invenção podem ser utilizados, por exemplo, para ponte de complexos de polipeptídeos entre dois tipos de células tais como um patógeno e um macrófago, ou uma célula de tumor e uma célula T. Alternativamente o complexo de polipeptídeo 5 pode reconhecer dois ou três epítopos sobre o mesmo patógeno com função efetora sendo provida por domínio de reconhecimento de receptor dentro ou inserido entre o domínio de dimerização e a seqüência de articulação.

Alternativamente, complexos de ligação de polipeptídeo bi-específicos podem ser usados para alvejar células e tecidos in vivo, então subseqüentemente para capturar moléculas efetoras circulantes ou agentes de formação de imagem. Por exemplo, agentes de alvejamento de tumor bi-específicos podem ser usados para capturar complexos de conversão de pró-droga para a subseqüente conversão localizada de pró-droga para agente reativo. Complexos de ligação bi- e multi-espécíficos em combinação com agentes efetores também podem ser usados para ligar e destruir um ou mais patógenos dependente da seleção de domínios de ligação. Alternativamente, a presença de dois ou mais domínios de ligação que reconhecem diferentes抗igenos sobre o mesmo patógeno provê vantagens clínicas e reduz a probabilidade de escape de patógeno e redundância de droga como um resultado de mutação dentro de patógeno.

O primeiro aspecto da presente invenção provê domínios de ligação VH ou seus fragmentos e domínios de dimerização incluindo domínios de dimerização C_H2-C_H3 naturais ou engenheirados carecendo de algumas ou todas as funções

efetoras de cadeia pesada. De acordo com o segundo aspecto da invenção complexos de ligação de polipeptídeos não são maiores que 120 kDa em tamanho de modo a aperfeiçoar penetração de tecido do complexo de ligação de polipeptídeo. De 5 acordo com o terceiro aspecto da invenção domínios de ligação VH terminal amino ou carboxila podem ser substituídos com domínios de ligação alternativos exceto scFv. Complexos de ligação de polipeptídeo compreendendo seqüências predominantemente humanas são apropriados para uso farmacêutico em 10 humanos, e assim a invenção provê uma composição farmacêutica do complexo de ligação de polipeptídeo compreendendo domínios de ligação VH ligados a um domínio de dimerização através de uma região articulada opcional nos termini amino e carboxila. A invenção também provê o uso de um complexo de 15 ligação de polipeptídeo da presente invenção na preparação de um medicamento para a profilaxia e/ou tratamento de doença. Onde apropriado complexos de ligação de polipeptídeo e metades efetoras podem ser formulados separadamente ou juntos.

20 As composições farmacêuticas e medicamentos tipicamente serão formulados antes de administração a pacientes.

Por exemplo, os complexos de ligação de polipeptídeo podem ser misturados com estabilizantes, particularmente se eles são para serem liofilizados. Adição de açúcares (por 25 exemplo, manitol, sucrose, ou trealose) é típica para render estabilidade durante liofilização, e um estabilizador preferido é manitol. Albumina de soro humano (preferivelmente recombinante) também pode ser adicionada como um estabiliza-

dor. Misturas de açúcares também podem ser usadas, por exemplo, sucrose e manitol, trealose e manitol, etc.

Tampão pode ser adicionado à composição, por exemplo, um tampão Tris, um tampão histidina, um tampão glicina ou, preferivelmente, um tampão fosfato (por exemplo, contendo diidrogeno fosfato de sódio e hidrogeno fosfato de sódio). Adição de tampão para render um pH entre 7,2 e 7,8 é preferida, e em particular um pH de cerca de 7,5.

Para reconstituição após liofilização, água estéril para injeção pode ser usada. É também possível reconstituir uma torta liofilizada com uma composição aquosa compreendendo albumina de soro humano (preferivelmente recombinante).

Genericamente, os complexos de ligação de polipeptídeo serão utilizados em forma purificada junto com carreadores farmacologicamente apropriados.

A invenção assim provê um processo para tratamento de um paciente, compreendendo administração de uma composição farmacêutica da invenção ao paciente. O paciente é preferivelmente um humano, e pode ser uma criança (por exemplo, começando a andar ou bebê), um adolescente ou um adulto, mas genericamente será um adulto.

A invenção também provê um complexo de ligação de polipeptídeo da invenção para uso como um medicamento.

A invenção também provê o uso dos complexos de ligação de polipeptídeo da invenção na fabricação de um medicamento para tratamento de um paciente.

Estes usos, processos e medicamentos são preferi-

velmente para o tratamento de uma das seguintes doenças ou distúrbios: cura de ferimento, distúrbios proliferativos de células, incluindo neoplasma, melanoma, pulmão, colo-retal, osteosarcoma, retal, ovariano, sarcoma, cervical, esofageal, mama, pâncreas, bexiga, cabeça e pescoço e outros tumores sólidos; distúrbios mieloproliferativos, tais como leucemia, linfoma não-Hodgkin, leucopenia, trombocitopenia, distúrbio de angiogênese, sarcoma de Kaposi; distúrbios autoimunes / inflamatórios, incluindo alergia, doença inflamatória de intestino, artrite, psoriase, e inflamação de trato respiratório, asma, distúrbios imuno e rejeição de transplante de órgão; distúrbios cardiovasculares e vasculares, incluindo hipertensão, edema, angina, aterosclerose, trombose, sepsia, choque, dano de reperfusão, e isquemia; distúrbios neurológicos incluindo doença de sistema nervoso central, mal de Alzheimer, dano de cérebro, esclerose lateral amiotrófica, e dor; distúrbios desenvolvimentais; distúrbios metabólicos incluindo diabetes melitus, osteoporose, e obesidade, AIDS e doença renal; infecções incluindo infecção viral, infecção bacteriana, infecção com fungos, e infecção parasítica, condições patológicas associadas com a placenta e outras condições patológicas e para uso em imunoterapia.

