



(11) PI 0919840-7 B1

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

(22) Data do Depósito: 01/10/2009

(45) Data de Concessão: 28/02/2023

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(54) Título: MOLÉCULA DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA BIESPECÍFICA, SEU USO, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A COMPREENDE

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; C07K 16/22; C07K 16/30; C07K 16/40.

(30) Prioridade Unionista: 01/10/2008 US 61/101,846; 01/10/2008 US 61/101,850; 01/10/2008 US 61/101,844; 01/10/2008 US 61/101,853; 01/10/2008 US 61/101,933; (...).

(73) Titular(es): AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH.

(72) Inventor(es): SUSANNE MANGOLD; CLAUDIA BLÜMEL; PETER KUFER; TOBIAS RAUM; ROMAN KISCHEL; RALF LUTTERBÜSE; PATRICK HOFFMANN; DORIS RAU; MATTHIAS KLINGER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009062792 de 01/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/037835 de 08/04/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/04/2011

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA BIESPECÍFICA, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A COMPREENDE, BEM COMO SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR E HOSPEDEIRO. A presente invenção se refere a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico que compreende um primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítopo de cadeia de épsilon de C03 humano e de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, em que o epítopo é parte de uma sequência de aminoácido compreendida no grupo que consiste em SEQ ID Nos 2, 4, 6 e 8, e um segundo domínio de aglutinação a um antígeno selecionado a partir do grupo que consiste em Antígeno de Cédula Tronco de Próstata (PSCA), o antígeno de B-linfócito CD19 (CD19), receptor de fator de crescimento de hepatócito (C-MET), Endosialin, o domínio similar a EGF 1 de EpCAM, codificado por éxon 2, alfa de proteína de ativação de Fibroblasto (alfa de FAP) e receptor de fator de crescimento similar a Insulina I (IGF-IR ou IGF-1R). A invenção também fornece ácidos nucleicos que codificam a dita molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico bem como vetores e células hospedeiras e um processo para essa produção. A invenção se refere,(...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MOLÉCULA DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA BIESPECÍFICA, SEU USO, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A COMPREENDE**".

A presente invenção se refere a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico que compreende um primeiro domínio de aglutinação com capacidade de aglutinação a um epítopo de cadeia épsilon de CD3 de humanos e de primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee, em que o epítopo é parte de uma sequência de aminoácidos compreendida no grupo constituído por SEQ ID Nos. 2, 4, 6 e 8, e um segundo domínio de aglutinação com capacidade de aglutinação a um antígeno selecionado no grupo constituído por antígeno de células-tronco da próstata (PSCA), antígeno CD19 de linfócitos B (CD19), receptor do fator de crescimento do hepatócito (C-MET), Endosialin, o domínio 1 semelhante à EGF de EpCAM, codificado por éxon 2, proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP alfa) e receptor do fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-IR ou IGF-1 R). A invenção fornece ainda ácidos nucleicos que codificam a dita molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico, bem como vetores e células hospedeiras e um processo para a sua produção. A invenção se refere ainda a composições farmacêuticas que compreendem a dita molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico e a usos médicos da dita molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico.

O reconhecimento de células T é mediado por receptores de células T alfa-beta e gama-delta distribuídos clonotipicamente (TCR) que interagem com as moléculas carregadas com peptídeo do peptídeo MHC (pMHC) (Davis & Bjorkman, Nature 334 (1988), 395-402). As cadeias específicas de antígeno de TcR não possuem domínios de sinalização, mas em vez disso, são acopladas ao aparelho de sinalização de CD3 com múltiplas subunidades conservadas (Call, Cell 111 (2002), 967-979, Alarcon, Immunol. Rev. 191 (2003), 38-46, Malissen Immunol. Rev. 191 (2003), 7-27). O mecanismo pelo qual a aglutinação de TcR é diretamente comunicada com o aparelho de sinalização continua a ser uma questão fundamental na biologia de células T (Alarcon, loc. cit.; Davis, Cell 110

(2002), 285-287). Parece evidente que as respostas de células T sustentadas envolvem o acoplamento de correceptores, a oligomerização de TcR e uma disposição de ordem superior de complexos TcR-pMHC na sinapse imunológica (Davis & van der Merwe, *Curr. Biol.* 11 (2001), R289-R291, Davis, *Nat. Immunol.* 4 (2003), 217-224). No entanto, uma sinalização de TcR bastante precoce ocorre na ausência desses eventos e pode envolver uma mudança conformacional induzida por ligante na épsilon de CD3 (Alarcon, loc. cit., Davis (2002), loc. cit., Gil, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 11174-11179, Gil, *Cell* 109 (2002), 901-912). As subunidades épsilon, gama, delta e zeta do complexo de sinalização associam-se umas às outras para formar um heterodímero épsilon-gama de CD3, um heterodímero épsilon-delta de CD3 e um homodímero zeta-zeta de CD3 (Call, loc. cit.). Diversos estudos revelaram que as moléculas de CD3 são importantes para a expressão apropriada na superfície das células de TcR alfa-beta e para o desenvolvimento de células T normais (Berkhout, *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 8528-8536, Wang, *J. Exp. Med.* 188 (1998), 1375-1380, Kappes, *Curr. Opin. Immunol.* 7 (1995), 441-447). A estrutura da solução dos fragmentos do ectodomínio do heterodímero épsilon-gama de CD3 de camundongo mostraram que ambas as subunidades épsilon-gama são os domínios de Ig regulada por C2 que interagem uns com os outros para formar uma configuração de dímeros lado a lado incomum (Sun, *Cell* 105 (2001), 913-923). Embora o tronco rico em cisteína aparente desempenhar um papel importante na condução da dimerização de CD3 (Su, loc. cit., Borroto, *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 12807-12816), a interação por meio dos domínios extracelulares de épsilon de CD3 e gama de CD3 é suficiente para unir estas proteínas ao TcR beta (Manolios, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994), 84-92, Manolios & Li, *Immunol. Cell Biol.* 73 (1995), 532-536). Embora ainda controverso, a estequiometria dominante do TcR compreenda muito provavelmente um TcR alfa-beta, um heterodímero épsilon-gama de CD3, um heterodímero épsilon-delta de CD3 e um homodímero zeta-zeta de CD3 (Call, loc. cit.). Dado o papel central do homodímero épsilon-gama de CD3 humano na resposta imunológica, a estrutura cristalina da aglutinação deste complexo ao anticorpo terapêutico OKT3 foi

recentemente elucidada (Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680).

Inúmeras estratégias terapêuticas modulam a imunidade de células T por meio do direcionamento da sinalização de TcR, particularmente os anticorpos monoclonais CD3 anti-humanos (mAbs), que são amplamente usados clinicamente em regimes imunossupressores. O mAb de camundongo específico de CD3 OKT3 foi o primeiro mAb licenciado para uso em humanos (Sgro, Toxicology 105 (1995), 23-29) e é bastante usado clinicamente como um agente imunossupressor em transplantes (Chatenoud, Clin. Transplant 7 (1993), 422-430, Chatenoud, Nat. Rev. Immunol. 3 (2003), 123-132, Kumar, Transplant. Proc. 30 (1998), 1351-1352), type 1 diabetes (Chatenoud (2003), loc. cit.), and psoriasis (Utset, J. Rheumatol. 29 (2002), 1907-1913). Além disso, os mAbs anti-CD3 podem induzir a sinalização parcial de células T e a anergia clonal (Smith, J. Exp. Med. 185 (1997), 1413-1422). OKT3 foi descrito na literatura como um poderoso mitógeno de células T (Van Wauve, J. Immunol. 124 (1980), 2708-18), bem como um poderoso destruidor de células T (Wong, Transplantation 50 (1990), 683-9). OKT3 exibe ambas as atividades de forma dependente do tempo; após a ativação precoce de células T que levam à liberação de citocinas, mediante administração adicional, OKT3 bloqueia de forma tardia todas as funções conhecidas das células T. É devido a este bloqueio tardio das funções das células que OKT3 encontrou uma ampla aplicação como um imunossupressor nos regimes terapêuticos para a redução ou até mesmo a eliminação da rejeição do aloenxerto de tecido.

OKT3 reverte a rejeição do aloenxerto de tecido muito provavelmente por meio do bloqueio das funções de todas as células T, que desempenham um papel importante na rejeição aguda. OKT3 bloqueia e reage à função do complexo CD3 na membrana das células T humanas, que é associada à estrutura de reconhecimento do antígeno das células T (TCR) e é essencial para a transdução de sinal. Qual subunidade de TCR/CD3 é aglutinada por OKT3 tem sido objeto de vários estudos. Embora algumas evidências apontem para uma especificidade de OKT3 para a subunidade épsilon do complexo TCR/CD3 (Tunnacliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546-50; Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680). Outras evidências

mostraram que a aglutinação OKT3 do complexo TCR/CD3 exige a presença de outras subunidades deste complexo (Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52).

Outros anticorpos bastante conhecidos que são específicos para a molécula CD3 são listados em Tunnacliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546-50.

- 5 Conforme indicado anteriormente, estes anticorpos específicos para CD3 são capazes de induzir várias respostas de células T, como a produção de linfocinas (Von Wussow, J. Immunol. 127 (1981), 1197; Palacious, J. Immunol. 128 (1982), 337), proliferação (Van Waave, J. Immunol. 124 (1980), 2708-18) and suppressor-T cell induction (Kunicka, in "Lymphocyte Typing II" 1 (1986), 223). Isto é,
- 10 dependendo das condições experimentais, o anticorpo monoclonal específico para CD3 pode tanto inibir como induzir a citotoxicidade (Leewenberg, J. Immunol. 134 (1985), 3770; Phillips, J. Immunol. 136 (1986) 1579; Platsoucas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 4500; Itoh, Cell. Immunol. 108 (1987), 283-96; Mentzer, J. Immunol. 135 (1985), 34; Landegren, J. Exp. Med. 155 (1982), 1579; Choi (2001),
- 15 Eur. J. Immunol. 31, 94-106; Xu (2000), Cell Immunol. 200, 16-26; Kimball (1995), Transpl. Immunol. 3, 212-221).

- Embora muitos dos anticorpos CD3 descritos na técnica tenham demonstrado reconhecer a subunidade épsilon de CD3 do complexo CD3, a maioria destes se aglutina, de fato, a epítomos conformacionais e, portanto,
- 20 reconhecem apenas épsilon de CD3 no contexto nativo do TCR. Os epítomos conformacionais são caracterizados pela presença de dois ou mais resíduos de aminoácidos discretos, que são separados na sequência primária, mas se unem na superfície da molécula quando o polipeptídeo se dobra no interior da(o) proteína/antígeno nativa(o) (Sela, (1969) Science 166, 1365 and Laver, (1990) Cell
 - 25 61, 553-6). Os epítomos conformacionais aglutinados por anticorpos épsilon de CD3 descritos na técnica podem ser separados em dois grupos. No grupo principal, os ditos epítomos são formados por duas subunidades CD3, por exemplo, da cadeia épsilon de CD3 e a cadeia gama de CD3 ou delta de CD3. Por exemplo, foi descoberto em vários estudos que os anticorpos monoclonais épsilon de CD3
 - 30 mais amplamente usados OKT3, WT31, UCHT1, 7D6 e Leu-4 não se aglutinaram a

células individualmente transfectadas com a cadeia épsilon de CD3. No entanto, esses anticorpos coraram células duplamente transfectadas com uma combinação de épsilon de CD3 e gama de CD3 ou delta de CD3 (Tunnacliffe, loc. cit.; Law, Int. Immunol. 14 (2002), 389-400; Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52; Coulie, Eur. J. Immunol. 21 (1991), 1703-9). Em um segundo grupo menor, o epítopo conformacional é formado no interior da própria subunidade épsilon de CD3. Um elemento deste grupo é, por exemplo, mAb APA 1/1, que foi aumentado contra épsilon de CD3 desnaturado (Risueno, Blood 106 (2005), 601-8). Tomados em conjunto, muitos dos anticorpos épsilon de CD3 descritos na técnica reconhecem epítopos conformacionais localizados em duas ou mais subunidades de CD3. Os resíduos de aminoácidos discretos que formam a estrutura tridimensional destes epítopos podem, portanto, estar localizados tanto na própria subunidade épsilon de CD3 como na subunidade épsilon de CD3 e em outras subunidades de CD3, como gama de CD3 ou delta de CD3.

Outro problema com relação aos anticorpos CD3 é que muitos anticorpos CD3 demonstraram ser específicos de espécie. Anticorpos monoclonais anti-CD3 – como se aplica em geral para qualquer outro anticorpo monoclonal – funcionam por meio do reconhecimento altamente específico das suas moléculas-alvo. Estes reconhecem apenas um único sítio, ou epítopo, na sua molécula-alvo CD3. Por exemplo, um dos anticorpos monoclonais mais amplamente usados e melhor caracterizados que é específico para o complexo CD3 é o OKT-3. Este anticorpo reage com CD3 de chimpanzé, mas não com o homólogo de CD3 de outros primatas, como símios, ou com CD3 de caninos (Sandusky et al., J. Med. Primatol. 15 (1986), 441-451). De maneira similar, **WO2005/118635** ou **WO2007/033230** descreve anticorpos monoclonais épsilon de CD3 humano que reagem com épsilon de CD3 humano, mas não com épsilon de CD3 de camundongos, ratos, coelhos ou primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee, como macacos rhesus, macacos cynomolgus ou macacos babuínos. O anticorpo monoclonal anti-CD3 UCHT-1 também reage com CD3 de chimpanzés, mas não com CD3 de símios (dados próprios). Por outro lado,

também há exemplos de anticorpos monoclonais, que reconhecem antígenos de símios, mas não os seus correspondentes. Um exemplo deste grupo é o anticorpo monoclonal FN-18 direcionado ao CD3 de símios (Uda et al., J. Med. Primatol. 30 (2001), 141-147). Curiosamente, foi descoberto que os linfócitos periféricos de

5 cerca de 12% de macacos cynomolgus não apresentaram reatividade para o anticorpo monoclonal CD3 anti-macaco rhesus (FN-18) devido a um polimorfismo do antígeno CD3 em símios. Uda et al. descreveu uma substituição de dois aminoácidos na sequência CD3 de macacos cynomolgus, que não reagem com anticorpos FN-18, conforme comparado com o CD3 derivado dos animais, que

10 reagem com anticorpos FN-18 (Uda et al., J Med Primatol. 32 (2003), 105-10; Uda et al., J Med Primatol. 33 (2004), 34-7).

A capacidade de discriminação, isto é, a especificidade das espécies, inerente não apenas a anticorpos monoclonais CD3 (e seus fragmentos), mas a anticorpos monoclonais em geral, é um obstáculo significativo ao seu

15 desenvolvimento como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças humanas. A fim de obter aprovação do mercado, qualquer novo medicamento candidato deve passar por testes rigorosos. Esses testes podem ser subdivididos em fases pré-clínicas e clínicas: Enquanto estas – subdivididas ainda nas fases clínicas I, II e III geralmente conhecidas – são realizadas em pacientes humanos,

20 aquelas são realizadas em animais. O objetivo dos testes pré-clínicos é provar que a candidata a droga apresenta a atividade desejada e, mais importante, é segura. Somente quando a segurança em animais e a possível eficácia da candidata a droga tiverem sido estabelecidas nos testes pré-clínicos, esta candidata a droga será aprovada para testes clínicos em humanos pela respectiva autoridade

25 reguladora. Candidatas a drogas podem ser testadas quanto à segurança em animais nas seguintes três maneiras, (i) em uma espécie relevante, isto é, uma espécie em que as candidatas a drogas possam reconhecer os antígenos ortólogos, (ii) em um animal transgênico que contenha os antígenos humanos e (iii) por meio do uso de um substituto para a candidata a droga que possa se aglutinar

30 aos antígenos ortólogos presentes no animal. As limitações em relação aos

animais transgênicos são o fato de essa tecnologia ser tipicamente limitada a roedores. Entre roedores e humanos existem diferenças significativas quanto à fisiologia, e os resultados de segurança não podem ser facilmente transpostos para humanos. As limitações de um substituto para a candidata a droga são a diferente

5 composição da matéria em comparação com a verdadeira candidata a droga e, frequentemente, os animais usados são roedores com a limitação discutida anteriormente. Portanto, os dados pré-clínicos gerados com roedores são de poder preditivo limitado com relação à candidata a droga. A abordagem de escolha para testes de segurança é o uso de uma espécie relevante, preferivelmente um primata

10 inferior. A limitação atual dos anticorpos monoclonais apropriados para a intervenção terapêutica em humanos descrita na técnica é o fato de as espécies relevantes serem primatas superiores, em particular, chimpanzés. Os chimpanzés são considerados como espécies ameaçadas de extinção, e devido à sua natureza quase humana, o uso desses animais para testes de segurança de drogas foi

15 banido na Europa e é altamente restrito em outras localidades. CD3 também foi usado com sucesso como um alvo para anticorpos de cadeia única biespecíficos a fim de redirecionar células T citotóxicas para células patológicas, resultando na depleção das células doentes do respectivo organismo (WO 99/54440; WO 04/106380). Por exemplo, Bargou et al. (Science 321 (2008): 974-7) relatou

20 recentemente sobre a atividade clínica de um constructo de anticorpo biespecífico CD19xCD3 chamada de blinatumomab, que apresenta o potencial para unir todas as células T citotóxicas em pacientes humanos para a lise de células cancerosas. Doses baixas como 0,005 miligramas por metro quadrado diariamente em pacientes com linfoma não-Hodgkin levaram a uma eliminação de células-alvo no

25 sangue. As regressões parcial e total do tumor foram inicialmente observadas em um nível de dose de 0,015 miligramas, e todos os sete pacientes tratados em um nível de dose de 0,06 miligramas experimentaram uma regressão do tumor. Blinatumomab também levou à eliminação das células tumorais da medula óssea e do fígado. Embora este estudo tenha estabelecido uma prova de conceito clínico

30 da potência terapêutica do formato do anticorpo de cadeia única biespecífico no

tratamento de câncer derivado de células sanguíneas, ainda existe a necessidade de conceitos bem sucedidos para terapias de outros tipos de câncer.

