



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.Cl.:*
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 2007/085837 de 02/08/2007

(57) **Resumo:** MOLÉCULAS LIGANTES A presente invenção refere-se à fabricação de com- plexos 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.



"MOLECULAS LIGANTES"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à geração de complexos ligantes polipeptídeos compreendendo domínios ligantes
5 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
10 derivados de scFv descritos na técnica anterior, assim provendo vantagens para fabricação de produto e estabilidade de produto. Os seus usos também são descritos.

Antecedentes da Invenção

Anticorpos monoclonais ou suas variantes representam uma alta proporção de novos medicamentos lançados no
15 21º século. Terapia de anticorpo monoclonal já é aceita como uma rota preferida para o tratamento de artrite reumatóide e doença de Crohn e há impressionante progresso no tratamento de câncer. Produtos baseados em anticorpo também estão em
20 desenvolvimento para o tratamento de doenças cardiovasculares e infecciosas. Maior parte de produtos anticorpos monoclonais comercializados reconhecem e ligam um epítopo bem definido, simples sobre o ligante alvo (por exemplo, TNF α). A montagem de um complexo consistindo em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (o complexo H₂L₂) e subseqüentes
25 processos de glicosilação pós-traducionais requerem o uso de sistemas de produção mamíferos. Custos de produção e custos de capital para fabricação de anticorpos através de cultura

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 epítomos sobre os mesmos, ou diferentes antígenos. 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 Spriël 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 Spriël 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 pro-
 25 duto anticorpo bi-específico é baseado em dois ou mais complexos H_2L_2 . 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 antígenos (Ferguson et al., (1995) Arthritis and Rheumatism, 38, 190-200) ou a reticulação de outras proteínas ligantes, por exemplo, colectinas, a fragmentos de anticorpos (Tacke 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 antígenos 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
5 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 ausên-
15 cia 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 es-
20 tão 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 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 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 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.*, 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,
15 305, 1770-1773).

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
20 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;
25 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).

5 scFvs têm limitações devido a inerente instabilidade e ineficiência de dobra quando produzidos e recuperados de células hospedeiras, ou quando produzidos como intracorporos em um ambiente intracelular redutor (ver der Maur et al., (2002) J. Biol. Chem. 277, 45075-45085). Em contraste
10 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 retêm estabilidade funcional mesmo na presença de tensoativos não-iônicos e aniônicos, e condições desnaturantes
15 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
20 cional 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
25 do 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 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).

10 Recentemente, processo para a produção de anticorpos somente cadeia pesada em mamíferos transgênicos foi desenvolvido (ver W002/085945 e W002/085944). Anticorpo somente cadeia pesada funcional de potencialmente qualquer classe (IgM, IgG, IgD, IgA, ou IgE) e derivado de qualquer mamífero
15 (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
20 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
25 em camundongos transgênicos como um resultado de desafio de antígeno mostram que diversidade de anticorpos V_H humanos camelizados é grandemente dirigida através de processos de maturação in vivo, com dependência sobre eventos de recombina-

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 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, Holliger, 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 ligantes dentro de construções bi-específicas ou bivalentes (Conrath 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-

ciado de perda de especificidade e avidéz, 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 .

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 subsequente 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 polipeptídico 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

25 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 compreendendo domínios de ligação VH é para ser usado como um intracampo (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 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 - específicos tetraivalentes, 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 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 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 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 pro-
5 vê 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
10 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 citotóxico, 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. Opcional-
5 mente 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).

10 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 co-
15 mo 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
20 V_H e V_L de um anticorpo tetramérico (H_2L_2).

25 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, citotóxicos, e formação de imagem, estimulador imune e funções de ligação de receptor.

A presente invenção também provê um vetor(es) compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando o complexo de ligação polipeptídeo VH e domínio de dimerização 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 podem ser usados como agentes de formação de imagem, diagnósticos, reagentes, abzymas 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 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 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 se-
5 cretados 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
10 funcionais ou domínios de ligação somente cadeia pesada VH, preferivelmente 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,
15 ra, 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
20 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 domí-
25 nio 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 efectoras 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 efectoras, 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 (Ofra, Y. & Rost, B. (2003) *J. Mol. Biol.* 325, 377-387). Específica 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 terminos 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 citoplásmica 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, abzymas e reagentes, com paralelas aplicações agrícolas, ambientais e industriais.

15 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. Sequências 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. Sequências 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 produtos de clivagem (Jaton et al., (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195).