Ainda em um aspecto, a presente invenção provê o uso de um complexo de ligação de polipeptídeo da presente invenção como um diagnóstico, prognóstico ou agente de formação de imagem terapêutico.

A presente invenção provê o uso de um anticorpo somente cadeia pesada ou um seu fragmento como aqui descrito

como um reagente de ligação intracelular, ou uma abzima. Fragmentos de anticorpo somente cadeia pesada preferidos são domínios de ligação VH específicos de antígeno solúveis.

A presente invenção também provê o uso de complexos de ligação de polipeptídeo VH de acordo com a presente invenção como inibidores de enzima ou bloqueadores de receptor.

A presente invenção também provê o uso de complexos de ligação de polipeptídeo VH para uso como um agente de formação de imagem, terapêutico, diagnóstico, abzima ou reagente.

A presente invenção também provê complexos de ligação de polipeptídeo VH para uso como um agente de ligação intracelular (anticorpo), e provê vetores funcionais em células alvos para a expressão intracelular de anticorpos compreendendo complexos de ligação de polipeptídeo VH.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1:mostra um complexo de ligação de polipeptídeo compreendendo um domínio de ligação de polipeptídeo VH, domínios de homo dimerização ligados por seqüências de articulação ou ligadoras. Domínios de polipeptídeo VH são posicionados nas extremidades terminais amino e carboxi dos domínios de dimerização.

A.mostra um domínio de ligação de polipeptídeo monoespecífico tetravalente

B.mostra um domínio de ligação de polipeptídeo biespecífico bivalente

C.mostra um domínio de ligação de polipeptídeo te-

tra-específico monovalente

Figura 2:mostra diferentes configurações para domínios de ligação de heterodimerização.

Figura 3:mostra uma estratégia para a geração de um complexo de ligação de polipeptídeo mono - específico tetravalente

Figura 4:mostra uma estratégia para a geração de um complexo de ligação de polipeptídeo bivalente bi-específico com afinidade de ligação para GAG e HSP

Figura 5:mostra um exemplo de um anticorpo tetra - valente bi - específico compreendendo mais de um domínio VH terminal amino e carboxi.

Figura 6:mostra um esquema para geração de moléculas de ligação bi-valentes bi-específicas heterodimerizadas usando domínios zíperes fos e jun.

Figura 7:resultados de PCR

Técnicas Genéricas

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os mesmo significado como entendido por aqueles versados na técnica (por exemplo, em cultura de células, genética molecular, química de ácido nucléico, técnicas de hibridização e bioquímica). Técnicas padrões são usadas para processos moleculares, genéticos e bioquímicos (ver genericamente, sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, N.Y. e Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc.) e processos químicos. Em

adição Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold spring Harbor, N.Y. é referido para técnicas imunológicas padrões.

Qualquer técnica de ADN recombinante apropriada pode ser usada na produção dos complexos polipeptídeos bi- e multi-valentes, anticorpos de cadeia pesada simples, e seus fragmentos, da presente invenção. Típicos vetores de expressão, como plasmídeos, são construídos compreendendo seqüências de ADN codificando cada uma das cadeias do complexo de polipeptídeo ou anticorpo. Quaisquer técnicas estabelecidas apropriadas para fragmentação enzimática e química de imuno-globulinas e separação de fragmentos resultantes pode ser usada. A identificação, isolamento e caracterização de domínios de ligação de polipeptídeo VH específicos de antígeno a partir de bibliotecas de mostra de fago e hibridomas derivados de camelídeos e camundongos transgênicos usam metodologias bem estabelecidas.

A presente invenção também provê vetores incluindo construções para a construção e expressão de complexos de ligação de polipeptídeo da presente invenção.

Será apreciado que um vetor simples pode ser construído que contem as seqüências de ADN codificando mais de uma cadeia de polipeptídeo. Por exemplo, as seqüências de ADN codificando duas diferentes cadeias de polipeptídeos de um heterodímero com domínios de ligação VH associados, podem ser inseridas em diferentes posições sobre o mesmo plasmídeo.

Alternativamente, a seqüência de ADN codificando cada cadeia de polipeptídeo, pode ser inserida individual-

mente em um plasmídeo, assim produzindo um número de plasmídeos construídos, cada um codificando uma particular cadeia de polipeptídeo. Preferivelmente, os plasmídeos nos quais as seqüências são inseridas são compatíveis.

5 Cada plasmídeo é então usado para transformar uma célula hospedeira de modo que cada célula hospedeira contém seqüências de ADN codificando para cada uma das cadeias de polipeptídeos no complexo de ligação de polipeptídeos. Apropriados vetores de expressão que podem ser usados para clonagem em 10 sistemas bacterianos incluem plasmídeos, tais como Col E1, pCR1, pBR322, pACYC 184 e RP4, ADN fago ou derivados de qualquer um destes.

Para uso em clonagem em sistemas de leveduras, apropriados vetores de expressão incluem plasmídeos baseados em origem 2 15 micron.

Qualquer plasmídeo contendo uma apropriada seqüência promotora de gene mamífera pode ser usada em clonagem em sistemas mamíferos. Seqüências promotoras de inseto ou baculovírus podem ser usadas para expressão de gene de célula de inseto. 20 Tais vetores incluem plasmídeos derivados de, por exemplo, pBR322, vírus de papiloma bovino, retrovírus, vírus ADN e vírus vaccinia.