Em 2008, estima-se que 186.320 homens serão recentemente diagnosticados com câncer de próstata nos Estados Unidos e cerca de 28.660 homens irão morrer devido a doença. O relatório mais recente disponível sobre a mortalidade por câncer mostra que, em 2004, o total de mortes por câncer de próstata entre os homens americanos foi de 25 por 100.000. No final dos anos 1980, a adoção generalizada do teste antígeno específico da próstata (PSA) representou uma melhoria significativa no controle do câncer de próstata. Este teste avalia a quantidade de proteína PSA no sangue, que é geralmente elevada em pacientes com câncer de próstata. Em 1986, a Administração de Drogas e Alimentos dos EUA aprovou o uso do teste PSA para monitorar pacientes com câncer de próstata e, em 1994, também aprovou o seu uso como um teste de triagem para esta doença. Devido à implantação generalizada dos testes PSA nos Estados Unidos, aproximadamente 90 por cento de todos os cânceres de próstata são atualmente diagnosticados em um estágio precoce, e, conseqüentemente, os homens estão sobrevivendo por mais tempo após o diagnóstico. No entanto, os resultados de dois exames clínicos em curso, o Exame de Triagem Prostática, Pulmonar, Colorretal, Ovariana (PLCO) patrocinada pelo NCI e o Estudo Europeu de Triagem para Câncer de Próstata (ERSPC) serão necessários para determinar se a triagem com PSA realmente salva vidas. Ensaio clínico em curso nos últimos 25 anos investigaram a eficácia de compostos naturais e sintéticos na prevenção do câncer de próstata. Por exemplo, o Exame de Prevenção do Câncer de Próstata (PCPT), que incluiu cerca de 19.000 homens saudáveis, constatou que a finasterida, uma droga aprovada para o tratamento da hiperplasia benigna da próstata (BPH), que é um aumento não canceroso da próstata, reduziu o risco de desenvolvimento do câncer de próstata em 25 por cento. Outro exame, o Exame de Prevenção do Câncer com Selênio e Vitamina E (SELECT), vem estudando mais de 35.000 homens para determinar se os suplementos diários de selênio e vitamina E podem reduzir a incidência de câncer de próstata em homens

saudáveis. Outros exames de prevenção do câncer de próstata vêm atualmente avaliando o potencial de proteção das multivitaminas, das vitaminas C e D, da soja, do chá verde e do licopeno, que é um composto natural encontrado nos tomates. Um estudo, relatado em 2005, mostrou que genes específicos foram fundidos em 5 60 a 80 por cento dos tumores de próstata analisados. Este estudo representa a primeira observação dos rearranjos gênicos não aleatórios no câncer de próstata. Esta alteração genética pode ser eventualmente empregada como um biomarcador para auxiliar no diagnóstico e, possivelmente, no tratamento dessa doença. Outros estudos mostraram que variações genéticas em uma região específica do 10 cromossoma 8 podem aumentar o risco de um homem desenvolver câncer de próstata. Essas variações genéticas são responsáveis por aproximadamente 25 por cento dos cânceres de próstata que ocorrem em homens brancos. Estas são as primeiras variantes genéticas validadas que aumentam o risco de desenvolvimento do câncer de próstata e podem ajudar os cientistas a 15 compreender melhor as causas genéticas dessa doença. Há também pesquisas em curso que examinam como as proteínas que circulam no sangue de um paciente podem ser usadas para melhorar o diagnóstico de câncer de próstata e de outros cânceres. Em 2005, cientistas identificaram um grupo de proteínas específicas que são produzidas pelo sistema imunológico de um paciente em 20 resposta a tumores de próstata. Estas proteínas, um tipo de autoanticorpo, foram capazes de detectar a presença de células de câncer de próstata em amostras de sangue com mais de 90 por cento de precisão. Quando usadas em combinação com o PSA, estas e outras proteínas do sangue podem ser eventualmente usadas para reduzir o número de resultados falso-positivos obtidos com os testes PSA 25 isolados e, portanto, para reduzir o grande número de biópsias de próstata desnecessárias que são realizadas a cada ano devido aos resultados falso-positivos do teste PSA.

Além do PSA, vários outros marcadores de câncer de próstata foram identificados, incluindo, por exemplo, o antígeno epitelial seis-transmembrana da 30 próstata (STEAP) (Hubert et al., PNAS 96 (1999), 14523-14528), o antígeno de

membrana específico da próstata (PSM/PSMA) (Israeli et al., Cancer Res. 53 (1993), 227-230) e o antígeno de células-tronco da próstata (PSCA) (Reiter et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 1735-1740, 1998). O antígeno de células-tronco da próstata (PSCA) é uma proteína do aminoácido 123 identificada inicialmente na

5 busca por genes regulados ascendentemente durante a progressão do câncer no modelo de xenoenxerto de próstata LAPC-4 (Reiter et al., loc. cit.). É uma proteína de superfície celular ancorada por glicosilfosfatidilinositol que pertence à família de antígenos de superfície Thy-1/Ly-6. PSCA tem 30% de homologia com o antígeno de células-tronco tipo 2. Embora a função do PSCA ainda esteja por ser elucidada,

10 os homólogos do PSCA têm atividades diversificadas, e foram propriamente implicados na carcinogênese. O antígeno de células-tronco tipo 2 demonstrou prevenir a apoptose em timócitos imaturos (Classon and Coverdale, PNAS 91 (1994), 5296-5300). Thy-1 ativa células T sinalizando por meio de tirosina quinases src (Amoui et al., Eur. J. Immunol. 27 (1997), 1881-86). Os genes Ly-6 foram

15 implicados na tumorigênese e na adesão celular (Schrijvers et al., Exp. Cell. Res. 196 (1991), 264-69). Estudos iniciais sobre RNA mensageiro e coloração posterior de anticorpos monoclonais (mAb) revelaram que o PSCA é expresso na superfície celular de células prostáticas normais e malignas (Reiter et al., loc. cit.; Gu et al., Oncogene 19 (2000), 1288-96; Ross et al., Cancer Res. 62 (2002), 2546-53). Em

20 uma próstata normal, mRNA de PSCA foi detectado em um subconjunto de células basais e secretoras. No carcinoma de próstata, a expressão de mRNA de PSCA foi detectada em aproximadamente 50-80% dos cânceres primários e aproximadamente 70% dos cânceres metastáticos (Reiter et al., loc. cit.). A imunohistoquímica foi relatada em 112 cânceres de próstata primários e em nove

25 cânceres de próstata com metástase óssea (Gu et al., loc. cit.). A expressão de PSCA foi detectada em 94% e houve superexpressão em 40% de cânceres de próstata clinicamente localizados. Níveis elevados de expressão da proteína PSCA também foram detectados em nove de nove metástases ósseas de câncer de próstata examinadas. Fora da próstata, o PSCA é detectado na camada de células

30 guarda-chuva do epitélio transicional, alguns dutos de coleta renal, células

neuroendócrinas do estômago e trofoblastos placentários. É importante ressaltar que estudos recentes relataram uma superexpressão de PSCA em grande proporção de cânceres pancreáticos e carcinomas de células transicionais invasivos e não invasivos (Amara et al., Cancer Res. 61 (2001), 4660-4665; Argani et al., Cancer Res. 61 (2001), 4320-24). Devido à sua expressão na superfície celular e à sua superexpressão em uma proporção substancial de cânceres variados, o PSCA tem sido discutido como alvo para estratégias de tratamento de câncer. No entanto, uma correlação clínica futura será necessária para validar esta possibilidade.

A expressão de certos antígenos CD é altamente restrita a células linfohematopoiéticas de linhagem específica e, ao longo dos últimos anos, anticorpos direcionados contra antígenos específicos de linfoides foram usados para desenvolver tratamentos que foram eficazes tanto em modelos de animais como *in vitro*. Neste contexto, CD19 provou ser um alvo bastante útil. CD19 é expresso em toda a linhagem B da pró-célula B à célula B madura, sem ser eliminado, é uniformemente expresso em todas as células do linfoma, e está ausente em células-tronco (Haagen, Clin Exp Immunol 90 (1992), 368-75, 14; Uckun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8603-7). O CD19 está envolvido no desenvolvimento de certas doenças mediadas por células B, como várias formas do linfoma não-Hodgkin, doenças autoimunes mediadas por células B ou a depleção de células B.

Outro exemplo de uma molécula que está envolvida na progressão e na propagação de inúmeros tipos de câncer humano é o receptor do fator de crescimento do hepatócito MET (C-MET). O oncogene *MET*, que codifica o receptor tirosina quinase (RTK) do fator de crescimento hepatócito (HGF) e do fator de dispersão (SF), controla programas genéticos que levam ao crescimento celular, invasão e proteção contra a apoptose. A ativação desregulada do MET é fundamental não apenas para a obtenção de propriedades tumorigênicas como também para a aquisição do fenótipo invasivo (Trusolino, L. & Comoglio, P. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2, 289–300). O papel do *MET* em tumores humanos

surgiu a partir de várias abordagens experimentais e foi inequivocamente comprovado pela descoberta de mutações ativadoras de *MET* em formas hereditárias de carcinomas (Schmidt et al., Nat. Genet. 16 (1997), 68–73; Kim et al., J. Med. Genet. 40 (2003), e97). A ativação constitutiva do MET é frequente em

5 cânceres esporádicos, e vários estudos mostraram que o oncogene *MET* é superexpresso em tumores de histotipos específicos ou é ativado por meio de mecanismos autócrinos (para obter uma lista consulte <http://www.vai.org/met/>). Além disso, o gene *MET* é ampliado em metástases hematogênicas de carcinomas colorretais (Di Renzo et al., Clin. Cancer Res. 1 (1995), 147–154).

10 O fator de dispersão (SF) secretado em cultura por fibroblastos, que tem capacidade para induzir a dissociação intercelular de células epiteliais, e o fator de crescimento hepatócito (HGF), um poderoso mitógeno para hepatócitos em cultura derivado de plaquetas ou do sangue de pacientes com insuficiência hepática aguda, independentemente identificados como ligantes Met, revelaram

15 ser a mesma molécula. Met e SF/HGF são amplamente expressos em uma variedade de tecidos. A expressão de Met (o receptor) é normalmente confinada a células de origem epitelial, enquanto a expressão de SF/HGF (o ligante) é restrito a células de origem mesenquimal.

Met é uma proteína transmembrana produzida como um precursor de

20 cadeia simples. O precursor é proteoliticamente clivado em um sítio da furina para produzir uma subunidade α altamente glicosilada e inteiramente extracelular de 50 kd e uma subunidade β de 145 kd com uma extensa região extracelular (envolvida na aglutinação do ligante), um segmento que atravessa a membrana e uma região intracelular (contendo a atividade catalítica) (Giordano (1989) 339: 155-156). As

25 cadeias α e β são ligadas por dissulfeto. A porção extracelular do Met contém uma região de homologia com semaforinas (domínio Sema, que inclui a cadeia completa α e a parte N-terminal da cadeia β do Met), uma sequência relacionada a Met rica em cisteína (MRS), seguida por repetições ricas em glicinoprolina (G-P) e quatro estruturas semelhantes à imunoglobulina (Birchmeier et al., Nature Rev. 4

30 (2003), 915-25). A região intracelular do Met contém três regiões: (1) um segmento

justamembrana que contém: (a) um resíduo de serina (Ser 985) que, quando fosforilado pela proteína quinase C ou pelas quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina, regula descendentemente a atividade do receptor quinase (Gandino et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), 1815-20); e (b) uma tirosina (Tyr 1003) que se aglutina à ubiquitina ligase Cbl responsável pela poliubiquitinação, endocitose e degradação do Met (Peschard et al., Mol. Cell 8 (2001), 995-1004); (2) o domínio tirosina quinase que, após a ativação do receptor, sofre transfosforilação em Tyr1234 e Tyr1235; (3) a região C-terminal, que compreende duas tirosinas fundamentais (Tyr1349 e Tyr1356) inseridas em um motivo degenerado que representa um sítio de interação multisubstrato com capacidade para recrutar vários adaptadores a jusante contendo o receptor Met dos domínios com homologia a Src 2 (SH2), uma vez que a maioria dos receptores tirosina quinase (RTKs) usa diferentes tirosinas para se aglutinar a moléculas de sinalização específicas. As duas tirosinas dos sítios de interação demonstraram ser necessárias e suficientes para a transdução de sinal tanto *in vitro* como *in vivo* (Maina et al., Cell 87 (1996), 531-542; Ponzetto et al., Cell 77 (1994), 261-71).

Embora candidatas a drogas pré-clínicas potentes e seletivas tenham sido desenvolvidas com o uso de C-MET como um alvo tumoral, exames clínicos de acompanhamento têm de revelar se estas drogas são de fato seguras e se apresentam eficácia terapêutica em humanos. Em função dessas incertezas, ainda há necessidade de novos conceitos terapêuticos sobre o câncer.

O câncer superou a doença cardíaca como a principal causa de morte entre americanos com menos de 85 anos, em 2005. Atualmente, o câncer ocupa uma posição abaixo das doenças cardiovasculares como a segunda causa principal de morte na Alemanha. A menos que sejam alcançadas mudanças drásticas na prevenção do câncer nos próximos anos em comparação com aquelas alcançadas em relação às doenças cardiovasculares, o câncer passará a ser a principal causa de morte na Alemanha dentro de 15-20 anos. A inibição da angiogênese tumoral é uma das estratégias anticâncer que mais gerou entusiasmo entre os médicos e cientistas que pesquisam o câncer nos últimos anos. No

decorrer desses esforços de pesquisa, diversos marcadores endoteliais de tumor foram identificados. Os marcadores endoteliais de tumor (TEMs) semelhantes à Endosialin (=TEM1 ou CD248) são superexpressos durante a angiogênese tumoral (St. Croix et al., Science 289 (2000), 1197-1202). Apesar do fato de as suas

5 funções não terem sido caracterizadas em detalhes até o presente momento, está bem estabelecido que estas são altamente expressas em células endoteliais vasculares em estudos sobre tumores e embriões em desenvolvimento (Carson-Walter et al., Cancer Res. 61: 6649-6655, 2001). Consequentemente, Endosialin, uma proteína transmembrana tipo I de 165 kDa, é expressa na superfície celular do

10 endotélio dos vasos sanguíneos do tumor em uma ampla variedade de cânceres humanos, mas não é detectada em vasos sanguíneos ou outros tipos de células em muitos tecidos normais. É uma molécula semelhante à lectina tipo C com 757 aminoácidos composta por um peptídeo sinal líder, cinco domínios globulares extracelulares (incluindo um domínio lectina tipo C, um domínio com similaridade

15 ao padrão Sushi/ccp/scr e três repetições EGF), seguido por uma região semelhante à mucina, um segmento transmembrana e uma cauda citoplasmática curta (Christian et al., J. Biol. Chem. 276: 7408-7414, 2001). A proteína do núcleo de Endosialin transporta oligossacarídeos ligados a O abundantemente sialilados e é sensível a sialoglicoproteína O endopeptidase, colocando-a no grupo das

20 moléculas semelhantes à sialomucina. Os 360 aminoácidos do N-terminal da Endosialin apresentam homologia com a trombomodulina, um receptor envolvido na regulação da coagulação sanguínea, e na complementação do receptor C1qRp. Esta relação estrutural indica uma função para a Endosialin como um receptor endotelial de tumor. Embora o mRNA da Endosialin seja ubiquamente expresso em

25 células endoteliais de tecidos somáticos humanos e murinos normais, a proteína Endosialin é amplamente restrita ao corpo lúteo e a tecidos altamente angiogênicos, como o tecido granular de feridas em cicatrização e tumores (Opavsky et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 38795-38807; Rettig et al., PNAS 89 (1992), 10832-36). A expressão da proteína Endosialin é regulada

30 ascendentemente em células endoteliais de tumor de carcinomas (mesotelioma de

mama, rim, pulmão, colorretal, cólon, pâncreas), sarcomas e tumores neuroectodérmicos (melanoma, glioma, neuroblastoma) (Rettig et al., loc. cit.). Além disso, a Endosialin é expressa em um nível baixo em um subconjunto de fibroblastos do estroma tumoral (Brady et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63 (2004), 1274-83; Opavsky et al., loc. cit.). Devido à sua limitada distribuição de tecido normal e à expressão abundante em células endoteliais de tumor de vários tipos diferentes de tumores sólidos, a Endosialin tem sido discutida como um alvo para estratégias de tratamento antiangiogênico de câncer baseadas em anticorpos. No entanto, até o presente momento, não existem abordagens terapêuticas eficazes que usem a Endosialin usando como um alvo endotelial tumoral.

Uma molécula que é bastante frequente e altamente expressa na maioria dos adenocarcinomas humanos e em diversas células de carcinoma de células escamosas é a EpCAM (CD326) (Went et al., Br. J. Cancer 94 (2006), 128-135). Estudos recentes mostraram que a EpCAM é uma molécula de sinalização que pode regular ascendentemente a expressão nuclear do proto-oncogene c-Myc e das ciclinas (Munz et al., Oncogene 23 (2004), 5748-58). Quando superexpressa em células quiescentes, a EpCAM induz a proliferação celular, a independência do fator de crescimento e o crescimento de colônias em ágar mole, que são características das proteínas oncogênicas. Quando a expressão de EpCAM é reduzida por um curto RNA de interferência (siRNA) em células de câncer de mama, estas células deixam de se proliferar, migram e passam a ser invasivas (Osta et al., Cancer Res. 64 (2004), 5818-24). Esta sinalização oncogênica de EpCAM pode explicar porque a superexpressão de EpCAM é correlacionada com uma sobrevida global inferior em uma série de malignidades humanas, incluindo o câncer de mama e de ovário (Spizzo et al., Gynecol. Oncol. 103 (2006), 483-8). EpCAM já foi empregado como um antígeno-alvo em várias abordagens terapêuticas baseadas em anticorpos, incluindo um anticorpo humano (Oberneder et al., Eur. J. Cancer 42 (2006), 2530-8) e um anticorpo biespecífico de cadeia única EpCAMxCD3, chamado de MT110. As características do MT110 foram recentemente descritas em detalhes (Brischwein et

al., 43 (2006), 1129-43). Este anticorpo é ativo contra uma variedade de linhagens de carcinomas humanos com expressão do antígeno-alvo e está atualmente sendo testado na fase I de um estudo quanto à segurança e aos primeiros sinais de eficácia.