 Onde o domínio de ligação VH é isolado de um híbrido caracterizado, a sequência de domínio de ligação VH derivada de ARNm pode ser diretamente clonada 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, híbridos de célula-B, células CHO), plantas (por exemplo, milho), cabras, coelhos, gado, carneiro, e galinhas transgênicas 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 transfectadas (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 (Tanha 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 distinguíveis 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.
25

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 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 tetraméricos mono - específicos, complexos de ligação bi - específicos bivalentes, ou complexos de ligação tetra - específicos. Domínios de ligação VH estão presentes nos terminais 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 avidéz que um VH 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 sequência 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

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 epítipo 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 significativa 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 a domínios de ligação VH nos terminais amino e carboxila de domínio de dimerização.

Opcionalmente, o complexo de ligação polipeptídeo inclui domínios semelhantes a articulações 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.

Opcionalmente, o domínio de dimerização pode compreender outras funções úteis, ou pode ser engenheirado para 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 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 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 sequência 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; glutathione 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, $TNF\alpha$), todos os quatro domínios de ligação atuando cooperativamente atuarão com maior avidéz 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 alguns 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. 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 antígenos 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
25 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 epítomos 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 polipep-
10 tídeo bi-específicos podem ser usados para alvejar células e tecidos in vivo, então subsequente 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
15 pró-droga para a subsequente conversão localizada de pró-droga para agente reativo. Complexos de ligação bi- e multi-específicos em combinação com agentes efetores também podem ser usados para ligar e destruir um ou mais patógenos dependente da seleção de domínios de ligação. Alternativa-
20 mente, a presença de dois ou mais domínios de ligação que reconhecem diferentes antígenos 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.

25 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, 5 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 in- 10 testino, artrite, psoríase, 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 neuroló- 15 gicos 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 20 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 25 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 (intracampo), e provê vetores funcionais em células alvos para a expressão intracelular de intracampo 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 homodimerização 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 o 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 imunoglobulinas 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 contem seqüências de ADN codificando para cada uma das cadeias de polipeptídeos no complexo de ligação de polipeptApropriados 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 põem 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, 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, 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 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

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.

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 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 aqueles versados na técnica.

Genericamente, os complexos de ligação de polipeptídeo da presente invenção serão utilizados em forma purificada junto com carreadores farmacologicamente apropriados. Tipicamente, estes carreadores incluem soluções, emulsões ou 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 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, 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 imuno-terapêuticas, como ciclosporina, metotrexato, adriamicina, cisplatina ou uma imuno-toxina. Alternativamente, os complexos de ligação de polipeptídeo podem ser usados em conjunção
5 com enzimas para a conversão de pró-drogas em seu sítio de ação.

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
15 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,
20 ou também, apropriadamente, através de infusão direta com um cateter. A dosagem e frequência 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 epítomos 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 diagnósticos ou de traçamento, marcadores podem ser adicionados.
25 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 auxili-
10 ar 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 extracorporealmente 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 m 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 sequência de articulação IgG2 existente mas foi alterada através de substituição de cisteínas com prolínas para prevenir reticulação das cisteínas no dímero anticorpo e provimento de flexibilidade extra via as prolínas para prevenir o segundo anticorpo 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 prolínas (sublinhada). As prolínas adicionam flexibilidade extra para a articulação para permitir próprio funcionamento do domínio de segundo anticorpo que torna-se ligado a terminus COOH do domínio de dimerização via a articulação.

A sequência de articulação IgG normal (códon cisteína em tom cinza, códon prolina sublinhados)

GAGCGCAAATG **TCGAG** **CCACCG** **CCA** (SEQ ID NO:1)

e seus complementos foram substituídos por

AGCTTCTGAGCGCAAACCACCAGTCGAGCCACCACCGCCACCAC (SEQ ID NO:2)

e seu complemento

TCGAGTGGTGGCGGTGGTGGCTCGACTGGTGGTTTGGCTCAGA (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 (italico) 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
 5 sequência aperfeiçoadora CMV (Figura 22, plasmídeo de expressão) através de tecnologia de ADN recombinante padrão.