Apropriadas células hospedeiras que podem ser usadas para expressão do complexo de polipeptídeo ou anticorpo 25 incluem células de bactérias, leveduras e eucarióticas, como célula de inseto ou mamífero, plantas transgênicas, insetos, mamíferos e outros sistemas de expressão invertebrados ou vertebrados.

Complexos de Ligação de Polipeptídeos da presente
Invenção

Será entendido que o termo 'complexo de ligação de polipeptídeo', inclui polipeptídeo homólogo e seqüências de ácidos nucléicos obtidas de qualquer fonte, por exemplo, homólogos celulares relacionados, homólogos de outras espécies e suas variantes ou derivados.

Assim, a presente invenção abrange variantes, homólogos, ou derivados dos complexos de ligação de polipeptídeo, domínios de ligação VH e domínios de dimerização como aqui descritos.

No contexto da presente invenção, uma seqüência homóloga é tomada para incluir uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 15 99,7, 99,8, 99,9% idêntica, preferivelmente pelo menos 98 ou 99%, idêntica, no nível de aminoácido sobre pelo menos 30, preferivelmente 50, 70, 90 ou 100 aminoácidos. Embora homologia também possa ser considerada em termos de similaridade (isto é, resíduos de aminoácidos tendo propriedades / funções químicas similares), no contexto da presente invenção é preferido expressar homologia em termos de identidade de seqüência.

A presente invenção também inclui vetores de expressão construídos e células hospedeiras transformadas para uso em produção de complexos de ligação de polipeptídeo, domínios de dimerização e domínios de ligação de VH da presente invenção.

Após expressão das cadeias individuais na mesma

célula hospedeira, elas podem ser recuperadas para provimento de completo complexo de ligação de polipeptídeo ou VH em forma ativa.

É imaginado que, em formas preferidas da invenção,
5 os complexos de ligação de polipeptídeo individuais serão processados pela célula hospedeira para formação de complexo de ligação de polipeptídeo dimerizado que é vantajosamente secretado da mesma.

Técnicas para a preparação de complexos de ligação
10 de polipeptídeo anticorpo recombinante são descritas nas referências acima e também em, por exemplo, EP-A-0 623 679; EP-A-0 368 684 e EP-A-0 436 597.

Usos dos Complexos de Ligação de Polipeptídeo da
Presente Invenção

15 Os complexos de ligação de polipeptídeo incluindo seus fragmentos da presente invenção podem ser empregados em: aplicações terapêuticas e profiláticas in vivo, aplicações diagnósticas in vitro e in vivo, ensaio in vitro e aplicações de reagente, e semelhantes.

20 Usos terapêuticos e profiláticos dos complexos de ligação de polipeptídeo da invenção envolvem a administração do acima a um mamífero receptor, tal como um humano. Complexos de ligação de polipeptídeo substancialmente puros incluindo seus fragmentos de pelo menos 90 a 95% de homogeneidade
25 são preferidos para administração a um mamífero, e 98 a 99% ou mais homogeneidade é preferida para usos farmacêuticos, especialmente quando o mamífero é um humano. Uma vez purificado, parcialmente ou para homogeneidade como desejado, os

complexos de ligação de polipeptídeo como aqui descritos podem ser usados diagnosticamente ou terapeuticamente (incluindo extracorporealmente) ou em desenvolvimento e realização de procedimentos de ensaio usando processos conhecidos por 5 aqueles versados na técnica.

Genericamente, os complexos de ligação de polipeptídeo da presente invenção serão utilizados em forma purificada juntamente com carreadores farmacologicamente apropriados. Tipicamente, estes carreadores incluem soluções, emulsões ou 10 suspensões aquosas ou alcoólicas / aquosas, que podem incluir meios tamponados e/ou salinos. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio e Ringer lactada.

Apropriados adjuvantes fisiologicamente aceitáveis, se necessários para manutenção de um complexo de polipeptídeo em suspensão, podem ser escolhidos de espessantes tais como carboxi metil celulose, polivinil pirrolidona, gelatina e alginatos.

Veículos intravenosos incluem restabelecedores de 20 fluido e nutriente, e restabelecedores de eletrólitos, tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer. Preservativos e outros aditivos, tais como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes, também podem estar presentes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 25 16th Edition).

Os complexos de polipeptídeo e anticorpos, incluindo seus fragmentos, da presente invenção podem ser usados como composições administradas separadamente ou em conjunção

com outros agentes. Estes podem incluir várias drogas imunoterapêuticas, como ciclosporina, metotrexato, adriamicina, cisplatina ou uma imuno-toxina. Alternativamente, os complexos de ligação de polipeptídeo podem ser usados em conjunção com enzimas para a conversão de pró-drogas em seu sítio de ação.

5 Composições farmacêuticas podem incluir "coquetéis" de vários agentes citotóxicos ou outros em conjunção com os complexos de ligação de polipeptídeo selecionados da 10 presente invenção ou mesmo combinações dos complexos de ligação de polipeptídeo selecionados da presente invenção.

A rota de administração de composições farmacêuticas da invenção pode ser qualquer uma daquelas comumente conhecidas por aqueles versados na técnica. Para terapia, incluindo sem limitação imunoterapia, os complexos de ligação de polipeptídeo da invenção podem ser administrados a qualquer paciente de acordo com técnicas padrões. A administração pode ser através de qualquer modo apropriado, incluindo parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente transdermicamente, via a rota pulmonar, ou também, apropriadamente, através de infusão direta com um cateter. A dosagem e freqüência de administração dependerão de sexo, idade e condição do paciente, simultânea administração de outras drogas, contra-indicações e outros parâmetros a serem levados em conta pelo médico.