5 Mais especificamente, o câncer superou a doença cardíaca como a principal causa de morte entre americanos com menos de 85 anos, em 2005. Atualmente, o câncer ocupa uma posição abaixo das doenças cardiovasculares como a segunda causa principal de morte na Alemanha. A menos que sejam alcançadas mudanças drásticas na prevenção do câncer nos próximos anos em
10 comparação com aquelas alcançadas em relação às doenças cardiovasculares, o câncer passará a ser a principal causa de morte na Alemanha dentro de 15-20 anos. Dentre os mais de 100 tipos das cânceres diferentes, o câncer epitelial é a principal causa de mortes por câncer na Alemanha. No câncer epitelial, a invasão e a metástase de células epiteliais malignas em tecidos normais são acompanhadas
15 por mudanças adaptivas no estroma de suporte derivado do mesênquima dos órgãos-alvo. A expressão gênica alterada nestas células estromais não transformadas tem sido discutida para oferecer alvos potenciais para terapia. A proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP alfa) da protease de superfície celular é um exemplo deste alvo de fibroblastos tumorais ativados. A proteína alfa
20 de ativação dos fibroblastos é uma glicoproteína de superfície celular induzível que foi originalmente identificada em fibroblastos cultivados com o uso do anticorpo monoclonal F19. Estudos imunohistoquímicos mostraram que a FAP alfa é transitoriamente expressa em certos tecidos mesenquimais fetais normais, mas que tecidos adultos normais, bem como células epiteliais malignas, neurais e
25 hematopoiéticas, são geralmente FAP alfa-negativas. No entanto, a maioria dos tipos comuns de cânceres epiteliais contém fibroblastos estromais FAP alfa-reativos em abundância. Scanlan et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 5657-5661, 1994) clonou um cDNA de FAP alfa a partir de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano WI-38 por imunoseleção com o uso do anticorpo F19. A
30 proteína FAP alfa humana de 760 aminoácidos predita é uma proteína integral de

membrana tipo II com um extenso domínio extracelular C-terminal, que contém 6 sítios de N-glicosilação potenciais, 13 resíduos de cisteína e 3 segmentos que correspondem a domínios catalíticos de proteases de serina altamente conservados; um segmento transmembrana hidrofóbico; e uma cauda citoplasmática curta. FAP-alfa mostra 48% de identidade de aminoácidos com a dipeptidil peptidase IV (DPP4) e 30% de identidade com a proteína relacionada à DPP4 (DPPX). A análise de Northern blot detectou um mRNA de FAP alfa de 2,8-kb em fibroblastos. A seprase é uma gelatinase integral de membrana de 170-kD cuja expressão se correlaciona com a invasividade das células de melanoma e de carcinoma humanas. Goldstein et al. (Biochim. Biophys. Acta 1361: 11-19, 1997) clonou e caracterizou o cDNA da seprase correspondente. Os autores descobriram que a seprase e a FAP alfa são a mesma proteína e produtos do mesmo gene. Pineiro-Sanchez et al. (J. Biol. Chem. 272: 7595-7601, 1997) isolou a seprase/proteína FAP alfa das membranas celulares e eliminou as vesículas de células LOX do melanoma humano. Os Inibidores da protease de serina bloquearam a atividade da gelatinase da seprase/FAP alfa, sugerindo que a seprase/FAP alfa contém um ou mais resíduos de serina cataliticamente ativos. Os autores descobriram que a seprase/FAP alfa é composta por subunidades monoméricas e N-glicosiladas de 97-kD que são proteoliticamente inativas. Eles concluíram que a seprase/FAP alfa é similar à DPP4 na medida em que suas atividades proteolíticas são dependentes da associação de subunidades. Devido à sua atividade de degradação da gelatina e do colágeno desnaturado por calor tipo I e tipo IV, foi sugerido um papel para a seprase/FAP alfa no remodelamento da matriz extracelular, crescimento tumoral e metástase de cânceres. Além disso, a seprase/FAP alfa mostra um padrão de expressão restrito em tecidos normais e uma expressão uniforme no estroma de suporte de muitos tumores malignos. Portanto, a seprase/FAP alfa pode ser usada como um alvo para a exploração do conceito de direcionamento do estroma tumoral para imunoterapia de câncer epitelial humano. No entanto, embora vários exames clínicos tenham sido iniciados para investigar o papel da seprase/FAP alfa como um alvo do antígeno tumoral, as

abordagens imunoterapêuticas convencionais ou a inibição da atividade enzimática da seprase/FAP alfa até agora não resultaram em qualquer efeito terapêutico (consulte, por exemplo, Welt et al., J. Clin. Oncol. 12:1193-203, 1994; Narra et al., Cancer Biol. Ther. 6, 1691-9, 2007; Henry et al., *Clinical Cancer Research* 13, 1736-1741, 2007).

O receptor do fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-IR ou IGF-1R) é um receptor com atividade de tirosina quinase em 70% de homologia com o receptor de insulina IR. O IGF-1R é uma glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 350.000. É um receptor heterotetramérico em que cada metade – ligada por pontes de dissulfeto – é composta por uma subunidade α extracelular e por uma subunidade [beta] transmembrana. IGF-1R se aglutina a IGF 1 e a IGF 2 com uma afinidade muito alta, mas é igualmente capaz de se aglutinar à insulina com uma afinidade 100 a 1.000 vezes menor. Reciprocamente, o 1R se aglutina à insulina com uma afinidade muito alta, embora os ICFs se aglutinem apenas ao receptor da insulina com uma afinidade 100 vezes menor. O domínio da tirosina quinase de IGF-1R e de 1R apresenta uma homologia de sequência muito alta, embora as zonas de menor homologia se refiram respectivamente à região rica em cisteína situada na subunidade alfa e na parte C-terminal da subunidade [beta]. As diferenças de sequência observadas na subunidade α estão situadas na zona de aglutinação dos ligantes e estão, portanto, na origem das afinidades relativas de IGF-1R e de 1R dos IGFs e da insulina, respectivamente. As diferenças na parte C-terminal da subunidade [beta] resultam em uma divergência nas vias de sinalização dos dois receptores; efeitos mitogênicos de mediação de IGF-1R, de diferenciação e de antiapoptose, enquanto a ativação do IR envolve principalmente efeitos no nível das vias metabólicas (Baserga et al., Biochim. Biophys. Acta, 1332: F105-126, 1997; Baserga R., Exp. Cell. Res., 253:1-6, 1999). As proteínas tirosina quinases citoplasmáticas são ativadas pela aglutinação do ligante ao domínio extracelular do receptor. A ativação das quinases, por sua vez, envolve a estimulação de diferentes substratos intracelulares, incluindo IRS-1, IRS-2, Shc e Grb 10 (Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999). Os dois

principais substratos de IGF-1R são IRS e Shc, que mediam, pela ativação de inúmeros efetores a jusante, a maioria dos efeitos de crescimento e diferenciação associados com a ligação dos IGFs a este receptor. A disponibilidade de substratos pode consequentemente determinar o efeito biológico final associado com a ativação do IGF-1R. Quando IRS-1 predomina, as células tendem a se proliferar e a se transformar. Quando Shc domina, as células tendem a se diferenciar (Valentinis B. et al.; J. Biol. Chem. 274:12423-12430, 1999). Aparentemente, a via envolvida principalmente nos efeitos de protecção contra a apoptose é a via das fosfatidilinositol 3-quinases (PI 3-quinases) (Prisco M. et al., Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999). O papel do sistema IGF na carcinogênese tornou-se objeto de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Esse interesse foi seguido pela descoberta do fato de que, além de suas propriedades mitogênicas e antiapoptóticas, o IGF-1R parece ser necessário para o estabelecimento e para a manutenção de um fenótipo transformado. De fato, foi bem estabelecido que uma superexpressão ou uma ativação constitutiva do IGF-1R leva, em uma grande variedade de células, a um crescimento das células, independente do suporte em um meio desprovido de soro fetal de bezerro, e à formação de tumores em camundongos nus. Esta por si só não constitui uma propriedade exclusiva, uma vez que uma grande variedade de produtos de genes superexpressos pode transformar células, incluindo um número considerável de receptores de fatores de crescimento. No entanto, a descoberta fundamental que demonstrou claramente o papel principal desempenhado pelo IGF-1R na transformação foi a demonstração de que as células R, nas quais o gene que codifica o IGF-1R foi inativado, são totalmente refratárias à transformação por diferentes agentes que normalmente são capazes de transformar as células, como a proteína E5 do vírus do papiloma bovino, uma superexpressão de EGFR ou de PDGFR, o antígeno T de SV 40, ativaram ras ou a combinação destes dois últimos fatores (Sell C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 11217-11221, 1993; Sell C. et al., Mol. Cell. Biol., 14:3604-3612, 1994; Morrione A. J., Virol., 69:5300-5303, 1995; Coppola D. et al., Mol. Cell. Biol.,

14:458a-4595, 1994; DeAngelis T et al., J. Cell. Physiol., 164:214-221, 1995).

IGF-1R é expresso em uma grande variedade de tumores e de linhagens tumorais, e os IGFs ampliam o crescimento tumoral por meio da sua ligação com o IGF-1R. Outros argumentos em favor do papel do IGF-1R na carcinogênese são provenientes de estudos que usam anticorpos monoclonais murinos direcionados contra o receptor ou que usam dominantes negativos do IGF-1R. Na realidade, os anticorpos monoclonais murinos direcionados contra o IGF-1R inibem a proliferação de inúmeras linhagens celulares em cultura e o crescimento de células tumorais *in vivo* (Arteaga C. et al., Cancer Res., 49:6237-6241, 1989; Li et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98, 1993; Zia F et al., J. Cell. Biol., 24:269-275, 1996; Scotlandi K et al., Cancer Res., 58:4127-4131, 1998). Foi igualmente demonstrado nos trabalhos de Jiang et al. (Oncogene, 18:6071-6077, 1999) que um dominante negativo do IGF-1R é capaz de inibir a proliferação do tumor.

Embora tenha havido muito esforço na identificação de alvos novos para abordagens terapêuticas para câncer, o câncer é ainda uma das doenças mais frequentemente diagnosticadas. À luz disso, ainda existe uma necessidade de tratamentos eficazes para o câncer.

A presente invenção fornece uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende um primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítipo de cadeia humana e de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, CD3 ϵ (épsilon), em que o epítipo é parte de uma sequência de aminoácidos incluída no grupo que consiste em SEQ ID N^{os} 2, 4, 6 e 8; e um segundo domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígeno de célula tronco da próstata (PSCA), antígeno CD19 (CD19) do linfócito B, receptor de fator de crescimento do hepatócito (C-MET), Endosialin, o domínio 1 de EpCAM similar ao EGF, codificado por exão 2, alfa proteína de ativação de fibroblasto (alfa FAP) e receptor 1 do fator de crescimento similar à insulina (IGF-IR ou IGF-1R).

Embora os anticorpos de cadeia única biespecíficos que se engatam

à célula T descrita na técnica tenham um grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças malignas, a maior parte dessas moléculas biespecíficas é limitada pelo fato de que são espécies específicas que reconhecem apenas o antígeno humano e devido à semelhança genética – provavelmente o correspondente do chimpanzé. A vantagem da presente invenção é a provisão de um anticorpo de cadeia única biespecífico que compreende um domínio de aglutinação que exibe a especificidade de espécies cruzadas em relação a um ser humano e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, da cadeia épsilon de CD3.

Na presente invenção, um fragmento do polipeptídeo do resíduo de aminoácidos de 1 a 27 de terminal N do domínio extracelular de épsilon de CD3 foi identificado surpreendentemente, o qual – em contraste a todos os outros epítomos conhecidos de épsilon de CD3 descritos na técnica – mantém sua integridade estrutural tri-dimensional quando retirado de seu ambiente nativo no complexo de CD3 (e, opcionalmente, fundido a uma sequência de aminoácidos heteróloga como EpCAM ou uma parte Fc da imunoglobina).

A presente invenção, portanto, fornece uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende um primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítomo de um fragmento do polipeptídeo do resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N do domínio extracelular do épsilon de CD3 (cujo épsilon de CD3 é, por exemplo, retirado de seu ambiente nativo e/ou composto por (apresentado sobre a superfície de) uma célula T) da cadeia de épsilon de CD3 humano e de pelo menos uma de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, em que o epítomo é parte de uma sequência de aminoácidos incluída no grupo que consiste em SEQ ID Nos 2, 4, 6 e 8; e um segundo domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um antígeno da membrana específica da próstata (PSMA). Os primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee, preferenciais são mencionados em outro momento no presente documento. Pelo menos um (ou uma seleção dos mesmos ou todos) o(s) primata(s) selecionado(s) dentre *Callithrix jacchus*; *Saguinus oedipus*, *Saimiri sciureus* e *Macaca fascicularis* (ou a SEQ ID 2225 ou

2226 ou ambas), é (são) particularmente preferencial (ais). *Macaca mulatta*, também conhecido como macaco rhesus também é contemplado como outro primata preferencial. Também é contemplado que anticorpos da invenção se aglutinem (sejam capazes de se aglutinarem a) ao epítopo independente do contexto de um fragmento do polipeptídeo do resíduo de aminoácido de terminal N 1 a 27 do domínio extracelular de épsilon de CD3 de ser humano e *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus*, *Saimiri sciureus* e *Macaca fascicularis* (ou SEQ ID 2225 ou 2226 ou ambas) e também, opcionalmente, *Macaca mulatta*. Uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífico que compreende um primeiro domínio de aglutinação conforme definido no presente documento pode ser obtida (é obtível por) ou pode ser fabricada de acordo com o protocolo estabelecido nos exemplos em anexo (em particular, no exemplo 2). Para esse fim, é contemplado (a) imunização de camundongos com um fragmento do polipeptídeo do resíduo de aminoácido de terminal N 1 a 27 do domínio extracelular do épsilon de CD3 de ser humano e/ou *Saimiri sciureus*; (b) geração de uma biblioteca de scFv de anticorpo murino imune; (c) identificação de aglutinadores específicos de épsilon de CD3 através do teste da capacidade de se aglutinar a pelo menos SEQ ID N^{os} 2, 4, 6 e 8.

A independência do contexto do epítopo CD3 fornecido nessa invenção corresponde aos primeiros 27 aminoácidos de terminal N de épsilon de CD3 ou fragmentos funcionais desse trecho de 27 aminoácidos. A expressão "independente do contexto," conforme usada no presente documento em relação ao epítopo CD3 significa que a aglutinação do presente documento que descreve moléculas de anticorpo/moléculas de aglutinação da invenção não leva a uma alteração ou modificação da conformação, sequência ou estrutura que circunda o determinante antigênico ou epítopo. Em contraste, o epítopo CD3 reconhecido por uma molécula de aglutinação de CD3 convencional (por exemplo, conforme descrito em WO 99/54440 ou WO 04/106380) está localizado na cadeia de épsilon de CD3 terminada em C até os aminoácidos 1 a 27 de terminal N do epítopo independente do contexto, em que o mesmo assume a conformação correta se

estiver embutido no resto da cadeia de épsilon e mantido na posição estérica direita por heterodimerização da cadeia de épsilon com a cadeia gama de CD3 ou cadeia delta de CD3.

Os domínios/moléculas de aglutinação anti-CD3 como parte de uma
5 molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica conforme fornecida no presente documento e gerada (e direcionada) contra um epítipo CD3 independente do contexto fornecem um aprimoramento clínico surpreendente em relação à redistribuição da célula T e, dessa forma, fornece um perfil seguro mais favorável. Sem se vincular à teoria, visto que o epítipo CD3 é independente do contexto,
10 formando um subdomínio auto-suficiente autônomo sem muita influência no restante do complexo de CD3, as moléculas/domínios de aglutinação de CD3 fornecidos no presente documento causam menos alterações alostéricas na conformação de CD3 do que as moléculas de aglutinação de CD3 convencionais, que reconhecem os epítopos de CD3 independentes do contexto (por exemplo,
15 conforme descrito em WO 99/54440 ou WO 04/106380).

A independência do contexto do epítipo CD3 que é reconhecido pelo domínio de aglutinação de CD3 do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção (PSCA $\times$ CD3, CD19 $\times$ CD3, C-MET $\times$ CD3, Endosialin $\times$ CD3, EpCAM $\times$ CD3, IGF-1R $\times$ CD3 ou FAP α $\times$ CD3) está associada com a menor ou nenhuma
20 redistribuição da célula T (redistribuição da célula T se iguala ao episódio inicial de queda e recuperação subsequente das contagens absolutas da célula T) durante a fase inicial do tratamento com os ditos anticorpos de cadeia única biespecíficos da invenção. Isso resulta em um melhor perfil seguro dos anticorpos de cadeia única biespecíficos da invenção comparados às moléculas de aglutinação de CD3
25 convencionais conhecidas na técnica, que reconhecem os epítopos de CD3 dependentes do contexto. Particularmente, devido à redistribuição da célula T durante a fase inicial do tratamento com as moléculas de aglutinação de CD3 ser o principal fator de risco para eventos adversos, como eventos adversos de CNS, os anticorpos de cadeia única biespecíficos da invenção têm uma vantagem segura
30 substancial sobre as moléculas de aglutinação de CD3 conhecidas na técnica

através do reconhecimento de um epítopo CD3 independente do contexto ao invés de um epítopo CD3 dependente do contexto. Os pacientes com tais eventos adversos de CNS relacionados à redistribuição da célula T durante a fase inicial do tratamento com moléculas de aglutinação de CD3 convencionais usualmente

5 sofrem de confusão e desorientação, em alguns casos, também de incontinência urinária. A confusão é uma alteração no estado mental em que o paciente não é capaz de pensar com seu nível usual de clareza. O paciente geralmente tem dificuldades para se concentrar e o pensamento não apenas é nebuloso e não evidente, mas frequentemente reduzido. Os pacientes com eventos adversos de

10 CNS relacionados à redistribuição da célula T durante a fase inicial do tratamento com moléculas de aglutinação de CD3 convencionais também podem sofrer de perda de memória. Frequentemente, a confusão leva à perda da capacidade de reconhecer as pessoas, lugares, tempo ou datas. Os sentimentos de desorientação são comuns na confusão e a capacidade de tomar decisões é prejudicada. Os

15 eventos adversos de CNS relacionados à redistribuição da célula T durante a fase inicial do tratamento com moléculas de aglutinação de CD3 convencionais podem compreender adicionalmente a fala nebulosa e/ou dificuldades em encontrar palavras. Esse distúrbio pode prejudicar tanto a expressão e a compreensão da linguagem assim como a leitura e a escrita. Além da incontinência urinária, a

20 tonteira e vertigem também podem fazer parte dos eventos adversos CNS relacionados à redistribuição da célula T durante a fase inicial do tratamento com moléculas de aglutinação de CD3 convencionais em alguns pacientes.

A manutenção da estrutura tri-dimensional no mencionado fragmento de épsilon de CD3 de polipeptídeo de terminal N de 27 aminoácidos pode ser

25 usada para a geração de domínios de aglutinação, de preferência humanos, que são capazes de se aglutinar ao fragmento de polipeptídeo de épsilon de CD3 de terminal N *in vitro* e ao (subunidade de épsilon de CD3 do) complexo de CD3 nativo nas células T *in vivo* com a mesma afinidade de aglutinação. Esses dados indicam fortemente que o fragmento de terminal N, conforme descrito no presente

30 documento, forma uma conformação terciária, que é similar à sua estrutura que

existe normalmente *in vivo*. Um teste muito sensível para a importância da integridade estrutural dos aminoácidos de 1 a 27 do fragmento de épsilon de CD3 do polipeptídeo de terminal N foi executado. Os aminoácidos individuais dos aminoácidos de 1 a 27 do fragmento de épsilon de CD3 do polipeptídeo de terminal

5 N foram alterados para alanina (varredura de alanina) para testar a sensibilidade dos aminoácidos de 1 a 27 do fragmento de épsilon de CD3 do polipeptídeo de terminal N para interrupções secundárias. Os domínios de aglutinação de CD3 como parte dos anticorpos de cadeia única biespecíficos da invenção foram usados para testar a aglutinação aos mutantes alanina de aminoácidos 1 a 27 do

10 fragmento de épsilon de CD3 do polipeptídeo de terminal N (ver exemplo 5 em anexo). As trocas individuais dos primeiros cinco resíduos de aminoácido na extremidade máxima do terminal N do fragmento e duas dos aminoácidos nas posições 23 e 25 dos aminoácidos 1 a 27 do fragmento de épsilon de CD3 do polipeptídeo de terminal N foram críticas para a aglutinação das moléculas d

15 anticorpo. A substituição dos resíduos de aminoácido na região da posição 1 a 5 que compreende os resíduos Q (Glutamina na posição 1), D (ácido aspártico na posição 2), G (Glicina na posição 3), N (Asparagina na posição 4) e E (ácido glutâmico na posição 5) por Alanina aboliu a aglutinação dos anticorpos de cadeia única biespecíficos, de preferência humanos, da invenção ao dito fragmento.