Os plasmídeos de expressão diacóporo foram crescidos e co-transfectados com o plasmídeo pGK-hygro (para permitir a seleção de células transfectadas) através de processos pa-
 10 drões (Superfect) em células CHO. Clones positivos foram selecionados em meio contendo higromicina e identificados positivamente como expressando o diacóporo através de realização de um ELISA aTNF padrão do meio de crescimento contendo diacóporo secretado pelas células CHO. Western blots destes
 15 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 diacóporo é expresso e secretado no meio como um dímero pelas célu-
 20 las CHO transfectadas e que o anticóporo pode ligar aTNF. Comparação da afinidade de ligação do monômero VH aTNF, -dímero e -tetrâmero mostraram máxima afinidade de ligação com o tetrâmero.

Exemplo 2

25 Um complexo de ligação de polipeptídeo bivalente, bi-específico compreendendo 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 compreendendo 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.

Exemplos 3-5

Ao invés de usar regiões constantes de imunoglobulina outros domínios de dimerização podem ser usados para geração der 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 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 um sítio EcoRI (primer 1) e é homólogo à sequência líder e no lado 3' é homólogo à região de articulação plus uma sequência homóloga à extremidade 5' das sequências fos e jun (primer 2 e 3, respectivamente). Amplificação PCR padrão resulta em um fragmento A para fos (fig 6 linha sólida) ou 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: CAGCCGGGCGATTCTCTCCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGGG (SEQ ID NO:6)

2.As regiões zíperes de leucina fos e jun são amplificadas de ADNc humano codificando fos ou jun. Os primers na extremidade 5' contiveram uma sequência 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 sequência homóloga à extremidade 5' da região de articulação (PCT/GB2005/002892) presente na extremidade 5' do A5 VH (Janssens et al., 2006). Amplificação das sequências fos e jun resulta em fragmentos B (Fig. 6 linha sólida) e C (Fig. 6 linha pontilhada) respectivamente de 200 pb cada.

Primer 4: CCCCCGTGCCCAAGGTGCCCACTGACTGATACTCCAAGCG
(SEQ ID NO:7)

Primer 5: CCCCCGTGCCCAAGGTGCCCACTGGAGAGAATCGCCCGGCTG
(SEQ ID NO:8)

Primer 6: TGGTGGTTTGCGCTCAGAAGCCAGGATGAACTCTAGTTTTTC
(SEQ ID NO:9)

Primer 7: TGGTGGTTTGCGCTCAGAAGCAACGTGGTTCATGACTTTCTG
(SEQ ID NO:10)

3. Uma sequência de articulação não contendo ciste-
ínas é primeiro clonada (como especificado em
5 PCT/GB2005/002892, ERKPPVEPPPPP) sobre a região VH A5 (Dek-
ker et al., 2003; Janssens et al., 2006). A articulação e VH
A5 são subsequente amplificadas usando um primer que é
homólogo com a extremidade 5' da região articulada e um pri-
mer homólogo para a extremidade 3' da região VH A5 incluín-
10 do o códon de interrupção (primer, resultando em um fragmen-
to D para fos (fig. 6 linha sólida) ou jun (fig. linha pon-
tilhada) de 400 pares de bases.

Primer 8: GAAAAACTAGAGTTCATCCTGGCTTCTGAGCGCAAACCACCA
(SEQ ID NO:11)

Primer 9: CAGAAAGTCATGAACCACGTTGCTTCTGAGCGCAAACCACCA
(SEQ ID NO:12)

Primer 10: GTCGAATTCTCATTCCGAGGAGACGGTGACCTGGGTC (SEQ ID
NO:13)

4. Fragmento A (fig. 6 linha sólida), B e D (fig. 6
15 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, des-
naturados 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 sequência 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. 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 4 pode ser aplicada para outros domínios de formação de homó- 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 polipeptídio, em que cada cadeia de polipeptídio compreende um domínio de ligação VH amino-terminal; um domínio de ligação VH amino-terminal; e um domínio de dimerização em que o domínio de dimerização carece de funcionalidade $C_{H2}-C_{H3}$.

2. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio de dimerização não tem um domínio CH_2-CH_3 engenheirado nem natural.

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.

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 modo que o complexo de ligação de polipeptídio é um homodímero.

5. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com 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 carboxi-terminal mostra a mesma especificidade; e a especificidade de ligação dos domínios VH amino-terminal e carboxi terminais 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 carboxi-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 carboxi-terminal mostram a mesma especificidade; e os domínios de ligação VH amino-terminal mostram diferente especificidade um do outro e aos domínios VH carboxi-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 carboxi-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 camas classe alter-
10 nativa de domínio de ligação de polipeptídio.

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 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
20 ligante.