25 Os complexos de ligação de polipeptídeo e anticorpos desta invenção podem ser liofilizados para estocagem e reconstituídos em um apropriado carreador antes de uso. Téc-

nicas de liofilização e reconstituição conhecidas podem ser empregadas. Será apreciado por aqueles versados na técnica que liofilização e reconstituição podem conduzir a graus variáveis de perda de atividade funcional e que níveis de uso 5 têm de ser ajustados ascendentemente para compensar.

Quando usado como um intracorpo o complexo de ligação de polipeptídeo pode ser liberado usando vetores não-virais ou virais, ou podem ser liberados como uma formulação lipossomal ou alternativa resultando na tomada na célula al- 10 vo requerida.

Em adição, os complexos de ligação de polipeptídeo da presente invenção podem ser usados para propósitos diagnósticos. Por exemplo, domínios de ligação VH como aqui descritos podem ser gerados ou elevados contra antígenos que 15 são especificamente expressos durante estados de doença ou cujos níveis mudam durante um dado estado de doença. Para propósitos de reagente ou diagnósticos complexos de ligação de polipeptídeo podem compreender domínios VH ligando um ou mais epítopos sobre o mesmo antígeno, alternativamente um ou 20 mais domínios de ligação podem atuar como domínios de captura tanto ligando o complexo de polipeptídeo a um definido substrato ou ligando um componente de ensaio requerido para aspectos qualitativos ou quantitativos da leitura de ensaio.

Para certos propósitos, tais como propósitos diag- 25 nósticos ou de traçamento, marcadores podem ser adicionados. Marcadores apropriados incluem, mas não são limitados a, qualquer um dos seguintes: marcadores radioativos, marcadores de spin RNM e marcadores fluorescentes. Meios para de-

tecção dos marcadores serão familiares para aqueles versados na técnica.

As composições contendo os complexos de ligação de polipeptídeo da presente invenção ou um seu coquetel podem 5 ser administradas para tratamentos profiláticos e/ou terapêuticos.

Uma composição contendo um ou mais complexos de ligação de polipeptídeo da presente invenção pode ser utilizada em instalações profiláticas e terapêuticas para auxiliar 10 na alteração, inativação. Morte ou remoção de uma população de células alvos selecionada em um mamífero. Em adição, os repertórios selecionados de complexos de ligação de polipeptídeo aqui descritos podem ser usados extracorporeamente ou in vitro seletivamente para matar, esgotar ou de outro 15 modo efetivamente remover uma população de células alvos de uma coleção heterogênea de células.

Exemplos

Exemplo 1

Proteína de ligação polipeptídeo anti-aTNF mono -
20 específica tetravalente

A construção foi derivada de um anticorpo monoclonal previamente caracterizado produzindo uma IgM somente cadeia pesada e em um camundongo transgênico desafiado com uma aTNF. O domínio VH compreendeu um segmento V camelídeo e re-
25 giões constantes e DJ humanas.

A cadeia principal CH2CH3 do anticorpo foi suprimida e substituída por domínio de cadeia pesada de imunoglobulina CH1 e pela região constante de cadeia leve de imuno-

globulina. O domínio VH foi então duplicado e clonado na extremidade terminal carboxila de cada construção usando uma região de articulação modificada. Esta articulação foi similar à seqüência de articulação IgG2 existente mas foi alterada através de substituição de cisteínas com prolinas para prevenir reticulação das cisteínas no dímero antícorpo e provimento de flexibilidade extra via as prolinas para prevenir o segundo antícorpo sendo espacialmente restringido, o que de outro modo pode ter inibido sua função.

Assim formação das pontes de sulfeto normalmente presentes na articulação IgG2 humana, foi evitada através de substituição de cisteínas (tom cinza) com prolinas (sublinhada). As prolinas adicionam flexibilidade extra para a articulação para permitir próprio funcionamento do domínio de segundo antícorpo que torna-se ligado a terminus COOH do domínio de dimerização via a articulação.

A seqüência de articulação IgG normal (códons cisteína em tom cinza, códons proлина sublinhados)

GAGCGCAAATG [CGAG] CGAG [CCACCG] CCA (SEQ ID NO:1)

e seus complementos foram substituídos por

AGCTTCTGAGCGCAAACCACCACGAGTCGAGCCACCACCGCCACCAC (SEQ ID NO:2) e seu complemento

TCGAGTGGTGGCGGTGGCTCGACTGGTGGTTGCGCTCAGA (SEQ ID NO:3)

Isto também proveu o fragmento (articulação caixa branca, Figura 2 , centro) com duas extremidades de fita

simples compatíveis com sítios HindIII (negrito) e XhoI (*i-tálico*) para propósitos de clonagem. A construção final foi ligada em um plasmídeo de expressão bluescript (Pbluescript11 sk+) que contem um promotor actina de galinha e uma seqüência aperfeiçoadora CMV (Figura 22, plasmídeo de expressão) através de tecnologia de ADN recombinante padrão.

Os plasmídeos de expressão dia-corpo foram crescidos e co-transfetados com o plasmídeo pGK-hygro (para permitir a seleção de células transfetadas) através de processos padrões (Superfect) em células CHO. Clones positivos foram selecionados em meio contendo higromicina e identificados positivamente como expressando o dia-corpo através de realização de um ELISA aTNF padrão do meio de crescimento contendo dia-corpo secretado pelas células CHO. Western blots destes ELISAs selecionaram clones sob condições não-redutoras e redutoras foram realizadas de modo a mostrar que a proteína expressa do plasmídeo foi um dímero comparado ao monômero. Assim, a ELISA e o Western blot juntos mostram que o dia-corpo é expresso e secretado no meio como um dímero pelas células CHO transfetadas e que o anticorpo pode ligar aTNF. Comparação da afinidade de ligação do monômero VH aTNF, - diemro e - tetrâmero mostraram máxima afinidade de ligação com o tetrâmero.