20 Enquanto que, para pelo menos alguns dos anticorpos de cadeia única biespecíficos, de preferência humanos, da invenção, dois resíduos de aminoácidos na terminação C do fragmento T mencionado (Treonina na posição 23) e I (Isoleucina na posição 25) reduziram a energia de aglutinação para os anticorpos de cadeia única biespecíficos, de preferência humanos, da invenção.

25 Inesperadamente, descobriu-se que os anticorpos, então isolados, de cadeia única biespecíficos, de preferência humanos, da invenção, não apenas reconhecem o fragmento de épsilon de CD3 de terminal N humano, mas também os fragmentos de épsilon de CD3 homólogos correspondentes de vários primatas, incluindo macacos do Novo Mundo (*Marmoset*, *Callithrix jacchus*; *Saguinus*

30 *oedipus*; *Saimiri sciureus*) e macacos do Velho Mundo (*Macaca fascicularis*,

também conhecido como macaco cinomolgo; ou *Macaca mulatta*, também conhecido como macaco rhesus). Dessa forma, a especificidade de multi-primatas dos anticorpos de cadeia única biespecíficos da invenção foi detectada. As seguintes análises de sequência confirmaram que humanos e primatas

5 compartilham um trecho de sequência altamente homóloga na terminação N do domínio extracelular de épsilon de CD3.

As sequências de aminoácidos dos fragmentos de épsilon de CD3 de terminal N mencionadas acima são descritas na SEQ ID N° 2 (humana), SEQ ID N° 4 (*Callithrix jacchus*); SEQ ID N° 6 (*Saguinus oedipus*); SEQ ID N° 8 (*Saimiri sciureus*); SEQ ID N° 2225 QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTILTC ou SEQ ID N°

10 2226 QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILT (*Macaca fascicularis*, também conhecido como macaco cinomolgo), e SEQ ID N° 2227 QDGNEEMGSITQTPYHVSISGTTVILT (*Macaca mulatta*, também conhecido como macaco rhesus).

15 Em uma modalidade da invenção, o segundo domínio de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, PSCAxCD3, se aglutina ao antígeno de célula tronco da próstata (PSCA). Em modalidades alternativas, o segundo domínio de aglutinação se aglutina ao CD19, C-MET, Endosialin (CD248), EpCAM, FAP α ou IGF-1R. Conforme mostrado nos seguintes exemplos, o

20 segundo domínio de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, EpCAMxCD3, se aglutina aos resíduos de aminoácido 26 a 61 do domínio 1 de EpCAM semelhante ao EGF, que é codificado por exão 2 do gene EpCAM. Os ditos resíduos de aminoácido 26 a 61 do domínio 1 de EpCAM humano semelhante ao EGF são mostrados na SEQ ID N° 571. Assim, as

25 moléculas de cadeia única biespecíficas direcionadas a EpCAM dessa invenção formam uma classe própria única de moléculas de aglutinação de EpCAM, que é claramente diferenciada das moléculas de aglutinação de EpCAM com base no aglutinador HD69 de EpCAM descrito anteriormente. O dito aglutinador HD69 de EpCAM se aglutina a um epítipo diferente (isto é, um epítipo não localizado no

30 domínio 1 de EpCAM humano semelhante ao EGF).

De preferência, o segundo domínio de aglutinação (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) do anticorpo de cadeia única biespecífico PSCAxCD3 se aglutina ao PSCA humano (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) ou a um PSCA de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α); com mais preferência se aglutina ao PSCA humano (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) e a um PSCA de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) e, portanto, é um específico de espécie cruzada; com mais preferência ainda a um PSCA humano (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) e ao PSCA símio (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) (e, portanto, também é específico de espécie cruzada). Particularmente preferencial, o PSCA símio (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) é o PSCA de macaco cinomolgo (respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) e/ou o PSCA de maca rhesus (respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α). Deve ser compreendido, que o segundo domínio de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção EpCAMxCD3, de preferência se aglutine ao domínio 1 semelhante ao EGF do EpCAM de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee que é codificado por exão 2 do gene de EpCAM de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee. Conforme indicado acima, o EpCAM de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee é, de preferência, um EpCAM de símio, com mais preferência o EpCAM de macaco cinomolgo e/ou o EpCAM de macaco rhesus.

Entretanto, não é excluído do escopo da presente invenção, que o segundo domínio de aglutinação possa se aglutinar aos homólogos de PSCA (respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) de outras espécies, como ao PSCA de chimpanzé (respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) ou ao homólogo de PSCA (respectivamente

CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) em roedores.

Será compreendido que em uma modalidade preferencial, a especificidade de espécies cruzadas do primeiro e segundo domínios de aglutinação dos anticorpos da invenção é idêntica.

5 O câncer de próstata é o segundo câncer mais predominante nos homens. Para 2008, estimou-se que 186.320 homens seriam diagnosticados com câncer de próstata nos Estados Unidos e cerca de 28.660 homens morreriam da doença (ver, por exemplo, <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/próstata>). O risco de câncer de próstata é fortemente relacionado à idade: pouquíssimos casos
10 são registrados em homens com idade abaixo de 50 anos e três quartos dos casos ocorrem em homens acima de 65 anos. O grande número de casos é diagnosticado naqueles com idade de 70 a 74. Atualmente, a taxa de crescimento da população mais idosa é significativamente maior do que o da população total. Para 2025 a 2030, as projeções indicam que a população acima dos 60 anos
15 crescerá 3,5 vezes mais rápido do que a população total. A proporção de pessoas mais velhas é projetada para mais do que o dobro mundial pelo próximo meio século, o que significa que um aumento adicional na incidência de câncer de próstata diagnosticado deve ser esperado. Entretanto, o PSCA não é apenas um alvo de câncer de próstata. Especialmente, a superexpressão de PSCA também é
20 encontrada em câncer da bexiga (Amara et al., Cancer Res 61 (2001): 4660 a 4665) e em câncer pancreático (Argani et al., Cancer Res 61 (2001): 4320 a 4324). À luz do que foi citado acima, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção PSCAxCD3 fornece uma ferramenta vantajosa a fim de exterminar as células de câncer que expressam PSCA de, incluindo, mas não se limitando a, câncer de
25 próstata, câncer da bexiga ou câncer pancreático em seres humanos. Conforme mostrado nos seguintes exemplos, a atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção PSCAxCD3 é maior do que a atividade citotóxica dos anticorpos descritos na técnica.

Vantajosamente, a presente invenção fornece também anticorpos de
30 cadeia única biespecíficos PSCAxCD3 que compreendem um segundo domínio de

aglutinação que se aglutina ao PSCA humano e ao homólogo de PSCA símio, isto é, o homólogo de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico, então, compreende um segundo domínio de aglutinação que exibe a especificidade de espécies cruzadas em relação ao antígeno de célula tronco da próstata (PSCA) de um ser humano e de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Nesse caso, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica idêntica pode ser usada tanto para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas quanto para as drogas em seres humanos. Em outras palavras, a mesma molécula pode ser usada em estudos animais pré-clínicos bem como em estudos clínicos em seres humanos. Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma força de previsão muito elevada dos estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies. Visto que os domínios de aglutinação de PSCA e de CD3 do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção PSCAxCD3 são específicos de espécies cruzadas, isto é, reagem com seres humanos e primatas não pertencentes ao gênero Chimpazee, esses podem ser usados tanto para a avaliação pré-clínica do perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético nesses domínios de aglutinação em primatas como – na forma idêntica – drogas em seres humanos.

CD19 é uma molécula de superfície celular expressa apenas por linfócitos B e células dendríticas foliculares do sistema hematopoiético. Foi a mais precocemente dentre os antígenos restritos à linhagem B a ser expressa e está presente na maior parte das células de leucemia linfocíticas agudas de células pré-B e na maior parte das células de leucemia linfocíticas agudas de célula não T e nas células de leucemia linfocíticas crônicas do tipo célula B.

Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção compreende um segundo domínio de aglutinação que exibe uma especificidade de espécies cruzadas em relação ao CD19 de um primata humano e de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Nesse

caso, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica idêntica pode ser usada tanto para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas como drogas em seres humanos. Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma força de

5 previsão muito elevada dos estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies. Visto que nessa modalidade os domínios de aglutinação de CD3 e de CD19 do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção CD19xCD3 são específicos de espécies cruzadas, isto é, reagem com o ser humano e primatas não pertencentes ao gênero Chimpazee, esses podem ser

10 usados tanto para a avaliação pré-clínica do perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas como – na forma idêntica – drogas em seres humanos.

Conforme descrito no presente documento acima, o oncogene *MET*, codifica o receptor tirosina cinase (RTK) para o fator de crescimento hepatócito

15 (HGF) e para o fator de espalhamento (SF), controla programas genéticos levando ao crescimento celular, invasão e proteção contra a apoptose. Conforme mostrado nos exemplos a seguir, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção C-METxCD3, então, fornece uma ferramenta vantajosa com a finalidade de exterminar a células de câncer que expressam C-MET, conforme exemplificado

20 pela linhagem celular de câncer de mama C-MET humano, MDA-MB-231. A atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção C-METxCD3 é maior do que a atividade citotóxica dos anticorpos descritos na técnica. Desde que, de preferência, os domínios de aglutinação de CD3 e de C-MET do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção C-METxCD3 sejam

25 específicos de espécies cruzadas, isto é, reajam com os antígenos do primata humano e do primata não pertencente ao gênero Chimpazee, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção C-METxCD3 pode ser usado para avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e - na forma idêntica - como drogas em seres

30 humanos.

Vantajosamente, a presente invenção fornece em uma modalidade alternativa adicional os anticorpos de cadeia única biespecíficos C-METxCD3 que compreendem um segundo domínio de aglutinação que se aglutina tanto ao homólogo de C-MET humano quanto ao homólogo de C-MET símio, isto é, o

5 homólogo de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico compreende, então, um segundo domínio de aglutinação que exibe uma especificidade de espécies cruzadas em relação ao primata humano e a um primata não pertencente ao gênero Chimpazee C-MET. Nesse caso, a molécula de anticorpo de cadeia

10 única biespecífica idêntica pode ser usada para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e como drogas em seres humanos. Em outras palavras, a mesma molécula pode ser usada em estudos animais pré-clínicos bem como em estudos clínicos em seres humanos. Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma

15 força de previsão muito elevada dos estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies. Desde que o os domínios de aglutinação de CD3 e de C-MET do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção C-METxCD3 sejam específicos de espécies cruzadas, isto é, reajam com os antígenos humanos e de primatas não pertencentes ao gênero Chimpazee, esses

20 podem ser usados para uma avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e - na forma idêntica - como drogas em seres humanos.

A angiogênese, isto é, a formação de novos capilares, é essencial para uma quantidade de eventos fisiológicos importantes, tanto animal quanto

25 patológica. Recentemente, uma atenção maior concentrou-se na purificação e caracterização de inibidores desse processo, devido ao valor terapêutico potencial de inibidores de angiogênese no controle de tumores sólidos. Devido à sua distribuição de tecido normal restrita e expressão abundante em células endoteliais tumorais de muitos tipos diferentes de tumores sólidos, o Endosialin pode ser

30 usado como um alvo para as estratégias de tratamento do câncer anti-angiogênico

com base no anticorpo. Em particular, o alvejamento de células endoteliais tumorais ao invés das células cancerosas tem a vantagem de que a expressão alvo nas células endoteliais não transformadas dos vasos sanguíneos do tumor é mais estável do que a expressão alvo nas células cancerosas geneticamente instáveis. O anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção fornece uma ferramenta vantajosa com a finalidade de inibir a formação de novos capilares em tumores sólidos, os quais exercem um papel principal no auxílio ao crescimento dos tumores. Nessa abordagem terapêutica inovadora e inventiva, não são as células tumorais que são alvejadas, mas os vasos sanguíneos do tumor. O anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção recruta as células T citotóxicas para as células endoteliais positivas de Endosialin em tumores, incluindo, mas não se limitando a, carcinomas (de mama, dos rins, do pulmão, colorretal, do colo, mesotelioma do pâncreas), sarcomas e tumores neuroectodermiais (melanoma, glioma, neuroblastoma), resultando na depleção das células endoteliais que expressam Endosialin do tumor. Nesse modo, a angiogênese tumoral é inibida, resultando na regressão do tumor ou até mesmo na depleção do mesmo. Conforme mostrado nos exemplos a seguir, a atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção é maior do que a atividade dos anticorpos descritos na técnica. Desde que o crescimento de neoplasmas sólidos exija o recrutamento de vasos sanguíneos auxiliares, o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção fornece uma abordagem inovadora e inventiva para o extermínio e alvejamento endotelial tumoral.

Vantajosamente, a presente invenção fornece também anticorpos de cadeia única biespecíficos EndosialinxCD3 que compreendem um segundo domínio de aglutinação que se aglutina tanto ao homólogo de Endosialin humano quanto ao homólogo de Endosialin símio, isto é, o homólogo de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico compreende, então, um segundo domínio de aglutinação que exibe a especificidade de espécies cruzadas em relação ao

Endosialin de primata humano e a um Endosialin de primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Nesse caso, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica idêntica pode ser usada para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e como drogas em seres humanos. Em outras palavras, a mesma molécula pode ser usada em estudos animais pré-clínicos bem como em estudos clínicos em seres humanos. Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma força de previsão mais elevada dos estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies. Desde que os domínios de aglutinação de CD3 e de Endosialin do anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção sejam específicos de espécies cruzadas, isto é, reajam com os primatas humano e não pertencente ao gênero Chimpazee, esses podem ser usados para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e – na forma idêntica – como uma droga em seres humanos.

A EpCAM foi recentemente descoberta por ser expressa nas assim chamadas “células-tronco cancerosas” (Dalerba et al., PNAS 104 (2007), 10158 a 63; Dalerba et al., Ann. Rev. Med. 58 (2007), 267 a 84). À luz disso, o anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção não apenas fornece uma ferramenta vantajosa com a finalidade de exterminar as células cancerosas que expressam EpCAM em câncer epitelial ou em câncer residual mínimo, mas também é útil para a eliminação do suposto culpado responsável pela reincidência do tumor após a terapia. Em adição, a atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção é maior do que a atividade citotóxica dos anticorpos descritos na técnica.

Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção compreende um segundo domínio de aglutinação que exhibe especificidade de espécies cruzadas em relação aos EpCAM de primatas humano e não pertencente ao gênero Chimpazee. Nesse caso, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica idêntica pode ser usada tanto para a

avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e como droga em seres humanos. Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma força de previsão muito elevada dos estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies.

- 5 Desde que nessa modalidade tanto os domínios de aglutinação de CD3 e de EpCAM do anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção sejam específicos de espécies cruzadas, isto é, reajam com os primatas humano e não pertencente ao gênero Chimpazee, esses podem ser usados para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de
10 aglutinação em primatas e – na forma idêntica – como droga em seres humanos.

- O anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção fornece uma ferramenta vantajosa com a finalidade de atacar o estroma de tumores sólidos, como tumores epiteliais, que exercem um papel principal no auxílio ao crescimento e neovascularização dos tumores. Nessa abordagem
15 terapêutica inventiva e inovadora, não são as células tumorais que são alvejadas, mas os fibroblastos estromais ativados. Estudos anteriores mostraram que a maioria dos tipos comuns de cânceres epiteliais, incluindo mais do que 90% de carcinomas colorretais, de pulmão e de mama malignos e primários, contém abundantes fibroblastos estromais reativos a alfa FAP (Scanlan et al., PNAS 91
20 (1994), 5657 a 5661 e referências citadas do mesmo). Em contraste, tecidos normais e lesões epiteliais pré-malignas e benignas raramente somente contêm células estromais positivas de alfa FAP. O anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção recruta as células T citotóxicas para os fibroblastos estromais ativados positivos de alfa FAP em tumores epiteliais malignos e
25 primários, resultando na depleção das células estromais a partir do tumor. Em particular, o alvejamento das células estromais tumorais ao invés das células cancerosas tem a vantagem que a expressão alvo nas células estromais não transformadas é mais estável do que a expressão alvo nas células cancerosas geneticamente instáveis. Conforme mostrado nos seguintes exemplos, a atividade
30 citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção é

maior do que a atividade dos anticorpos descritos na técnica. Visto que o crescimento de neoplasmas sólidos exige o recrutamento de um estroma de suporte, o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção fornece uma abordagem inventiva e inovadora para o alvejamento e extermínio estromal do tumor.

Vantajosamente, a presente invenção fornece também anticorpos de cadeia única biespecíficos FAPalphaxCD3 que compreendem um segundo domínio de aglutinação que se aglutina tanto ao homólogo alfa FAP humano quanto ao homólogo alfa FAP símio, isto é, o homólogo de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico compreende, então, um segundo domínio de aglutinação que exibe a especificidade de espécies cruzadas em relação ao alfa FAP dos primatas humano e não pertencente ao gênero Chimpazee. Nesse caso, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica idêntica pode ser usada para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e como uma droga em seres humanos. Em outras palavras, a mesma molécula pode ser usada em estudos animais pré-clínicos bem como em estudos clínicos em seres humanos. Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma força de previsão muito elevada dos estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies. Desde que os domínios de aglutinação de CD3 e de alfa FAP do anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção sejam específicos de espécies cruzadas, isto é, reajam com os primatas humano e não pertencente ao gênero Chimpazee, esses podem ser usados para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em primatas e - na forma idêntica - como uma droga em seres humanos.

Conforme descrito no presente documento acima, IGF-1R é um receptor (e, assim, um antígeno de superfície celular) com a atividade de tirosina cinase tendo 70% de homologia com o receptor 1R de insulina. IGF-1R é expresso em uma grande variedade de tumores e de linhagens tumorais e os IGFs

amplificam o crescimento tumoral por meio de suas fixações ao IGF-1R.

Em uma modalidade preferencial, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção compreende um segundo domínio de aglutinação que
exibe a especificidade de espécies cruzadas em relação ao IGF-1R de primata
5 humano e ao IGF-1R de primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Nesse
caso, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica idêntica pode ser usada
para a avaliação pré-clínica de perfil de segurança, atividade e/ou farmacocinético
desses domínios de aglutinação em primatas e como drogas em seres humanos.
Isso leva a resultados altamente comparáveis e a uma força de previsão dos
10 estudos animais comparados às moléculas surrogadas específicas de espécies.
Desde que nessa modalidade os domínios de aglutinação de CD3 e de IGF-1R do
anticorpo de cadeia única biespecífico IGF-1RxCD3 da invenção sejam específicos
de espécies cruzadas, isto é, reativos aos primatas humano e não pertencente ao
gênero Chimpazee, esses podem ser usados para a avaliação pré-clínica de perfil
15 de segurança, atividade e/ou farmacocinético desses domínios de aglutinação em
primatas e – na forma idêntica – como droga em seres humanos.