14. Complexo de ligação de polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada cadeia de polipeptídio
25 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 carboxi-terminal adicionais *in tandem* e separados por um domínio de articulação flexível.

15 15. Polinucleotídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que 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.

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

17. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser transformada com um vetor 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 vetor 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) sequência(s) de codificação de o vetor 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 abzima, 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 intracampo.

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-
cessite de tratamento.

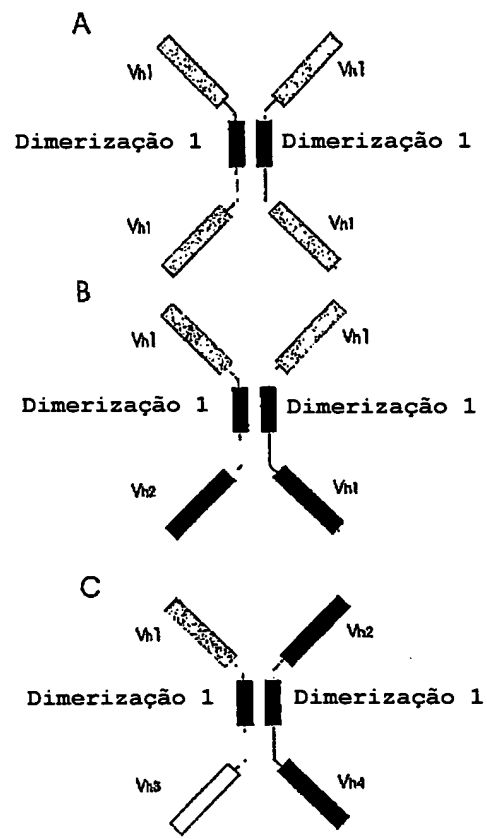


Figura 1

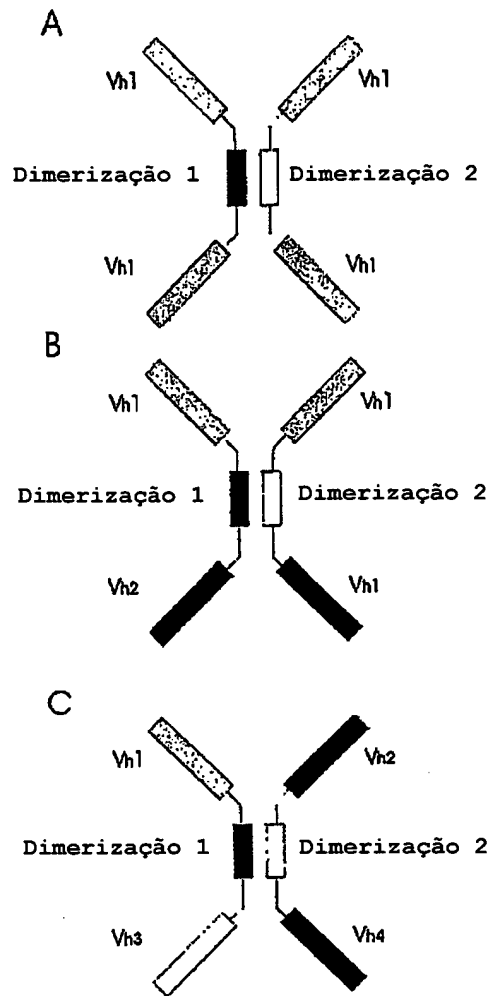


Figura 2

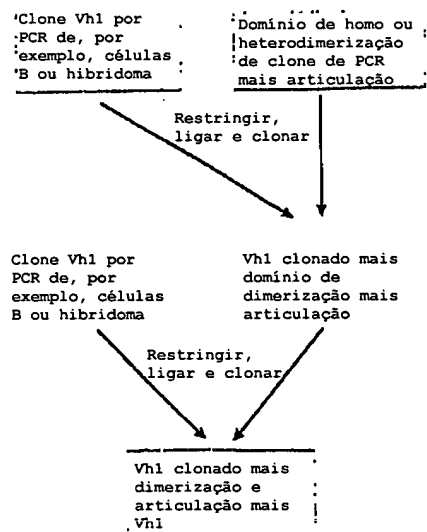


Figura 3

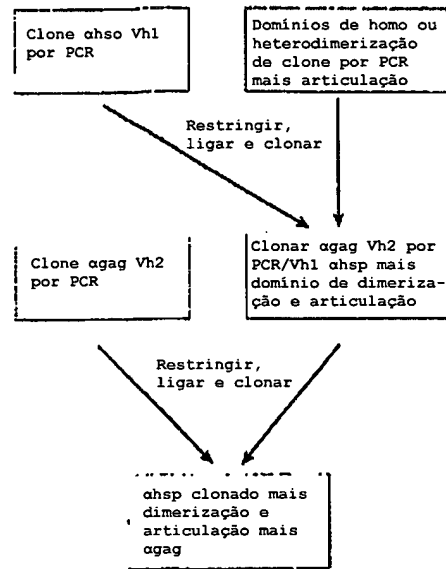


Figura 4

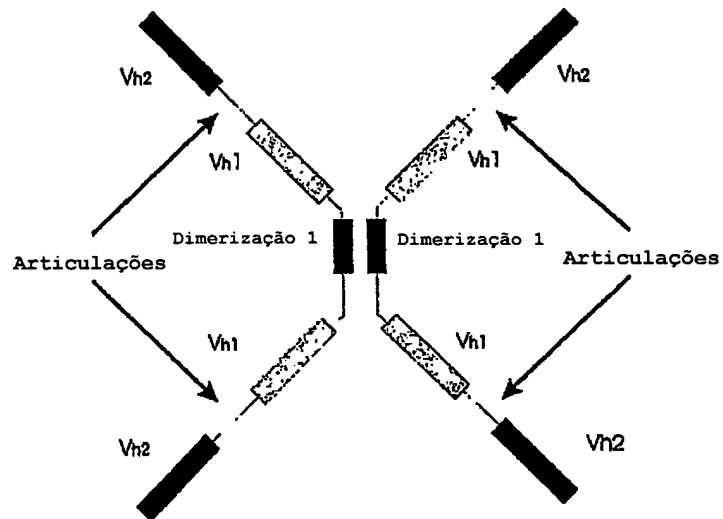


Figura 5

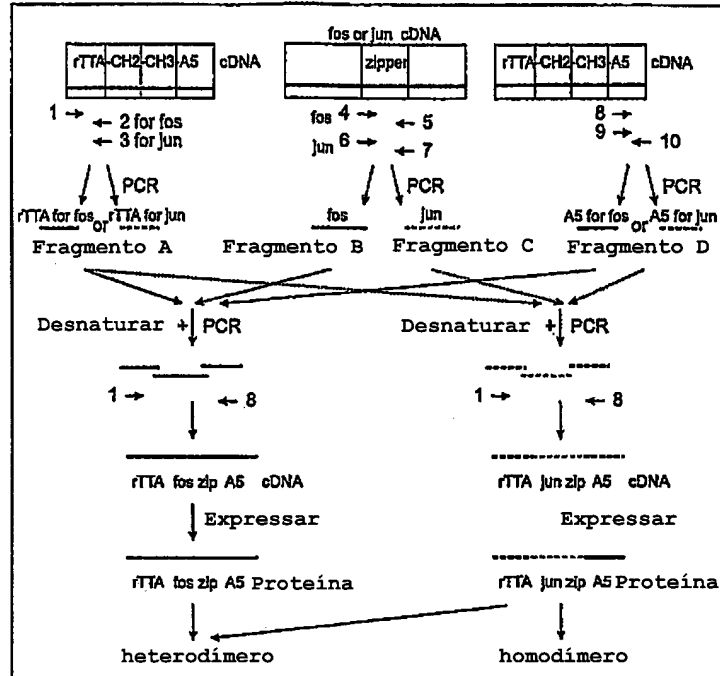


Figura 6

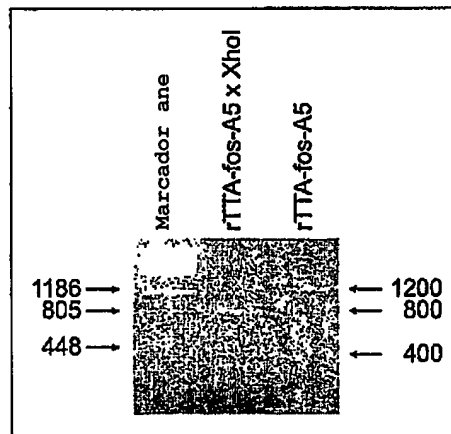


Figura 7

RESUMO"MOLECULAS 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. Preferi-
10 velmente 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 dime-
15 rização 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.