Exemplo 2

Um complexo de ligação de polipeptídeo bivalente, bi-específico comprendendo domínios de ligação VH e um domínio de dimerização CH₂CH₃ carecendo de funções efetoras de cadeia pesada derivado de IgG4

O experimento foi realizado usando um domínio VH humano camelizado elevado contra proteína HSP70 de E. coli no terminus amino do domínio de dimerização, e um domínio VHH de lhama elevado contra o antígeno gag PERV (Dekker et al., (2003) J. Virol. 77, (22) 12132-9) no terminus carboxila. Detalhes experimentais são como descritos no Exemplo 2 figs 22, 23e 24 de PCT/GB2005/002892) exceto que o domínio de dimerização CH2-CH3 de IgG2 foi substituído com um domínio de dimerização CH2-CH3 de IgG4 humano (Bruggemann, M. et al. (1987) J. Ex. Med. , 166, 1351-1361.

O vetor comprendendo complexo de ligação de polipeptídeo foi expresso em células CHO, e o complexo de ligação de polipeptídeo secretado mostrado por Western blotting ligar ambos antígenos HSP70 e gag.

15 Exemplos 3-5

Ao invés de usar regiões constantes de imunoglobulina outros domínios de dimerização podem ser usados para geração de moléculas de ligação multi - específicas multivalentes, por exemplo, os domínios de zíper leucina dos genes jun e fos em combinação com diferentes domínios VH (humanos). O domínio zíper jun pode heterodimerizar com o domínio zíper fos, mas ele também pode homodimerizar. Os seguintes dois exemplos descrevem a hetero- e homodimerização destes domínios zíper. O último exemplo descreve o uso de outros domínios.

Exemplo 3. Moléculas de ligação bi-valentes bi - específicas heterodimerizadas usando domínios zíperes fos e jun.

O esquema básico para a geração de tais moléculas é ilustrado na Figura 6 e consiste nas seguintes etapas:

1.0 VH desenvolvido contra rTTA (Janssens et al., 2006) é amplificado por PCR com primers que no lado 5' têm 5 um sítio EcoRI (primer 1) e é homólogo à seqüência líder e no lado 3' é homólogo à região de articulação plus uma seqüência homóloga à extremidade 5' das seqüências fos e jun (primer 2 e 3, respectivamente). Amplificação PCR padrão resulta em um fragmento A para fois (fig 6 linha sólida) ou 10 fos (fig. 7 linha pontilhada) de 600 pares de bases.

Primer 1: CTGGAATTCTCACCATGGAGCTGGGGCTGAGC (SEQ ID NO:4)

Primer 2: CGCTTGGAGTGTATCAGTCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGGG (SEQ ID NO:5)

Primer 3: CAGCCGGCGATTCTCTCCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGGG (SEQ ID NO:6)

2. As regiões zíperes de leucina fos e jun são amplificadas de ADNC humano codificando fos ou jun. Os primers 15 na extremidade 5' contiveram uma seqüência homóloga à extremidade 3' da região de articulação do rTTA VH (primers 4 e 5 respectivamente). Os primers na extremidade 3' foram homólogos à extremidade 3' das regiões de zíper (primers 6 e 7) e contêm na extremidade 3' uma seqüência homóloga à extremidade 5' da região de articulação (PCT/GB2005/002892) presente na extremidade 5' do A5 VH (Janssens et al., 2006). Amplificação das seqüências fos e jun resulta em fragmentos B (Fig. 6 linha sólida) e C (Fig. 6 linha pontilhada) respectivamente de 200 pb cada.

Primer 4: CCCCCGTGCCAAGGTGCCACTGACTGATAACACTCCAAGCG
(SEQ ID NO:7)

Primer 5: CCCCCGTGCCAAGGTGCCACTGGAGAGAATCGCCCGGCTG
(SEQ ID NO:8)

Primer 6: TGGTGGTTGCGCTCAGAACGCCAGGATGAACCTCTAGTTTC
(SEQ ID NO:9)

Primer 7: TGGTGGTTGCGCTCAGAACGAAACGTGGTCATGACTTCTG
(SEQ ID NO:10)

3.Uma seqüência de articulação não contendo cisteinas é primeiro clonada (como especificado em PCT?GB2005/002892, ERKPPVEPPPPP) sobre a região VH A5 (Dekker et al., 2003; Janssens et al., 2006). A articulação e VH A5 são subseqüentemente amplificadas usando um primer que é homólogo com a extremidade 5' da região articulada e um primer homólogo para a extremidade 3' da regiaão VH A5 incluindo o códon de interrupção (primer, resultando em um fragmento D para fos (fig. 6 linha sólida) ou jun (fig. linha pontilhada) de 400 pares de bases.

Primer 8: GAAAAACTAGAGTTCATCCTGGCTCTGAGCGCAAACCACCA
(SEQ ID NO:11)

Primer 9: CAGAAAGTCATGAACCACGTTGCTCTGAGCGCAAACCACCA
(SEQ ID NO:12)

Primer 10: GTCGAATTCTCATTCCGAGGAGACGGTGACCTGGTC (SEQ ID NO:13)

4.Fragmento A (fig. 6 linha sólida), B e D (fig. 6 linha sólida) são misturados em quantidades equimolares e fragmentos A (fig. 6 linha pontilhada), C e D (fig. 6 linha pontilhada) são misturados em quantidades equimolares, desnaturados e amplificados por PCT usando os primers 1 e 10, resultando em um fragmento de 1200 pares de bases (ver figu-

ra 7, rTTA-fos-A5 abaixo, contendo um sítio XhoI característico na 5' da seqüência A5).