Descobriu-se na presente invenção que é possível gerar um anticorpo
de cadeia única biespecífico, de preferência humano, PSCAxCD3
(respectivamente CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-
20 1RxCD3 ou FAP α xCD3) em que a molécula idêntica pode ser usada em testes
animais pré-clínicos, bem como em estudos clínicos e até mesmo em terapia em
seres humanos. Isso é devido à identificação inesperada do anticorpo de cadeia
única biespecífico, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente
CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou
25 FAP α xCD3), que em adição à aglutinação com o épsilon de CD3 e PSCA
humanos (respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α),
respectivamente, (e devido à similaridade genética provável com o correspondente
do chimpanzé), também se aglutina aos homólogos dos ditos antígenos de
primatas não pertencentes ao gênero Chimpazee, incluindo macacos do Novo
30 Mundo e macacos do Velho Mundo. Conforme mostrado nos exemplos a seguir, o

dito anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) pode ser usado como agente terapêutico ou droga contra várias doenças, incluindo, mas não se limitando a

5 câncer.

O anticorpo de cadeia única biespecífico PSCAxCD3 é, particularmente, vantajoso para a terapia de câncer de próstata, de câncer da bexiga ou câncer pancreático.

O dito anticorpo de cadeia única biespecífico CD19xCD3 da

10 invenção, de preferência humano, pode ser usado como agente terapêutico contra várias doenças, incluindo, mas não se limitando a câncer, de preferência, malignidades da célula B, como linfoma de não-Hodgkin, doenças auto-imunes mediadas pela célula B ou a depleção das células B.

O dito anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção c-

15 METxCD3, de preferência humano, pode ser usado como agente terapêutico contra várias doenças, incluindo, mas não se limitando a câncer, de preferência carcinoma, sarcoma, glioblastoma/astrocitoma, melanoma, mesotelioma, tumor de wilms ou uma malignidade hematopoiética como leucemia, linfoma ou mieloma múltiplo.

20 O dito anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção EndosialinxCD3, de preferência humano, fornece uma abordagem inventiva e inovadora para o extermínio e alvejamento do endotélio tumoral pela inclusão de (mas não se limitando a) carcinomas (de mama, dos rins, do pulmão, colorretal, do colo, mesotelioma do pâncreas), sarcomas e tumores neuroectodermiais

25 (melanoma, glioma, neuroblastoma). O anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção pode retirar tumores sólidos de seus vasos sanguíneos auxiliares, por meio disso, inibindo a angiogênese e, consequentemente, o crescimento dos ditos neoplasmas.

O dito anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção

30 EpCAMxCD3, de preferência humano, pode ser usado como agente terapêutico

contra várias doenças, incluindo, mas não se limitando a câncer, de preferência, câncer epitelial.

O dito anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção IGF-1RxCD3, de preferência humano, pode ser usado como agente terapêutico contra
5 várias doenças, incluindo, mas não se limitando a câncer, de preferência, câncer de tecido mole ou ósseo (por exemplo, sarcoma de Ewing), de mama, do fígado, do pulmão, da cabeça e pescoço, colorretal, da próstata, leiomiossarcoma, câncer cervical e endometrial, do ovário, da próstata e câncer pancreático. O anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção IGF-1RxCD3 pode ser usado como agente
10 terapêutico contra doenças auto-imunes, de preferência, psoríase.

Em visto do citado acima, a necessidade de construir um anticorpo de cadeia única biespecífico PSCAxCD3 surrogado (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) para
15 testar em espécies distantes (da espécie humana) filogenéticas desaparece. Como resultado, a molécula idêntica pode ser usada no teste pré-clínico animal cujo objetivo é ser administrada a seres humanos em testes clínicos bem como a seguinte aprovação do mercado e administração da droga terapêutica. A capacidade de usar a mesma molécula para os testes animais pré-clínicos como na posterior administração a seres humanos elimina virtualmente ou, pelo menos
20 reduz enormemente, o perigo de que os dados obtidos em testes animais pré-clínicos tenham aplicabilidade limitada em relação ao caso humano. Em resumo, a obtenção de dados seguros pré-clínicos em animais que usam a mesma molécula que será, na verdade, administrada a seres humanos garante bastante a aplicabilidade dos dados a um cenário relevante humano. Em contraste, em
25 abordagens convencionais que usam moléculas surrogadas, as ditas moléculas surrogadas devem ser adaptadas de modo molecular ao sistema de testes animais usado para a avaliação de segurança pré-clínica. Dessa forma, a molécula a ser usada em terapia humana, na realidade, se difere na sequência e também provavelmente na estrutura da molécula surrogada usada nos testes pré-clínicos
30 em parâmetros farmacocinéticos e/ou atividade biológica, com a consequência de

que os dados obtidos em testes animais pré-clínicos têm aplicabilidade/transferência limitada para o caso humano. O uso de moléculas surrogadas exige a construção, produção, purificação e caracterização de um constructo completamente novo. Isso leva a custos de desenvolvimento adicionais e tempo necessário para obter aquela molécula. Em resumo, os surrogados devem ser desenvolvidos separadamente em adição à droga real a ser usada na terapia humana, de modo que duas linhas de desenvolvimento para duas moléculas sejam executadas. Portanto, uma vantagem principal do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) que exibe a especificidade de espécies cruzadas descritas no presente documento é que a molécula idêntica pode ser usada para aplicações terapêuticas e em testes animais pré-clínicos.

É preferível que pelo menos um dos ditos primeiro ou segundo domínios de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção seja humano, humanizado ou enxertado com CDR, conforme apresentado em maiores detalhes abaixo. De preferência, tanto o primeiro quanto o segundo domínios de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção são humanos, humanizados ou enxertados com. Para o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3), a geração de uma reação imunológica contra as ditas moléculas de aglutinação é excluída até o nível máximo possível mediante a administração da molécula a pacientes humanos.

Outra vantagem principal do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) é sua aplicabilidade para testes pré-clínicos em vários primatas. O comportamento de uma droga candidata em animais deveria ser de modo ideal indicativo do comportamento esperado dessa droga candidata mediante a administração aos

seres humanos. Como resultado, os dados obtidos de tais testes pré-clínicos deveriam, portanto, ter geralmente uma força de previsão elevada para o caso humano. Entretanto, conforme aprendido do resultado trágico do recente teste clínico de Fase I em TGN1412 (um anticorpo monoclonal CD28), uma droga

5 candidata pode agir de modo diferente em uma espécie de primata do que em uma espécie humana: enquanto que em testes pré-clínicos do dito anticorpo nenhum ou apenas efeitos adversos limitados foram observados nos estudos animais realizados com macacos cinomolgos, em que seis pacientes humanos desenvolveram múltipla falência dos órgãos mediante a administração do dito

10 anticorpo (Lancet 368 (2006), 2206 a 7). Os resultados desses eventos negativos indesejáveis e dramáticos sugerem que pode não ser suficiente limitar os testes pré-clínicos a somente uma espécie (primata não pertencente ao gênero *Chimpazee*). O fato de o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3,

15 EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) se aglutinar a uma série de macacos do Novo Mundo e do Velho Mundo pode ajudar a superar os problemas mostrados no caso mencionado acima. Em conformidade, a presente invenção fornece meios e métodos para minimizar os efeitos em diferentes espécies à medida que as drogas para a terapia humana são desenvolvidas e testadas.

20 Com o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 específico de espécies cruzadas (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) também não é mais necessário adaptar o teste animal à droga candidata destinada à administração aos seres humanos, como, por

25 exemplo, a criação de animais transgênicos. O anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) que exhibe a especificidade de espécies cruzadas de acordo com os usos e métodos da invenção pode ser usado diretamente para o teste pré-clínico

30 em primatas não pertencentes ao gênero *Chimpazee*, sem nenhuma manipulação

genética dos animais. Conforme bem conhecidas daqueles elementos versados na técnica, as abordagens em que o teste animal é adaptado à droga candidata sempre sofrem o risco de que os resultados obtidos no teste de segurança pré-clínico sejam menos representativos e previsíveis para seres humanos devido à
5 modificação do animal. Por exemplo, em animais transgênicos, as proteínas codificadas pelos transgenes são, muitas vezes, altamente superexpressas. Assim, os dados obtidos para a atividade biológica de um anticorpo contra esse antígeno de proteína podem ser limitados em seu valor de previsão para seres humanos em que a proteína expressa níveis fisiológicos muito mais inferiores.

10 Uma vantagem adicional dos usos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) que exibe a especificidade de espécies cruzadas é o fato de que evita-se que o chimpanzé como uma espécie em risco de extinção seja usado para
15 testes animais. Os chimpanzés são os mais próximos em relação aos seres humanos e foram recentemente agrupados na família dos homínídeos com base nos dados de sequenciamento de genoma (Wildman et al., PNAS 100 (2003), 7181). Portanto, os dados obtidos com chimpanzés são, geralmente, considerados altamente previsíveis para os seres humanos. Entretanto, devido à sua situação
20 como espécie em risco de extinção, a quantidade de chimpanzés que pode ser usada para experimentos médicos é altamente restrita. Conforme estabelecido acima, a manutenção de chimpanzés para o teste animal é, portanto, tanto custosa e eticamente problemática. Os usos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-
25 METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) evitam as objeções éticas e sobrecargas financeiras durante o teste pré-clínico sem prejudicar a qualidade, isto é, a aplicabilidade dos dados do teste animal obtidos. À luz disso, os usos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) fornecem uma
30

alternativa razoável para os estudos em chimpanzés.

Ainda uma outra vantagem adicional do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) é a capacidade de extrair múltiplas amostras sanguíneas ao usá-las como parte do teste pré-clínico animal, por exemplo, durante os estudos animais farmacocinéticos. As múltiplas extrações de sangue podem ser mais rapidamente obtidas com um primata não pertencente ao gênero Chimpazee do que com animais menores, por exemplo, um camundongo. A extração de múltiplas amostras de sangue permite o teste contínuo de parâmetros sanguíneos para a determinação dos efeitos biológicos induzidos pelo anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3). Além disso, a extração de múltiplas amostras de sangue permite que o pesquisador avalie o perfil farmacocinético do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) conforme definido no presente documento. Em adição, efeitos colaterais potenciais, que podem ser induzidos pelo dito anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) refletidos nos parâmetros sanguíneos podem ser medidos em diferentes amostras sanguíneas extraídas durante o curso da administração do dito anticorpo. Isso permite a determinação do perfil de toxicidade potencial do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) conforme definido no presente documento.

As vantagens do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3,

EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) conforme definido no presente documento, que exibe a especificidade de espécies cruzadas podem ser brevemente resumidas conforme a seguir:

Primeiramente, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) conforme definido no presente documento usado nos testes pré-clínicos é o mesmo que o usado na terapia humana. Dessa forma, não é mais necessário desenvolver duas moléculas independentes, que podem se diferir em suas propriedades farmacocinéticas e atividade biológica. Isso é altamente vantajoso em que, por exemplo, os resultados farmacocinéticos são mais diretamente transferíveis e aplicáveis ao conjunto humano do que, por exemplo, em abordagens surrogadas convencionais.

Em segundo, os usos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) conforme definido no presente documento para a preparação de aplicações terapêuticas em seres humanos é menos custosa e de menor trabalho intensivo do que as abordagens surrogadas.

Em terceiro, o anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção, de preferência humano, PSCAxCD3 (respectivamente, CD19xCD3, C-METxCD3, EndosialinxCD3, EpCAMxCD3, IGF-1RxCD3 ou FAP α xCD3) conforme definido no presente documento pode ser usado na realização de testes pré-clínicos não apenas em uma espécie de primata, mas em uma série de espécies de primatas diferentes, por meio disso, limitando o risco de diferenças de espécies potenciais entre primatas e seres humanos.

Em quarto, evita-se que o chimpanzé, como uma espécie de extinção, seja usado para realização de testes animais, se for desejado.

Em quinto, múltiplas amostras de sangue podem ser extraídas para estudos farmacocinéticos extensivos.

Em sexto, devido à origem humana das moléculas de aglutinação, de

preferência humanas, de acordo com uma modalidade preferencial da invenção, a geração de uma reação imunológica contra as ditas moléculas de aglutinação é minimizada quando administradas aos pacientes humanos. A indução de uma resposta imunológica com específicos anticorpos para uma droga candidata derivada de uma espécie não humana como, por exemplo, um camundongo, leva à exclusão do desenvolvimento de anticorpos de camundongos anti-humanos (HAMAs) contra moléculas terapêuticas de origem murina.

Por último, mas não menos importante:

- o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico PSCAxCD3 da invenção fornece uma abordagem terapêutica inventiva e inovadora para o câncer, incluindo, mas não se limitando a, câncer de próstata, câncer da bexiga ou câncer pancreático. Os seguintes exemplos demonstram claramente para cada constructo o recrutamento potente da atividade citotóxica de células efectoras humanas e símias contra as células positivas para PSCA.
- o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico CD19xCD3 da invenção fornece uma abordagem terapêutica inventiva e inovadora para o câncer, de preferência, malignidades da célula B, como linfoma de não-Hodgkin, doenças auto-imunes mediadas pela célula B ou a depleção das células B. Conforme mostrado nos exemplos a seguir, a atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico CD19xCD3 da invenção é maior do que a atividade dos anticorpos descritos na técnica.
- o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico C-METxCD3 da invenção fornece uma abordagem terapêutica inventiva e inovadora para o câncer, de preferência, carcinoma, sarcoma, glioblastoma/astrocitoma, melanoma, mesotelioma, tumor de wilms ou uma malignidade hematopoiética como leucemia, linfoma ou múltiplos mielomas. Conforme mostrado nos exemplos a seguir, a atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico C-METxCD3 da invenção é maior do que a atividade dos anticorpos descritos na técnica.
- o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico

EndosialinxCD3 da invenção fornece uma abordagem inventiva e inovadora para o alvejamento e extermínio do endotélio tumoral por incluir (mas não se limitando a) carcinomas (de mama, dos rins, do pulmão, colorretal, do colo, mesotelioma do pâncreas), sarcomas e tumores neuroectodermas (melanoma, glioma, neuroblastoma). O anticorpo de cadeia única biespecífico EndosialinxCD3 da invenção pode retirar tumores sólidos de seus vasos sanguíneos auxiliares, assim, inibindo a angiogênese e, conseqüentemente, o crescimento dos ditos neoplasmas.

• o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção fornece uma abordagem terapêutica inventiva e inovadora para o câncer, de preferência, câncer epitelial e/ou um câncer residual mínimo. O anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção não apenas fornece uma ferramenta vantajosa com a finalidade de exterminar as células cancerosas que expressam EpCAM em câncer, de preferência, câncer epitelial ou um câncer residual mínimo, mas também é útil para a eliminação do suposto culpado responsável pela reincidência do tumor após a terapia. Em adição, a atividade citotóxica do anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção é maior do que a atividade citotóxica dos anticorpos descritos na técnica.

• o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção fornece uma abordagem inventiva e inovadora para o alvejamento e extermínio do tumor estromal: O anticorpo de cadeia única biespecífico FAPalphaxCD3 da invenção retira os tumores sólidos, como tumores epiteliais, de seu estroma de suporte, assim, inibindo o crescimento e neovascularização de neoplasmas sólidos.

• o uso terapêutico do anticorpo de cadeia única biespecífico IGF-1RxCD3 da invenção fornece uma abordagem inventiva e inovadora para o câncer (de preferência, câncer do tecido mole ou ósseo (por exemplo, sarcoma de Ewing), de mama, do fígado, do pulmão, da cabeça e pescoço, colorretal, próstata, leiomiossarcoma, câncer cervical e endometrial, do ovário, próstata e câncer

pancreático) ou doenças auto-imunes (de preferência, psoríase).

Conforme observado no presente documento acima, a presente invenção fornece polipeptídeos, isto é, anticorpos de cadeia única biespecíficos, que compreendem um primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítopo de cadeia de CD3 ϵ humana e de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee e a um segundo domínio de aglutinação capaz de se aglutinar ao PSCA (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α), em que o segundo domínio de aglutinação, de preferência, também se aglutina ao PSCA humano (respectivamente, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α) e ao de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee. A vantagem da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica como droga candidata que cumpre com as exigências do anticorpo de cadeia única biespecífico preferencial da invenção é o uso de tais moléculas na realização de testes animais pré-clínicos bem como nos estudos clínicos e até mesmo para a terapia em seres humanos.

Em uma modalidade preferencial dos anticorpos de cadeia única biespecíficos da invenção específicos de espécies cruzadas, o segundo domínio de aglutinação que se aglutina a um antígeno de superfície celular é humano. Em moléculas específicas de específicos de espécies cruzadas de acordo com a invenção, o domínio de aglutinação que se aglutina a um epítopo de cadeia épsilon de CD3 humana e de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee está localizado na ordem VH-VL ou VL-VH na terminação N ou na terminação C da molécula biespecífica. Os exemplos para moléculas biespecíficas de específicos de espécies cruzadas de acordo com a invenção em disposições diferentes da cadeia VH e VL no primeiro e segundo domínios de aglutinação são descritos nos exemplos em anexo.

Conforme usado no presente documento, um “anticorpo de cadeia única biespecífico” denota uma única cadeia de polipeptídeo que compreende dois domínios de aglutinação. Cada domínio de aglutinação compreende uma região variável de uma cadeia pesada de anticorpo (“região VH”), em que a região VH do primeiro domínio de aglutinação se aglutina especificamente à molécula CD3 ϵ , e a

região VH do segundo domínio de aglutinação se aglutina especificamente a PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α . Os dois domínios de aglutinação são opcionalmente ligados entre si por um curto espaçador de polipeptídeo. Um exemplo não limitador para um espaçador de polipeptídeo é Gli-Gli-Gli-Gli-Ser (G-G-G-G-S) e repetições do mesmo. Cada domínio de aglutinação pode compreender adicionalmente uma região variável de uma cadeia leve do anticorpo ("região VL"), a região VH e a região VL dentro de cada do primeiro e segundo domínios de aglutinação sendo ligadas entre si via um ligante de polipeptídeo, por exemplo, do tipo descrito e reivindicado em EP 623679 B1, mas em qualquer caso, longo o bastante para permitir que a região VH e a região VL do primeiro domínio de aglutinação e a região VH e a região VL do segundo domínio de aglutinação para se parearem de modo que, juntas, sejam capazes de se aglutinar especificamente ao primeiro e segundo domínios de aglutinação respectivamente.

O termo "proteína" é bem conhecido na técnica e descreve compostos biológicos. As proteínas compreendem uma ou mais cadeias de aminoácidos (polipeptídeos), por meio das quais os aminoácidos são ligados um ao outro via uma ligação de peptídeo. O termo "polipeptídeo" conforme usado no presente documento descreve um grupo de moléculas, que consiste em mais de 30 aminoácidos. De acordo com a invenção, o grupo de polipeptídeos compreende "proteínas" enquanto que as proteínas consistem em uma única cadeia de polipeptídeo. Também de acordo com a definição, o termo "polipeptídeo" descreve fragmentos de proteínas enquanto que esses fragmentos consistem em mais do que 30 aminoácidos. Os polipeptídeos podem formar adicionalmente multímeros como dímeros, trímeros e oligômeros maiores, isto é, que consistem em mais do que uma molécula de polipeptídeo. As moléculas de polipeptídeo que formam esses dímeros, trímeros etc. podem ser idênticas ou não idênticas. As estruturas de ordem superior de tais multímeros são, conseqüentemente, chamadas de homodímeros ou heterodímeros, homotrímeros ou heterotrímeros etc. Um exemplo para um hereteromultímero é uma molécula de anticorpo, que, em sua forma de

ocorrência natural, consiste em duas cadeias leves idênticas de polipeptídeos e duas cadeias pesadas idênticas de polipeptídeos. Os termos “polipeptídeo” e “proteína” também se referem a polipeptídeos/proteínas naturalmente modificados em que a modificação é realizada, por exemplo, por modificações pós-translacionais como glicosilação, acetilação, fosforilação e similares. Essas modificações são bem conhecidas na técnica.

O termo “domínio de aglutinação” caracteriza em conexão com a presente invenção um domínio de um polipeptídeo que se aglutina especificamente a/interage com uma dada estrutura/antígeno/epítipo alvo. Dessa forma, o domínio de aglutinação é um “sítio de interação de antígeno”. O termo “sítio de interação de antígeno” define, de acordo com a presente invenção, um motivo de um polipeptídeo, que é capaz de interagir especificamente com um antígeno específico ou um grupo de antígenos específico, por exemplo, o antígeno idêntico em espécies diferentes. A dita aglutinação/interação também é compreendida por definir um “reconhecimento específico”. O termo “reconhecer especificamente” significa de acordo com essa invenção que a molécula de anticorpo é capaz de interagir especificamente com e/ou se aglutinar a pelo menos dois, de preferência, pelo menos três, com mais preferência, pelo menos quatro aminoácidos de um antígeno, por exemplo, o antígeno de CD3 humano conforme definido no presente documento. Essa aglutinação pode ser exemplificada pela especificidade de um “princípio chave e fechadura”. Dessa forma, os motivos específicos na sequência de aminoácidos do domínio de aglutinação e do antígeno se aglutina entre si como um resultado de sua estrutura primária, secundária ou terciária bem como o resultado de modificações secundárias da dita estrutura. A interação específica do sítio de interação de antígeno com seu antígeno específico pode resultar em uma aglutinação simples do dito sítio com o antígeno. Além disso, a interação específica do domínio de aglutinação/sítio de interação de antígeno com seu antígeno específico pode resultar alternativamente na iniciação de um sinal, por exemplo, devido à indução de uma alteração da conformação do antígeno, uma oligomerização do antígeno, etc. Um exemplo preferencial de um domínio de

aglutinação de acordo com a presente invenção é um anticorpo. O domínio de aglutinação pode ser um anticorpo monoclonal ou policlonal ou um derivado de um anticorpo monoclonal ou policlonal.

O termo "anticorpo" compreende derivados ou fragmentos funcionais do mesmo que ainda retêm a especificidade de aglutinação. As técnicas para a produção de anticorpos são bem conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, em Harlow e Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 e Harlow e Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. O termo "anticorpo" também compreende imunoglobinas (Ig's) de classes diferentes (isto é, IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) e subclasses (como IgG1, IgG2 etc.).

A definição do termo "anticorpo" também inclui modalidades como cadeia única quimérica e anticorpos humanizados, bem como fragmentos de anticorpo, como, entre outros, fragmentos de Fab. Os fragmentos de anticorpo ou derivados compreendem adicionalmente fragmentos de $F(ab')_2$, Fv, scFv ou anticorpos de domínio único, anticorpos de domínio variável único ou domínio variável único de imunoglobina que compreende meramente um domínio variável, que pode ser VH ou VL, que se aglutina especificamente a um antígeno ou epítipo independentemente de outros domínios ou regiões V; ver, por exemplo, Harlow e Lane (1988) e (1999), loc. cit. Esses domínio variável único de imunoglobina abrange não apenas um polipeptídeo de domínio variável único de anticorpo isolado, mas também polipeptídeos maiores que compreendem um ou mais monômeros de uma sequência de polipeptídeo de domínio variável único de anticorpo.

Vários procedimentos são conhecidos na técnica e podem ser usados para a produção desses anticorpos e/ou fragmentos. Dessa forma, os derivados (anticorpo) também podem ser produzidos por peptidomiméticos. Ainda, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (ver, entre outros, Patente US4.946.778) podem ser adaptadas para produzir anticorpos específicos de cadeia única para polipeptídeo(s) eleito(s). Também, animais

transgênicos podem ser usados para expressar anticorpos humanizados específicos para polipeptídeos e proteínas de fusão dessa invenção. Para a preparação de anticorpos monoclonais, qualquer técnica que forneça anticorpos produzidos por culturas de linhagens celulares contínuas pode ser usada. Os

5 exemplos para essas técnicas incluem a técnica de hibridoma (Köhler e Milstein Nature 256 (1975), 495 a 497), a técnica de trioma, a técnica de hibridoma da célula B humana (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) e a técnica de hibridoma de EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77 a 96). A

10 ressonância de plasma de superfície conforme empregada no sistema BIAcore pode ser usada para aumentar a eficiência dos anticorpos de fago que se aglutinam a um epítipo de um polipeptídeo alvo, como épsilon de CD3, PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97 a 105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7 a

15 13). Contempla-se também no contexto dessa invenção que o termo "anticorpo" compreende constructos de anticorpo, que podem ser expressos em um hospedeiro conforme descrito no presente documento abaixo, por exemplo, constructos de anticorpo que podem ser transfectados e/ou transduzidos via, entre outros, vírus ou vetores de plasmídeos.

20 O termo "interação específica" conforme usado de acordo com a presente invenção significa que o domínio de aglutinação não reage ou não reage significativamente de maneira cruzada com os polipeptídeos que têm estrutura similar àsquelas aglutinadas pelo domínio de aglutinação e que podem ser expressas pelas mesmas células que o polipeptídeo de interesse. A reatividade

25 cruzada de um painel de domínios de aglutinação sob investigação pode ser testada, por exemplo, pela avaliação da aglutinação do dito painel de domínios de aglutinação sob condições convencionais (ver, por exemplo, Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 and Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

30 1999). Os exemplos para a interação específica de um domínio de aglutinação com

um antígeno específico compreendem a especificidade de um ligante para seu receptor. A dita definição compreende particularmente a interação de ligantes, que induzem um sinal mediante aglutinação com seu receptor específico. Os exemplos para a dita interação, que é particularmente incluída pela dita definição, são a

5 interação de um determinante antigênico (epítipo) como domínio de aglutinação (sítio de aglutinação antigênica) de um anticorpo.

O termo “especificidade de espécies cruzadas” ou “especificidade de interespecies” conforme usado no presente documento significa a aglutinação de um domínio de aglutinação descrito no presente documento à mesma molécula

10 alvo em seres humanos e primatas não pertencentes ao gênero Chimpazee. Dessa forma, “especificidade de espécies cruzadas” ou “especificidade de interespecies” deve ser compreendido como uma reatividade de interespecies à mesma molécula “X” (isto é, o homólogo) expressa em diferentes espécies, mas não a uma molécula diferente de “X”. A especificidade de espécies cruzadas de um reconhecimento de

15 anticorpo monoclonal, por exemplo, épsilon de CD3 humano, em relação a um épsilon de CD3 de primata não pertencente ao gênero Chimpazee, por exemplo, épsilon de CD3 símio, pode ser determinada, por exemplo, pela análise de FACS. A análise de FACS é executada em um modo em que o anticorpo monoclonal respectivo é testado para a aglutinação às células humanas e de primata não

20 pertencente ao gênero Chimpazee, por exemplo, células de macaco símio, que expressam os ditos antígenos de épsilon de CD3 humano e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee, respectivamente. Um ensaio apropriado é mostrado nos exemplos a seguir. O assunto mencionado acionado se aplica, com as mudanças necessárias, a PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R e

25 antígeno de FAP α : A especificidade de espécies cruzadas de um reconhecimento de anticorpo monoclonal, por exemplo, PSCA humano, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α , em relação a um PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α de um primata não pertencente ao gênero Chimpazee, por exemplo, PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α símio,

30 pode ser determinada, por exemplo, por análise de FACS. A análise de FACS é

executada em um modo em que o anticorpo monoclonal respectivo é testado para a aglutinação às células humanas e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee, por exemplo, células símias, que expressam os ditos antígenos de PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α de antígenos humanos e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee, respectivamente.

Conforme usado no presente documento, épsilon de CD3 denota uma molécula expressa como parte do receptor da célula T e tem o significado que normalmente lhe é atribuído na técnica anterior. Em seres humanos, esse engloba em uma forma independentemente combinada ou individual todas as subunidades de CD3 conhecidas, por exemplo, épsilon de CD3, delta de CD3, gama de CD3, zeta de CD3, alfa de CD3 e beta de CD3. O primata não pertencente ao gênero Chimpazee, antígenos de CD3 não humanos conforme referidos no presente documento são, por exemplo, CD3 de *Macaca fascicularis* e CD3 de *Macaca mulatta*. Em *Macaca fascicularis*, essa engloba FN-18 negativo de épsilon de CD3 e FN-18 positivo de épsilon de CD3, gama de CD3 e delta de CD3. Em *Macaca mulatta*, essa engloba épsilon de CD3, gama de CD3 e delta de CD3. De preferência, o dito CD3 conforme usado no presente documento é épsilon de CD3.

O épsilon de CD3 humano é indicado no N° de Acesso GenBankNM_000733 e compreende SEQ ID N° 1. O gama de CD3 humano é indicado no N° de Acesso GenBank NM_000073. O delta de CD3 humano é indicado no N° de Acesso GenBank NM_000732.

O “FN-18 negativo” de épsilon de CD3 de *Macaca fascicularis* (isto é, épsilon de CD3 não reconhecido pelo FN-18 de anticorpo monoclonal devido a um polimorfismo conforme apresentado acima) é indicado no N° de Acesso GenBank AB073994.

O “FN-18 positivo” de épsilon de CD3 de *Macaca fascicularis* (isto é, épsilon de CD3 reconhecido pelo FN-18 anticorpo monoclonal) é indicado no N° de Acesso GenBank AB073993. O gama de CD3 de *Macaca fascicularis* é indicado no N° de Acesso GenBank AB073992. O delta de CD3 de *Macaca fascicularis* é indicado no N° de Acesso GenBank AB073991.

As sequências de ácido nucléico e sequências de aminoácidos dos respectivos homólogos de épsilon, gama e delta de CD3 de *Macaca mulatta* podem ser identificadas e isoladas por técnicas recombinantes descritas na técnica (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edição 2001). Isso se aplica, com as mudanças necessárias, aos homólogos de épsilon, gama e delta de CD3 de outro primata não pertencente ao gênero Chimpazee conforme definido no presente documento. A identificação da sequência de aminoácidos de *Callithrix jacchus*, *Saimiri sciureus* e *Saguinus oedipus* é descrita nos exemplos em anexo. A sequência de aminoácidos do domínio extracelular do épsilon de CD3 de *Callithrix jacchus* é descrita na SEQ ID Nº: 3, aquela de *Saguinus oedipus* é descrita na SEQ ID Nº: 5 e aquela de *Saimiri sciureus* é descrita na SEQ ID Nº: 7.

O PSCA humano é indicado no Nº de Acesso GenBank NM_005672. O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID Nºs 444 e 443, respectivamente. A clonagem do homólogo de PSCA de símio é demonstrada nos seguintes exemplos, o cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID Nºs 446 e 445, respectivamente.

O CD19 humano é indicado no Nº de Acesso GenBank NM_001770. Na base dessa informação de sequência é possível para um indivíduo versado na técnica sem qualquer atividade inventiva clonar (e expressar) a molécula de CD19 símio. Por exemplo, o cDNA de CD19 humano ou um fragmento do mesmo indicado no Nº de Acesso GenBank NM_001770 pode ser usado como uma sonda de hibridização com a finalidade de triar uma biblioteca de cDNA símio (por exemplo, uma biblioteca de cDNA de macaco cinomolgo ou macaco rhesus) sob condições de hibridização apropriadas. As técnicas recombinantes e métodos de triagem (incluindo abordagens de hibridização) na biologia molecular são descritas, por exemplo, em Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edição de 2001.

O C-MET humano é indicado no Nº de Acesso GenBank NM_000245. O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ

ID N^{os} 776 e 777, respectivamente. A clonagem do homólogo de C-MET de símio é demonstrada nos exemplos a seguir, o cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID N^{os} 788 e 789, respectivamente.

O Endosialin humano é indicado no N^o de Acesso GenBank NM_020404. O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID N^{os} 913 e 914, respectivamente. A clonagem do homólogo de Endosialin de símio é demonstrada nos exemplos a seguir, o cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostradas nas SEQ ID N^{os} 915 e 916, respectivamente.

O EpCAM humano é indicado no N^o de Acesso GenBank NM_002354. O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID N^{os} 1029 e 1028, respectivamente. Conforme demonstrado nos exemplos a seguir, o segundo domínio de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAMxCD3 da invenção se aglutina a um epítipo localizado nos resíduos de aminoácidos 26 a 61 do domínio 1 semelhante ao EGF de EpCAM que é codificado por exão 2 do gene de EpCAM. Os ditos resíduos de aminoácidos 26 a 61 do domínio 1 de EpCAM humano semelhante ao EGF são mostrados na SEQ ID N^o 1130. Na base dessa informação de sequência é possível para o indivíduo versado na técnica sem qualquer atividade inventiva clonar (e expressar) a molécula de EpCAM símia. Por exemplo, o cDNA de EpCAM humano ou um fragmento do mesmo indicado no N^o de Acesso GenBank NM_002354 pode ser usado como uma sonda de hibridização com a finalidade de triar uma biblioteca de cDNA de símio (por exemplo, uma biblioteca de cDNA de macaco cinomolgo ou macaco rhesus) sob condições de hibridização apropriadas. As técnicas recombinantes e métodos de triagem (incluindo abordagens de hibridização) em biologia molecular são descritos, por exemplo, em Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3^a edição de 2001.

O alfa de FAP humano é indicado no N^o de Acesso GenBank NM_004460. O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são

mostrados nas SEQ ID N^{os} 1149 e 1150, respectivamente. A clonagem do homólogo de alfa de FAP de símio é demonstrada nos exemplos seguintes, o cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID N^{os} 1151 e 1152, respectivamente.

5 O IGF-1R humano é indicado no N^o de Acesso GenBank NM_000875. O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são mostrados nas SEQ ID N^{os} 1988 e 1989, respectivamente. A sequência de codificação de IGF-1R símio conforme publicada no GenBank (número de acesso XM_001100407). O cDNA e sequências de aminoácidos correspondentes são
10 mostrados nas SEQ ID N^{os} 1998 e 1999, respectivamente.

De acordo com o citado acima, o termo “epítipo” define um determinante antigênico, que é especificamente aglutinado /identificado por um domínio de aglutinação conforme definido no presente documento. O domínio de aglutinação pode especificamente se aglutinar /interagir com os epítipos contínuos
15 ou conformacionais, que são exclusivos para a estrutura alvo, por exemplo, a cadeia de épsilon de CD3 humana e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee ou o PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α humano e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee. Um epítipo descontínuo ou conformacional é caracterizado por antígenos de polipeptídeo pela
20 presença de dois ou mais resíduos de aminoácidos distintos que são separados na sequência primária, mas se reúnem sobre a superfície da molécula quando o polipeptídeo se dobra em proteína/antígeno nativo (Sela, (1969) Science 166, 1365 e Laver, (1990) Cell 61, 553 a 6). Os dois ou mais resíduos de aminoácidos distintos que contribuem com o epítipo estão presentes em seções separadas de
25 uma ou mais cadeias de polipeptídeo(s). Esses resíduos se reúnem sobre a superfície da molécula quando a cadeia de polipeptídeo(s) se dobra em uma estrutura tri-dimensional para constituir o epítipo. Em contraste, um epítipo contínuo ou linear consiste em dois ou mais resíduos de aminoácidos distintos, que estão presentes em um segmento linear único de uma cadeia de polipeptídeo. Na
30 presente invenção, um CD3 de epítipo “dependente do contexto” se refere à

conformação do dito epítopo. Esse epítopo dependente do contexto, localizado na cadeia épsilon de CD3, pode apenas desenvolver sua conformação correta se estiver embutido no resto da cadeia de épsilon e mantido na posição certa pela heterodimerização da cadeia de épsilon com a cadeia de gama de CD3 ou delta de CD3. Em contraste, um CD3 de epítopo independente do contexto conforme fornecido no presente documento se refere a um polipeptídeo de resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N ou a um fragmento funcional do mesmo de épsilon de CD3. Esse polipeptídeo de resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N ou um fragmento funcional do mesmo mantém sua integridade estrutural tri-dimensional e conformação correta quando retirado de seu ambiente nativo no complexo de CD3. A independência do contexto do polipeptídeo de resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N ou de um fragmento funcional do mesmo, que é parte do domínio extracelular de épsilon de CD3, representa, dessa forma, um epítopo que é completamente diferente dos epítopos de épsilon de CD3 descritos em conjunto com um método para a preparação de moléculas de aglutinação humanas em WO 2004/106380. O dito método usou épsilon de CD3 recombinante unicamente expresso. A conformação desse épsilon de CD3 recombinante unicamente expresso se diferenciou daquela adotada em sua forma natural, ou seja, a forma em que a subunidade de épsilon de CD3 do complexo de TCR/CD3 existe como parte de um complexo não covalente com a subunidade de delta de CD3 ou de gama de CD3 do complexo de TCR/CD3. Quando essa proteína de épsilon de CD3 recombinante unicamente expressa é usada como um antígeno para a seleção de anticorpos de uma biblioteca de anticorpo, específicos de anticorpos para esse antígeno são identificados da biblioteca, embora essa biblioteca não contenha anticorpos com especificidade para antígenos próprios/auto-antígenos. Isso é devido ao fato de que a proteína de épsilon de CD3 recombinante unicamente expressa que não existe *in vivo*; não é um auto-antígeno. Consequentemente, as subpopulações de células B que expressam anticorpos específicos para esse proteína não são depletadas *in vivo*; uma biblioteca de anticorpo construída das células B poderiam conter material genético

para anticorpos específicos para a proteína de épsilon de CD3 recombinante unicamente expressa.