5.0 rTTA-foszip-A5 e rTTA-junzip-A5 são clonadas através de meios padrões em um vetor de expressão de levedura (Pichia, Invitrogen) ou CHO padrão (entre promotor CAG e sítio poliA). Estas construções são introduzidas em células de levedura e CHO respectivamente.

6. Meios e células são coletados e analisados por ELISA para mostrarem que eles ainda ligam rTTA e A5 e Western blots nativas para mostrarem que elas são dimerizadas.

Exemplo 4

Este é para mostrar homodimerização através do mesmo processo como mostrado no exemplo 3 com a exceção de que somente a parte de zíper jun do experimento é realizada. 15 A rTTA-junzip-A5 é expressa em células de Pichia ou CHO e mostrada formar homodímeros de ligação de rTTA e A5 através dos mesmos processos como no exemplo 2.

Exemplo 5

Metodologia similar como descrito nos exemplos 3 e 20 4 pode ser aplicada para outros domínios de formação de homo- ou heterodímero. Para tais casos os primers usados no exemplo 2, podem ser homólogos a tais outros domínios dimerizantes e os oligonucleotídeos usados na etapa 1 e 3 podem ter extremidades sobrepondo-se com estes domínios para permitir etapa 4.

Em todos os exemplos outros domínios VH ou VL ou outros domínios de ligação tais como domínios de ligação de ADN de fator de transcrição ou domínios de ligação de ligan-

te podem ser usados.

Todas as publicações mencionadas no relatório descritivo acima são aqui incorporadas por referência.

Várias modificações e variações dos processos descritos e sistema da presente invenção serão aparentes para aqueles versados na técnica sem se fugir do escopo e espírito da presente invenção. Embora a presente invenção tenha sido descrita em conexão com específicas realizações preferidas, deve ser entendido que a invenção como reivindicada não deve ser indevidamente limitada a tais realizações específicas. Realmente, várias modificações dos modos descritos para realização da invenção que são óbvias para aqueles versados em bioquímica, biologia molecular e biotecnologia ou campos relacionados são pretendidas estarem dentro do escopo das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Complexo de ligação de polipeptídios,
CARACTERIZADO pelo fato de que compreende um dímero de uma
primeira cadeia de polipeptídio e uma segunda cadeia de po-
5 lipeptídio, em que cada cadeia de cadeia de polipeptídio
compreende um domínio de ligação VH amino-terminal; um domí-
nio de ligação VH amino-terminal; e um domínio de dimeriza-
ção em que o domínio de dimerização carece de funcionalidade
 C_H2-C_H3 .
- 10 2. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo
com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o do-
mínio de dimerização não tem um domínio CH2-CH3 engenheirado
nem natural.
- 15 3. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo
com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o
domínio de dimerização da primeira cadeia de polipeptídio é
diferente daquela da segunda cadeia de polipeptídio, de modo
que o complexo de ligação de polipeptídio é um heterodímero.
- 20 4. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo
com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o
domínio de dimerização da primeira cadeia de polipeptídio é
a mesma que aquele da segunda cadeia de polipeptídio, de mo-
do que o complexo de ligação de polipeptídio é um homodíme-
ro.
- 25 5. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo
com a qualquer uma das reivindicações precedentes,
CARACTERIZADO pelo fato de que os domínios de ligação VH
mostram a mesma especificidade (monoespecífico tetravalen-

te).

6. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os domínios de ligação VB amino-terminal mostram a mesma especificidade; os domínios de ligação VH carbóxi-terminal mostra a mesma especificidade; e a especificidade de ligação do domínios VH amino-terminal e carbóxi termina diferem (biespecíficos bivalentes).

7. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os domínios de ligação VH amino-terminal mostram a mesma especificidade; e os domínios de ligação VH carbóxi-terminal mostram diferente especificidade um do outro e aos domínios VH amino-terminal (triespecíficos).

8. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os domínios de ligação VH carbóxi-terminal mostram a mesma especificidade; e os domínios de ligação VH amino-terminal mostram diferente especificidade um do outro e aos domínios VH carbóxi-terminal (triespecíficos).

9. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que em que os domínios de ligação VH amino-terminal mostram diferente especificidade um do outro, e os domínios de ligação VH carbóxi-terminal mostram diferente especificidade um do outro e aos domínios de liga-

ção VH amino-terminal (tetraespecíficos).

10. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser de tamanho não maior que 120 5 kDA.

11. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que um ou mais dos domínios de ligação VH pode ser substituídos por um cama classe alternativa de domínio de ligação de polipeptídio. 10

12. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de ou a primeira cadeia de polipeptídio, a segunda cadeia de polipeptídio ou ambas as cadeias 15 de polipeptídio compreende ainda um domínio de articulação flexível entre ou domínio de ligação amino-terminal e o domínio de dimerização; o domínio de ligação carbóxi-terminal e a dimerização; ou ambos.

13. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo 20 com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio de ligação alternativa é uma citocina, um fator de crescimento, um antagonista ou agonista de receptor ou um ligante.

14. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo 25 com qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada cadeia de polipeptídio compreende ainda um ou mais domínios de ligação VH adicionais *in tandem* e separados por um domínio de articulação

flexível; e um ou mais domínios de ligação VH carbóxi-terminal adicionais *in tandem* e separados por um domínio de articulação flexível.

15. Polinucleotídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de 5 codificada a primeira cadeia de polipeptídio, a segunda cadeia de polipeptídio ou ambas as cadeias de polipeptídio conforme definidas em qualquer uma das reivindicações precedentes.

16. Votor de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de 10 que contém o polinucleotídeo isolado conforme definido na reivindicação 15.

17. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser transformada com um votor de expressão conforme definido na reivindicação 16.

15 18. Método para a produção do complexo de ligação de polipeptídio, conforme definido em qualquer uma das reivindicações antecedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira conforme definida na reivindicação 17 e isolar o complexo de polipeptídio.

20 19. Método para a produção de um complexo de polipeptídio, conforme definido em qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

transformar uma célula hospedeira com um votor ou vetores que codificam um complexo de ligação de polipeptídio 25 conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14;

crescer a célula hospedeira sob condições que permitem a expressão da(s) seqüênci(a)s de codificação de o votor ou vetores; e

coletar o complexo de ligação de polipeptídio da célula hospedeira.

20. Método para a produção do complexo de polipeptídio, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio de ligação VH, domínio de dimerização ou polipeptídios ligantes são produzidos por uma via sintética, uma química de peptídio ou conjugação.

21. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um complexo de ligação de polipeptídio produzido conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

22. Uso de um complexo de ligação de polipeptídio conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para a profilaxia ou tratamento de doença.

23. Método para tratar um paciente, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 22, a um paciente que necessite de tratamento.

24. Uso de um complexo de polipeptídio, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser como diagnóstico, um reagente, uma abzyma, um agente inibidor, um reagente citoquímico ou um agente de imageamento.

25. Uso de um complexo de ligação de polipeptídio, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser como um intracorpo.

26. Método para tratar um paciente, **CARACTERIZADO**
pelo fato de que compreende administrar um vetor conforme
definido na reivindicação 16 ou uma composição farmacêutica
conforme definida na reivindicação 21, a um paciente que ne-
5 cessite de tratamento.