Entretanto, desde que o polipeptídeo de resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N independente do contexto ou um fragmento funcional do mesmo seja um epítipo, que se dobra em sua forma nativa, os domínios de aglutinação de acordo com a presente invenção não podem ser identificados por métodos com base na abordagem descrita em WO 2004/106380. Portanto, poderia ser verificado em testes que as moléculas de aglutinação conforme descritas em WO 2004/106380 não são capazes de se aglutinarem aos resíduos de aminoácidos 1 a 27 de terminal N da cadeia de épsilon de CD3. Então, as moléculas de aglutinação anti-CD3 convencionais ou moléculas de anticorpo anti-CD3 (por exemplo, conforme descrito em WO 99/54440) se aglutinam à cadeia de épsilon de CD3 em uma posição que é localizada na terminação C mais extrema do que o polipeptídeo de resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N independente do contexto ou um fragmento funcional fornecido no presente documento. As moléculas de anticorpo da técnica anterior OKT3 e UCHT-1 também têm uma especificidade para a subunidade de épsilon do complexo TCR/CD3 entre resíduos de aminoácidos 35 a 85 e, em conformidade, o epítipo desses anticorpos também está localizado na terminação C mais extrema. Em adição, UCHT-1 se aglutina à cadeia de épsilon de CD3 em uma região entre resíduos de aminoácidos 43 a 77 (Tunncliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546 a 50; Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680; Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047 a 52). Portanto, as moléculas anti-CD3 de técnica anterior não se aglutinam a e não são direcionados contra o epítipo do resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N independente do contexto definido no presente documento (ou um fragmento funcional do mesmo). Em particular, o estado da arte falha para fornecer moléculas anti-CD3 que se aglutinam especificamente ao epítipo de resíduo de aminoácidos 1 a 27 de terminal N e que são específicas de espécies cruzadas, isto é, se aglutinam ao épsilon de CD3 humano e primata não pertencente ao gênero Chimpazee.

Para a geração de um domínio de aglutinação, de preferência

humano, incluído em uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, por exemplo, anticorpos monoclonais que se aglutinam ao épsilon de CD3 humano e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee (por exemplo, épsilon de CD3 símio) ou anticorpos monoclonais que se aglutinam ao PSCA humano e/ou de primata não pertencente ao gênero Chimpazee, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α , podem ser usados.

Conforme usado no presente documento, “ser humano” e “homem” se referem à espécie *Homo sapiens*. No que se refere aos usos medicinais descritos no presente documento, os paciente humanos devem ser tratados com a mesma molécula.

É preferível que pelo menos um dos ditos primeiro e segundo domínios de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção seja humano, humanizado ou enxertado com CDR. De preferência, o primeiro e segundo domínios de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção são humanos, humanizados ou enxertados com CDR.

O termo anticorpo “humano” conforme usado no presente documento deve ser compreendido como significando que o anticorpo de cadeia única biespecífico conforme definido no presente documento, compreende (uma) sequência de aminoácido(s) contida no repertório do anticorpo da linhagem germinativa humana. Para esses propósitos de definição no presente documento, o dito anticorpo de cadeia única biespecífico pode, portanto, ser considerado humano se consistir em (uma) sequência de aminoácido(s) de linhagem germinativa humana, isto é, se a sequência de aminoácido(s) do anticorpo de cadeia única biespecífico em questão for (forem) idêntica a (uma) sequência de aminoácidos(s) expressa na linhagem germinativa. Um anticorpo de cadeia única biespecífico conforme definido no presente documento também pode ser considerado como humano se esse consistir em (uma) sequência(s) que desvie de sua (suas) sequência(s) de linhagem germinativa humana mais próxima por não mais do que seria esperado devido à impressão de hipermutação somática. Adicionalmente, os anticorpos de muitos mamíferos não humanos, por exemplo,

roedores como camundongos e ratos, compreendem sequências de aminoácidos de CDR3 de VH, as quais uma espera-se existir também no repertório de anticorpo humano expresso. Qualquer sequência (s) de origem humana ou não humana que se pode esperar existir no repertório humano expresso poderia também ser considerada “humana” para os propósitos da presente invenção.

Conforme usado no presente documento, os termos “humanizado”, “humanização”, “semelhante a humano” ou relacionados gramaticalmente às variantes dos mesmos são usados intercambiavelmente para se referirem a um anticorpo de cadeia única biespecífico que compreende em pelo menos um de seus domínios de aglutinação, pelo menos uma região de determinação de complementaridade (“CDR”) de um anticorpo não humano ou fragmento do mesmo. As abordagens de humanização são descritas, por exemplo, em WO 91/09968 e US6.407.213. Como exemplos não limitadores, o termo engloba o caso em que uma região variável de pelo menos um domínio de aglutinação compreende uma única região de CDR, por exemplo, a terceira região de CDR de VH (CDRH3), de outro animal não humano, por exemplo, um roedor, bem como o caso em que uma ou ambas as regiões variáveis compreendem em cada de seus respectivos primeiro, segundo e terceiro CDRs, os CDRs do dito animal não humano. No evento em que todos os CDRs de um domínio de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico são substituídos por seus equivalentes correspondentes de, por exemplo, um roedor, um fala tipicamente de “enxerto de CDR”, e esse termo deve ser compreendido como sendo englobado pelo termo “humanizado” ou relacionado gramaticalmente às variantes do mesmo, conforme usado no presente documento. O termo “humanizado” ou variantes gramaticalmente relacionadas do mesmo também englobam casos em que, em adição à substituição de uma ou mais regiões de CDR por um VH e/ou VL do primeiro e/ou segundo domínio de aglutinação mais mutação(ões) (por exemplo, substituições) de pelo menos um único resíduo(s) de aminoácidos nas regiões de estrutura (“FR”) entre os CDRs é afetada de modo que os aminoácidos naquela(s) posições correspondem aos aminoácidos naquela(s) posições no animal das quais

as regiões usadas para a substituição são derivadas. Conforme conhecido na técnica, essas mutações individuais são frequentemente realizadas nas regiões de estrutura seguindo o enxerto de CDR com a finalidade de restaurar a afinidade de aglutinação original do anticorpo não humano usado como um doador de CDR para sua molécula alvo. O termo “humanizado” pode englobar adicionalmente (uma) substituição(ões) de aminoácido nas regiões de CDR de um animal não humano pelo aminoácido (s) de uma região de CDR correspondente de um anticorpo humano, em adição às substituições de aminoácido nas regiões de estrutura conforme descrito acima.

Conforme usado no presente documento, to termo “homólogo” ou “homologia” deve ser compreendido conforme a seguir: Homologia entre proteínas e DNA é frequentemente concluída na base de similaridade de sequência, especialmente em bioinformática. Por exemplo, em geral, se dois ou mais genes têm sequências de DNA similares, é provável que eles sejam homólogos. Mas, a similaridade de sequência pode surgir de ancestrais diferentes: sequências curtas podem ser similares por chance e as sequências podem ser similares porque ambos foram selecionados para se aglutinarem a uma proteína particular, como um fator de transcrição. Essas sequências são similares, mas não homólogas. As regiões de sequência que são homólogas também são chamadas conservadoras. Não deve ser confundida com a conservação de sequências de aminoácidos em que o aminoácido em uma posição específica é trocado, mas as propriedades físicoquímicas do aminoácido permanecem inalteradas. As sequências homólogas são de dois tipos: ortólogas e parólogas. As sequências homólogas são ortólogas se forem separadas por um evento de especiação: quando uma espécie de diverge em duas espécies separadas, as cópias divergentes de um único gene nas espécies resultantes são ditas por serem ortólogas. Ortólogos ou genes ortólogos são genes em espécies diferentes que são similares entre si porque são oriundos de um ancestral comum. A evidência mais forte de que dois genes similares são ortólogos é o resultado de uma análise filogenética da linhagem genética. Os genes que são encontrados dentro de um clado são ortólogos, são descendentes

de um ancestral comum. Os ortólogos muitas vezes, mas não sempre, têm a mesma função. As sequências de ortólogos fornecem informações úteis nos estudos de classificação taxonômica de organismos. O padrão de divergência genética pode ser usado para traçar a relação de organismos. Dois organismos

5 que são intimamente relacionados tendem a apresentar sequências de DNA muito similares entre dois ortólogos. De modo oposto, um organismo que é removido adicionalmente de modo evolucionário de outro organismo tende a apresentar uma divergência maior na sequência dos ortólogos a serem estudados. As sequências homólogas são parálogas se forem separadas por um evento de duplicação de

10 gene: se um gene em um organismo for duplicado para ocupar duas posições diferentes no mesmo genoma, então, as duas cópias são parálogas. Um conjunto de sequências que são parálogas é chamado de parálogo entre si. Os parálogos têm tipicamente a mesma função ou função similar, mas, algumas vezes, não: devido à falta de pressão seletiva original sob uma cópia do gene duplicado, essa

15 cópia é livre para se mutar e adquirir novas funções. Um exemplo pode ser encontrado em roedores como ratos e camundongos. Os roedores têm um par de insulina parálogo, embora não seja evidente se ocorrer qualquer divergência na função. Os genes parálogos frequentemente pertencem à mesma espécie, mas isso não é necessário: por exemplo, o gene da hemoglobina de seres humanos e o

20 gene da mioglobina de chimpanzés são parálogos. Esse é um problema comum na bioinformática: quando genomas de espécies diferentes são sequenciados e genes homólogos são descobertos, um indivíduo não pode concluir imediatamente que esses genes têm a função igual ou similar, conforme poderiam ser parálogos cuja função se divergiu.

25 Conforme usado no presente documento, um “primata não pertencente ao gênero Chimpazee” ou “primata não chimpanzé” ou variantes gramaticalmente dos mesmos se refere a qualquer primata (isto é, não humano) diferente do chimpanzé, isto é, diferente de um animal que pertence ao gênero *Pan*, e que inclui as espécies *Pan paniscus* e *Pan troglodytes*, também conhecidas

30 como *Anthropopithecus troglodytes* ou *Simia satyrus*. Será compreendido,

entretanto, que é possível que os anticorpos da invenção também possam aglutinar seu primeiro e/ou segundo domínio de aglutinação aos epítomos/fragmentos respectivos etc. dos ditos chimpanzés. A intenção é meramente evitar que testes animais sejam executados com chimpanzés, se for

5 desejado. Também é contemplado em outra modalidade que os anticorpos da presente invenção também aglutinem seu primeiro e/ou segundo domínio de aglutinação com os epítomos de chimpanzés respectivos. Um “primata”, “espécie de primata”, “primatas” ou variantes gramaticais dos mesmos denota uma ordem de mamíferos euterianos dividida em duas subordens de prosimianos e

10 antropóides e compreendem símios, macacos e lêmures. Especialmente, “primatas” conforme usado no presente documento compreende a subordem de *Strepsirrhini* (promisianos não tarsier), incluindo a infraordem de *Lemuriformes* (a própria incluindo as superfamílias *Cheirogaleoidea* e *Lemuroidea*), a infraordem *Chiromyiformes* (a própria incluindo a família *Daubentoniidae*) e a infraordem

15 *Lorisiformes* (a própria incluindo as famílias *Lorisidae* e *Galagidae*). “Primatas” conforme usado no presente documento também compreendem a subordem *Haplorrhini*, incluindo a infraordem *Tarsiiformes* (a própria incluindo a família *Tarsiidae*), a infraordem *Simiiformes* (a própria incluindo a *Platyrrhini* ou macacos do Novo Mundo, e a *Catarrhini*, incluindo a *Cercopithecoidea* ou macacos do Velho

20 Mundo).

O primata não pertencente ao gênero da espécie Chimpazee pode ser compreendido dentro do significado da invenção como sendo um lêmure, um tarsier, um gibão, um marmoset (pertencendo aos macacos do Novo Mundo da família *Cebidae*) ou um macaco do Velho Mundo (pertencendo à super família

25 *Cercopithecoidea*).

Conforme usado no presente documento, um “macaco do Novo Mundo” compreende qualquer macaco que se inclua na super família *Cercopithecoidea*, a própria sendo subdividida nas famílias: a *Cercopithecinae*, que é principalmente africana, mas não inclui o gênero diverso de símios que são

30 asiáticos e norte africanos; e a *Colobinae*, que inclui a maior parte do gênero

asiático, mas também os macacos colobo africanos.

Especificamente, na subfamília *Cercopithecinae*, um vantajoso primata não pertencente ao gênero Chimpazee pode ser da tribo *Cercopithecini*, dentro do gênero *Allenopithecus* (Macaco do pântano de Allen, *Allenopithecus nigroviridis*); dentro do gênero *Miopithecus* (Talapoim Angolano, *Miopithecus talapoin*; Talapoim do Gabão, *Miopithecus ogouensis*); dentro do gênero *Erythrocebus* (Macaco Pata, *Erythrocebus patas*); dentro do gênero *Chlorocebus* (Macaco Verde, *Chlorocebus sabaceus*; Grivê, *Chlorocebus aethiops*; Vervet das Montanhas de Bale, *Chlorocebus djamdjamensis*; Macaco Tantalus, *Chlorocebus tantalus*; Macaco Vervet, *Chlorocebus pygerythrus*; Malbrouck, *Chlorocebus cynosuros*); ou dentro do gênero *Cercopithecus* (Macaco Dryas ou Macaco Salongo, *Cercopithecus dryas*; Macaco Diana, *Cercopithecus diana*; Macaco Roloway, *Cercopithecus roloway*; Macaco Grande nariz arrebitado, *Cercopithecus nictitans*; Macaco Azul, *Cercopithecus mitis*; Macaco Prata, *Cercopithecus doggetti*; Macaco Dourado, *Cercopithecus kandti*; Macaco Sykes, *Cercopithecus albogularis*; Macaco Mona, *Cercopithecus mona*; Macaco Mona Campbell, *Cercopithecus campbelli*; Macaco Mona Lowe, *Cercopithecus lowei*; Macaco Mona Encrespado, *Cercopithecus pogonias*; Macaco Mona Guenon, *Cercopithecus wolffi*; Macaco Mona de Dent, *Cercopithecus denti*; Macaco de nariz arrebitado menor, *Cercopithecus petaurista*; Guenon de garganta branca, *Cercopithecus erythrogaster*; Guenon de Sclater, *Cercopithecus sclateri*; Guenon de orelha vermelha, *Cercopithecus erythrotis*; Gueno de bigode, *Cercopithecus cephus*; Macaco de cauda vermelha, *Cercopithecus ascanius*; Macaco de L'Hoest, *Cercopithecus lhoesti*; Macaco de Preuss, *Cercopithecus preussi*; Macaco de cauda dourada, *Cercopithecus solatus*; Macaco de Hamlyn ou Macaco cara de coruja, *Cercopithecus hamlyni*; Macaco de De Brazza, *Cercopithecus neglectus*).

Alternativamente, um vantajoso primata não pertencente ao gênero Chimpazee, também dentro da subfamília *Cercopithecinae*, mas dentro da tribo *Papionini*, pode ser do gênero *Macaca* (Macaco da barbária, *Macaca sylvanus*; Símio da cauda de leão, *Macaca silenus*; Símio da cauda de porco do sul ou

Beruk, *Macaca nemestrina*; Símio da cauda de porco do norte, *Macaca leonina*; Símio da Ilha Pagai ou Bokkoi, *Macaca pagensis*; Símio de Siberut, *Macaca siberu*; Símio Moor, *Macaca maura*; Símio de Botas, *Macaca ochreata*; Símio Tonkean, *Macaca tonkeana*; Símio de Heck, *Macaca hecki*; Símio Gorontalo, *Macaca*
 5 *nigriscens*; Símio encrespado da Celebes ou "Símio" Negro, *Macaca nigra*; macaco cinomolgo ou Símio comedor de caranguejo ou Símio da cauda longa ou Kera, *Macaca fascicularis*; Símio de cauda curta ou Símio urso, *Macaca arctoides*; Símio Rhesus, *Macaca mulatta*; Símio da pedra de Formosan, *Macaca cyclopis*; Símio japonês, *Macaca fuscata*; Símio de Toque, *Macaca sinica*; Símio de Bonnet,
 10 *Macaca radiata*; Símio da barbaria, *Macaca sylvanus*; Símio de Assam, *Macaca assamensis*; Símio tibetano ou Símio de Milne-Edwards, *Macaca thibetana*; Símio Arunachal ou Munzala, *Macaca munzala*); dentro do gênero *Lophocebus* (Mangabei da cara cinza, *Lophocebus albigena*; *Lophocebus albigena albigena*; *Lophocebus albigena osmani*; *Lophocebus albigena johnstoni*; Mangabei
 15 encrespado negro, *Lophocebus aterrimus*; Mangabei de Opdenbosch, *Lophocebus opdenboschi*; Mangabei das terras altas, *Lophocebus kipunji*); dentro do gênero *Papio* (Babuíno Hamadrias, *Papio hamadryas*; Babuíno da Guinéa, *Papio papio*; Babuíno Oliva, *Papio anubis*; Babuíno Amarelo, *Papio cynocephalus*; Babuíno Chacma, *Papio ursinus*); dentro do gênero *Theropithecus* (Gelada, *Theropithecus*
 20 *gelada*); dentro do gênero *Cercocebus* (Mangabei Acinzentado, *Cercocebus atys*; *Cercocebus atys atys*; *Cercocebus atys lunulatus*; Mangabei com colar, *Cercocebus torquatus*; Mangabei Agile, *Cercocebus agilis*; Mangabei de barriga dourada, *Cercocebus chrysogaster*; Mangabei do Rio Tanar, *Cercocebus galeritus*; Mangabei Sanje, *Cercocebus sanjei*); ou dentro do gênero *Mandrillus* (Mandrill,
 25 *Mandrillus sphinx*; Drill, *Mandrillus leucophaeus*).

O mais preferencial é *Macaca fascicularis* (também conhecido como macaco cinomolgo e, portanto, nos exemplos denominados como "Cinomolgos") e *Macaca mulatta* (macaco rhesus, denominado "rhesus").

Dentro da subfamília *Colobinae*, um vantajoso primata não
 30 pertencente ao gênero *Chimpazee* pode ser do grupo africano, dentro do gênero

Colobus (Colobo Negro, *Colobus satanas*; Colobo de Angola, *Colobus angolensis*; Colobo Rei, *Colobus polykomos*; Colobo de Ursine, *Colobus vellerosus*; Colobo preto e branco oriental, *Colobus guereza*); dentro do gênero *Piliocolobus* (Colobo Vermelho Ocidental, *Piliocolobus badius*; *Piliocolobus badius badius*; *Piliocolobus badius temminckii*; *Piliocolobus badius waldroneae*; Colobo de Pennant, *Piliocolobus pennantii*; *Piliocolobus pennantii pennantii*; *Piliocolobus pennantii epieni*; *Piliocolobus pennantii bouvieri*; Colobo Vermelho de Preuss, *Piliocolobus preussi*; Colobo Vermelho de Thollon, *Piliocolobus tholloni*; Colobo Vermelho Africano Central, *Piliocolobus foai*; *Piliocolobus foai foai*; *Piliocolobus foai ellioti*; *Piliocolobus foai oustaleti*; *Piliocolobus foai semlikiensis*; *Piliocolobus foai parmentierorum*; Colobo Vermelho de Uganda, *Piliocolobus tephrosceles*; Colobo Vermelho de Uzinga, *Piliocolobus gordonorum*; Colobo Vermelho de Zanzibar, *Piliocolobus kirkii*; Colobo Vermelho do Rio Tana, *Piliocolobus rufomitatus*); ou dentro do gênero *Procolobus* (Colobo Oliva, *Procolobus verus*).