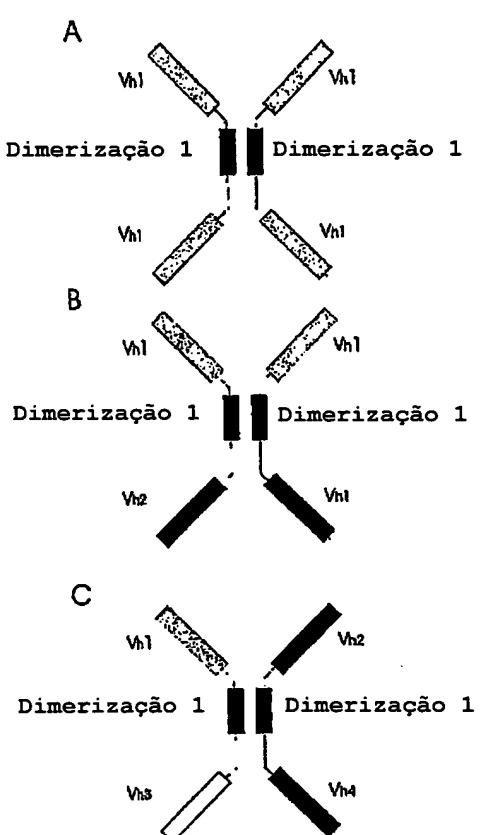


Figura 1

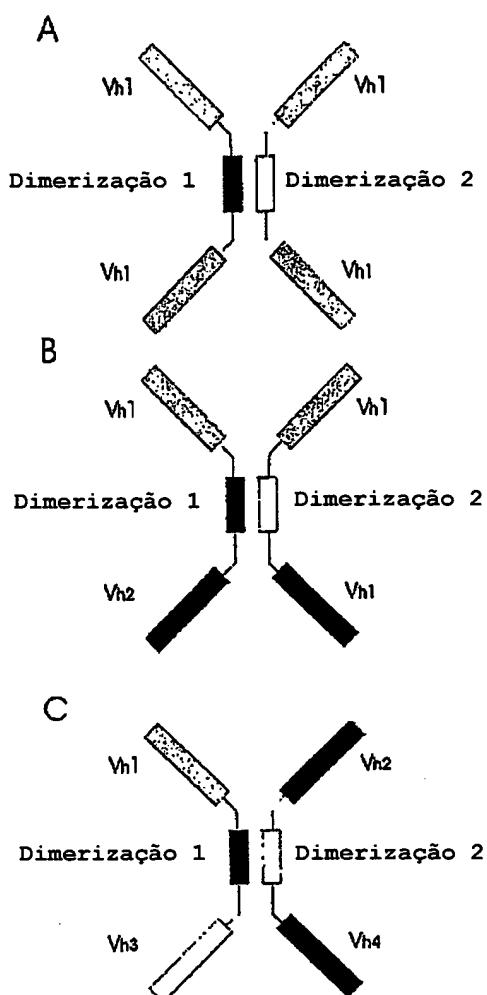


Figura 2

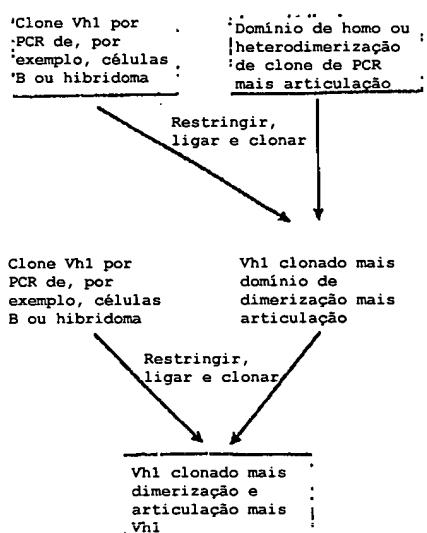


Figura 3

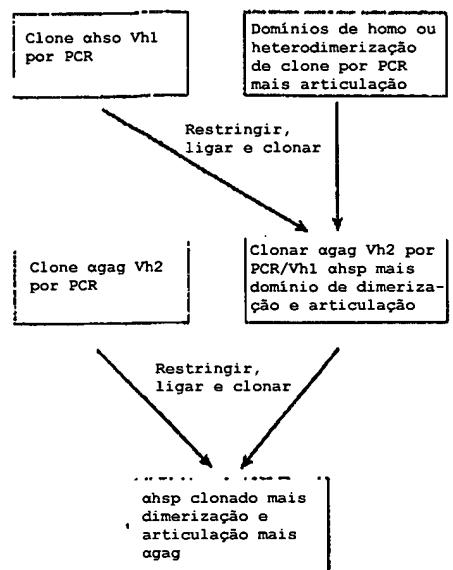


Figura 4

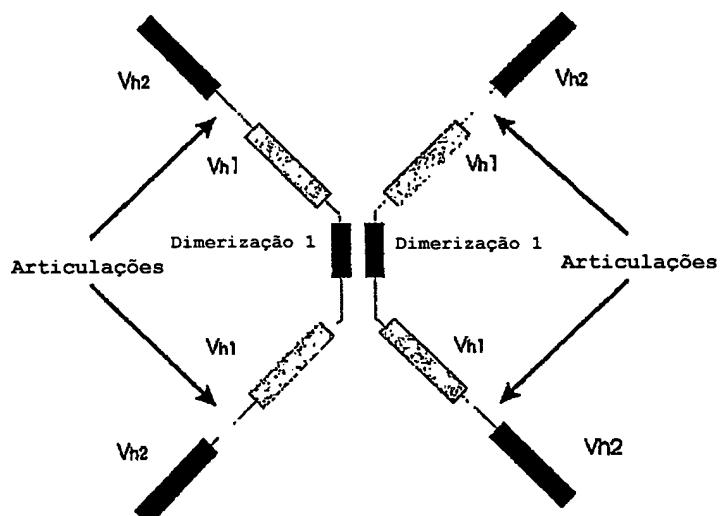


Figura 5

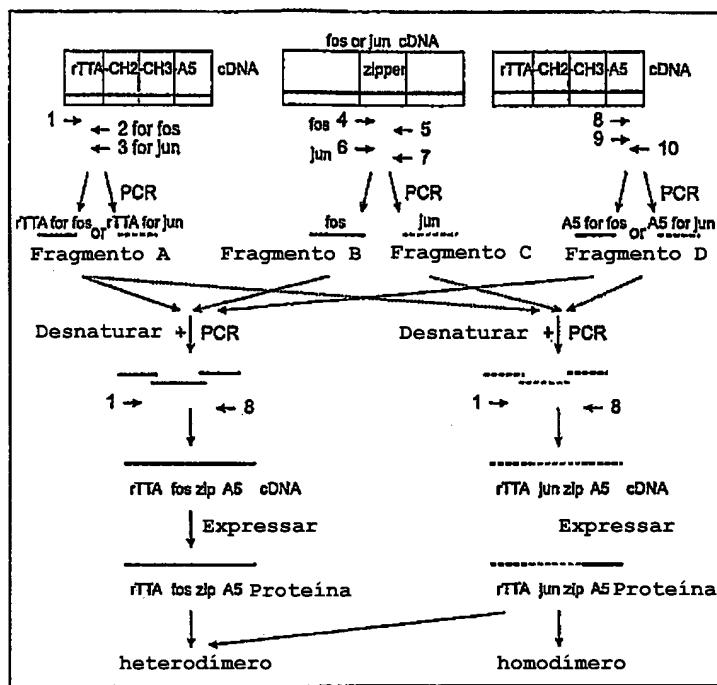


Figura 6

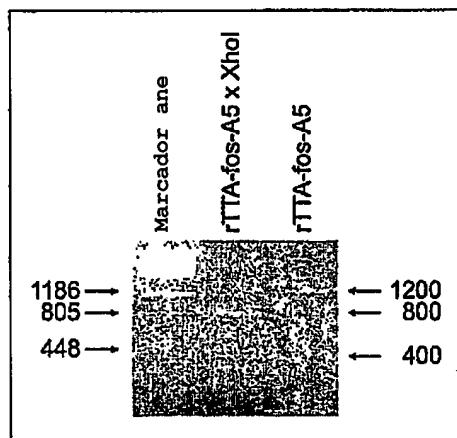


Figura 7

RESUMO**"MOLÉCULAS LIGANTES"**

A presente invenção refere-se à fabricação de complexos ligantes polipeptídeo mono, di e multivalentes, também complexos ligantes polipeptídeo mono, di ou multiespecíficos e seus usos. A invenção também refere-se à fabricação e uso de um repertório diverso de domínios ligantes VH específicos de antígeno derivados de bibliotecas de mostra de fago, animais transgênicos ou fontes naturais. Preferivelmente os domínios ligantes VH e os domínios de dimerização compreendem seqüências humanas. Os complexos de ligação de polipeptídeo compreendem domínios de homo ou heterodimerização com quatro domínios de ligação de antígeno [VH] fundidos nos termini amino e carboxila dos domínios de dimerização preferivelmente usando peptídeos ligadores ou de articulação. Onde os complexos de ligação polipeptídeo carecem de funções efetoras CH₂-CH₃ eles são preferivelmente de menos que 120kDa em tamanho. Rotas de fabricação são aqui descritas.