15 Dentro da subfamília *Colobinae*, um vantajoso primata não pertencente ao gênero *Chimpazee* pode ser alternativamente do grupo *Langur* (macaco folha), dentro do gênero *Semnopithecus* (*Langur Cinza do Nepal*, *Semnopithecus schistaceus*; *Langur Cinza de Caxemira*, *Semnopithecus ajax*; *Langur Cinza de Tarai*, *Semnopithecus hector*; *Langur Cinza das Planícies do Norte*, *Semnopithecus entellus*; *Langur Cinza da Pata Negra*, *Semnopithecus hypoleucos*; *Langur Cinza das Planícies do Sul*, *Semnopithecus dussumieri*; *Langur Cinza com Crista*, *Semnopithecus priam*); dentro do grupo *T. vetulus* ou do gênero *Trachypithecus* (*Langur de cara roxa*, *Trachypithecus vetulus*; *Langur de Nilgiri*, *Trachypithecus johnii*); dentro do grupo *T. cristatus* do gênero *Trachypithecus* (*Gibão de Java*, *Trachypithecus auratus*; *Macaco folha de prata ou Gibão Prateado*, *Trachypithecus cristatus*; *Gibão da Indochina*, *Trachypithecus germaini*; *Gibão do Tenasserim*, *Trachypithecus barbei*); dentro do grupo *T. obscurus* do gênero *Trachypithecus* (*Macaco Folha Escura ou Macaco Folha de Óculos*, *Trachypithecus obscurus*; *Macaco Folha de Phayre*, *Trachypithecus phayrei*); dentro do grupo *T. pileatus* do gênero *Trachypithecus* (*Gibão de Chapéu*,

Trachypithecus pileatus; Gibão de Shortridge's, *Trachypithecus shortridgei*; Gibão Dourado de Gee, *Trachypithecus geei*; dentro do grupo *T. francoisi* do gênero *Trachypithecus* (Gibão de Francois, *Trachypithecus francoisi*; Gibão de Hatinh, *Trachypithecus hatinhensis*; Gibão da cabeça branca, *Trachypithecus poliocephalus*; Gibão de Laotian, *Trachypithecus laotum*; Gibão de Delacour, *Trachypithecus delacouri*; Gibão Negro da Indochina, *Trachypithecus ebenus*); ou dentro do gênero *Presbytis* (Surili de Sumatra, *Presbytis melalophos*; Surili Listrado, *Presbytis femoralis*; Surili de Sarawak, *Presbytis chrysomelas*; Surili de coxa branca, *Presbytis siamensis*; Surili de frente branca, *Presbytis frontata*; Surili de Java, *Presbytis comata*; Gibão de Thomas, *Presbytis thomasi*; Gibão de Hose, *Presbytis hosei*; Macaco Folha de Maroon, *Presbytis rubicunda*; Gibão de Mentawai ou Joja, *Presbytis potenziani*; Surili da Ilha Natuna, *Presbytis natunae*).

Dentro da subfamília *Colobinae*, um vantajoso primata não pertencente ao gênero *Chimpazee* pode alternativamente ser do grupo nariz estranho, dentro do gênero *Pygathrix* (Douc de canela vermelha, *Pygathrix nemaeus*; Douc de canela preta, *Pygathrix nigripes*; Douc de canela cinza, *Pygathrix cinerea*); dentro do gênero *Rhinopithecus* (Macaco de nariz arrebitado dourado, *Rhinopithecus roxellana*; Macaco de nariz arrebitado negro, *Rhinopithecus bieti*; Macaco de nariz arrebitado cinza, *Rhinopithecus brelichi*; Gibão de nariz arrebitado de Tonkin, *Rhinopithecus avunculus*); dentro do gênero *Nasalis* (Macaco de tromba, *Nasalis larvatus*); ou dentro do gênero *Simias* (Gibão de cauda de porca, *Simias concolor*).

Conforme usado no presente documento, o termo "marmoset" denota quaisquer Macacos do Novo Mundo do gênero *Callithrix*, por exemplo, pertencendo aos Marmosets atlânticos do subgênero *Callithrix* (sic!) (Marmoset Comum, *Callithrix (Callithrix) jacchus*; Marmoset de topete negro, *Callithrix (Callithrix) penicillata*; Marmoset de Wied, *Callithrix (Callithrix) kuhlii*; Marmoset de cabeça branca, *Callithrix (Callithrix) geoffroyi*; Marmoset de cabeça amarelo claro, *Callithrix (Callithrix) flaviceps*; Marmoset de topete amarelo claro, *Callithrix (Callithrix) aurita*); pertencente aos Marmosets da Amazônia do subgênero *Mico* (Marmoset Rio Acari,

Callithrix (Mico) acariensis; Marmoset de Manicoré, *Callithrix (Mico) manicorensis*; Marmoset prateado, *Callithrix (Mico) argentata*; Marmoset branco, *Callithrix (Mico) leucippe*; Marmoset de Emilia, *Callithrix (Mico) emiliae*; Marmoset de cabeça negra, *Callithrix (Mico) nigriceps*; Marmoset de Marca, *Callithrix (Mico) marcai*; Marmoset de cauda negra, *Callithrix (Mico) melanura*; Marmoset de Santarém, *Callithrix (Mico) humeralifera*; Marmoset de Maués, *Callithrix (Mico) mauesi*; Marmoset dourado e branco, *Callithrix (Mico) chrysoleuca*; Marmoset de Hershkovitz, *Callithrix (Mico) intermedia*; Marmoset de Satéré, *Callithrix (Mico) saterei*; Dwarf Marmoset Anão de Roosmalens pertencente ao subgênero *Callibella* (*Callithrix (Callibella) humilis*); ou o Marmoset pigmeu pertencente ao subgênero *Cebuella* (*Callithrix (Cebuella) pygmaea*).

Outro gênero dos Macacos do Novo Mundo compreende tamarins do gênero *Saguinus* (compreendendo o grupo *S. oedipus*, o grupo *S. midas*, o grupo *S. nigricollis*, o grupo *S. mystax*, o grupo *S. bicolor* e o grupo *S. inustus*) e macacos esquilo do gênero *Saimiri* (por exemplo, *Saimiri sciureus*, *Saimiri oerstedii*, *Saimiri ustus*, *Saimiri boliviensis*, *Saimiri vanzolini*)

Em uma modalidade preferencial da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, o primata não pertencente ao gênero Chimpazee é um macaco do Velho Mundo. Em uma modalidade mais preferencial do polipeptídeo, o macaco do Velho Mundo é um macaco do gênero *Papio* do gênero Símio. Com mais preferência, o macaco do gênero Símio é um Símio de Assamese (*Macaca assamensis*), símio da barbaria (*Macaca sylvanus*), símio de Bonnet (*Macaca radiata*), símio de bota ou de bota de Sulawesi (*Macaca ochreata*), símio encrespado de Sulawesi (*Macaca nigra*), símio da pedra de Formosa (*Macaca cyclopsis*), símio de neve do Japão ou símio japonês (*Macaca fuscata*), macaco cinomolgo ou macaco comedor de caranguejo ou símio de cauda longa ou símio de Java (*Macaca fascicularis*), símio de cauda de leão (*Macaca silenus*), símio de cauda de porco (*Macaca nemestrina*), símio rhesus (*Macaca mulatta*), símio tibetano (*Macaca thibetana*), símio de Tonkean (*Macaca tonkeana*), símio de Toque (*Macaca sinica*), símio de cauda curta ou símio de cara vermelha ou símio

urso (*Macaca arctoides*), ou símio de Moor (*Macaca maurus*). Com a máxima preferência, o macaco do gênero *Papio* é *Hamadryas Baboon*, *Papio hamadryas*; *Guinea Baboon*, *Papio papio*; *Olive Baboon*, *Papio anubis*; *Yellow Baboon*, *Papio cynocephalus*; *Chacma Baboon*, *Papio ursinus*.

5 Em uma modalidade alternativamente preferencial da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, o primata não pertencente ao gênero Chimpazee é um macaco do Novo Mundo. Em uma modalidade mais preferencial do polipeptídeo, o maçado do Novo Mundo é um macaco do gênero *Callithrix* (marmoset), do gênero *Saguinus* ou do gênero *Samiri*. Com mais
10 preferência, o macaco do gênero *Callithrix* é *Callithrix jacchus*, o macaco do gênero *Saguinus* é *Saguinus oedipus* e o macaco do gênero *Samiri* é *Saimiri sciureus*.

O termo “antígeno de superfície celular” conforme usado no presente documento denota uma molécula, que é exibida sobre a superfície de uma célula. Na maioria dos casos, essa molécula estará localizada em ou sobre a membrana
15 de plasma da célula, de modo que pelo menos parte dessa molécula permaneça acessível da parte externa da célula em forma terciária. Um exemplo não limitador de uma molécula de superfície celular, que está localizada na membrana de plasma é uma proteína de transmembrana que compreende, em sua conformação terciária, regiões de hidrofili-
20 dade e hidrofobicidade. Aqui, pelo menos uma região hidrofóbica permite que a molécula de superfície celular seja embutida ou inserida na membrana de plasma hidrofóbica da célula enquanto as regiões hidrofílicas se estendem no mesmo lado da membrana de plasma no espaço citoplasmático e extracelular, respectivamente. Exemplos não limitadores de moléculas de
25 superfície celular que estão localizadas sobre a membrana de plasma são proteínas que foram modificadas em um resíduo de cisteína para portar um a grupo palmitoil, proteínas modificadas em um resíduo de cisteína de terminal C para portar um grupo farnesil ou proteínas que foram modificadas na terminação C para portar uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (“GPI”). Esses grupos permitem
30 uma fixação covalente de proteínas com a superfície externa da membrana de plasma, na qual permanecem para o reconhecimento por moléculas extracelulares

como anticorpos. Os exemplos de antígeno de superfície celulares são épsilon de CD3 e PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α .

5 Conforme descrito no presente documento acima, PSCA é um antígeno de superfície celular que é um alvo para terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a câncer de próstata, câncer da bexiga ou câncer pancreático.

10 Também conforme descrito no presente documento cima, CD19 é um antígeno de superfície celular que é um alvo para a terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a malignidades da célula B como linfoma de não Hodgkin, doenças auto-imunes mediadas pela célula B ou a depleção de célula B.

15 Conforme descrito no presente documento acima, C-MET é um antígeno de superfície celular que é um alvo para terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a carcinomas, sarcomas, glioblastomas/astrocitomas, melanomas, mesoteliomas, tumor de wilms ou malignidades hematopoiéticas como leucemias, linfomas ou múltiplos mielomas.

20 Além disso, conforme descrito no presente documento acima, Endosialin é um antígeno de superfície celular que é um alvo para terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a carcinomas (de mama, dos rins, do pulmão, colorretal, do colo, mesotelioma do pâncreas), sarcomas e tumores neuroectodermiais (melanoma, glioma, neuroblastoma).

25 Conforme também descrito no presente documento acima, EpCAM é um antígeno de superfície celular que é um alvo para terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a câncer epitelial ou um câncer residual mínimo.

Adicionalmente, conforme descrito no presente documento acima, alfa de FAP é um antígeno de superfície celular que é um alvo para terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a, câncer epitelial.

30 Além disso, conforme descrito no presente documento acima, IGF-1R é um antígeno de superfície celular que é um alvo para terapia de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a, câncer do tecido mole ou ósseo (por exemplo,

sarcoma de Ewing), da mama, do fígado, do pulmão, da cabeça e pescoço, colorretal, próstata, leiomiosarcoma, câncer cervical e endometrial, do ovário, da próstata e câncer pancreático e doenças auto-imunes, incluindo, mas não se limitando a, de preferência, psoríase.

5 À luz disso, PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α também pode ser caracterizado como um antígeno tumoral. O termo “antígeno tumoral” conforme usado no presente documento pode ser compreendido como aqueles antígenos que estão presentes em célula tumorais. Esses antígenos podem estar presentes sobre a superfície celular com
10 uma parte extracelular, que é frequentemente combinada com uma parte de transmembrana e citoplasmática da molécula. Esses antígenos podem, algumas vezes, se apresentarem apenas por células tumorais e nunca por células normais. Os antígenos tumorais podem ser exclusivamente expressos em células tumorais ou podem representar uma mutação específica tumoral comparada às células
15 normais. Nesse caso, são chamados de específicos de antígeno tumoral. Os antígenos mais comuns são apresentados por célula tumorais e células normais, e são chamados de antígenos associados ao tumor. Esses antígenos associados ao tumor podem ser superexpressos comparados às células normais ou são acessíveis para a aglutinação de anticorpo em células tumorais devido à menor
20 estrutura compacta do tecido tumoral comparada com a do tecido normal. Exemplos de antígenos tumorais de acordo com a presente invenção são PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R e FAP α .

Conforme descrito no presente documento acima, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção aglutina o primeiro domínio de
25 aglutinação a um epítopo de cadeia de CD3 ϵ (épsilon) de ser humano e de primata não pertencente ao gênero Chimpazee, em que o epítopo é parte de uma sequência de aminoácidos incluída no grupo que consiste em 27 resíduos de aminoácido conforme descrito nas SEQ ID N^{os} 2, 4, 6 ou 8 ou um fragmento funcional do mesmo.

30 De acordo com a presente invenção é preferencial que a molécula de

anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção do dito epítopo seja parte de uma sequência de aminoácidos que compreende 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 ou 5 aminoácidos.

5 Mais preferivelmente, sendo que o dito epítopo compreende pelo menos a sequência de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu (Q-D-G-N-E).

Dentro da presente invenção, um fragmento funcional dos resíduos de aminoácidos N-terminal 1 a 27 significa que o dito fragmento funcional é ainda um epítopo independente do contexto mantendo a sua integridade estrutural tridimensional quando tirado de seu ambiente nativo no complexo CD3 (e fundido a uma sequência de aminoácido heteróloga como EpCAM ou uma parte Fc da imunoglobulina, por exemplo, como mostrado no Exemplo 3.1). A manutenção da estrutura tridimensional dentro do polipeptídeo N-terminal de aminoácido 27 ou fragmento funcional de CD3 épsilon pode ser usado para a geração de domínios de ligação que se ligam ao fragmento de polipeptídeo épsilon CD3 N-terminal *in vitro* e os nativos (subunidade CD3 épsilon do) complexo CD3 em células T *in vivo* com a mesma afinidade de ligação. Dentro da presente invenção, um fragmento funcional dos resíduos de aminoácidos 1 a 27 N-terminal significa que os domínios de ligação CD3 fornecidos ainda podem ligar a esses fragmentos funcionais no contexto de uma maneira independente. O elemento versado na técnica conhece os métodos de mapeamento de epítopos para determinar quais os resíduos de aminoácidos de um epítopo são reconhecidos por esses domínios de ligação anti-CD3 (por exemplo, a varredura de alanina; ver exemplos em anexo).

Em uma modalidade da invenção, a molécula do anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção compreende um (primeiro) domínio de ligação capaz de ligar a um epítopo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3ε e um segundo domínio de ligação capazes de se ligar ao antígeno de superfície celular PSCA. Em modalidades alternativas da invenção do dito segundo domínio de ligação capaz de se ligar ao antígeno de superfície celular CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAPα

30 Dentro da presente invenção é ainda preferido que o segundo

domínio de ligação ligue-se ao antígeno de superfície de células humanas PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α e / ou de um primata não pertencente ao gênero Chimpanzee PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α . Particularmente preferido, o

5 segundo domínio de ligação liga-se ao antígeno de superfície da célula humana PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α e de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee , respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α , de preferência um macaco PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α . Deverá ser

10 compreendido, que o segundo domínio de ligação liga-se a pelo menos um PSCA de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α , no entanto, pode-se ligar também a dois, três ou mais, PSCA homólogos de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, respectivamente homólogos CD19, homólogos C-MET, homólogos

15 Endosialin, homólogos EpCAM, homólogos de IGF-1R ou homólogos FAP α . Por exemplo, o segundo domínio de ligação pode ligar o PSCA do macaco Cynomogus, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α , e para o PSCA do macaco Rhesus, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM , IGF-1R ou FAP α .

20 Para a geração do segundo domínio de ligação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, por exemplo, anticorpos de cadeia única biespecífica, como definido aqui, podem ser usados os anticorpos monoclonais ligando-se a ambas os respectivos antígenos de superfície celular humana e / ou primatas que não sejam chimpanzés como PSCA , respectivamente,

25 CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α . Os domínios de ligação adequados para o polipeptídeo biespecífico como aqui definido, por exemplo, pode ser derivado dos anticorpos monoclonais de específicos de cruzamento de espécies por métodos de recombinação descritos na técnica. Um anticorpo monoclonal ligando-se a um antígeno da superfície celular humana e ao homólogo

30 do dito antígeno de superfície celular em um primata não pertencente ao gênero

Chimpanzee pode ser testado por ensaios FACS conforme estabelecido acima. É evidente, para aqueles versados na técnica que os anticorpos específicos de cruzamento de espécies também podem ser gerados por técnicas de hibridoma descritos na literatura (Milstein e Kohler, Nature 256 (1975), 495 a 7). Por exemplo, os camundongos podem ser alternadamente imunizados com antígeno de superfície celular humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, como PSCA, respectivamente CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α . A partir destes camundongos, as células hibridoma produtoras de anticorpos específicos de cruzamento de espécies são isoladas por meio da tecnologia de hibridoma e analisados por FACS conforme estabelecido acima. A geração e análise de polipeptídeos biespecíficos como anticorpos de cadeia simples biespecíficos, apresentando especificidade de cruzamento entre espécies conforme descrito aqui é mostrado nos exemplos a seguir. As vantagens dos anticorpos biespecíficos de cadeia simples, apresentando especificidade de cruzamento entre espécies incluem os pontos enumerados aqui.

É particularmente preferido para a molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única da invenção que o primeiro domínio de ligação capaz de se ligar a um epítopo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3 ϵ compreenda uma região VL que compreende CDR-L1, L2 CDR e CDR-L3 selecionados a partir de:

- (a) CDR-L1 como apresentado na SEQ ID Nº. 27, CDR-L2 como apresentado na SEQ ID Nº. 28 e CDR-L3 como apresentado na SEQ ID Nº. 29;
- (b) CDR-L1 como apresentado na SEQ ID Nº. 117, CDR-L2 como apresentado na SEQ ID Nº. 118 e CDR-L3 como apresentado na SEQ ID Nº. 119; e
- (c) CDR-L1 como apresentado na SEQ ID Nº. 153, CDR-L2 como apresentado na SEQ ID Nº. 154 e CDR-L3 como apresentado na SEQ ID Nº. 155.

As regiões variáveis, ou seja, a cadeia leve variável ("L" ou "VL") e a cadeia pesada variável ("H" ou "VH") são entendidas na técnica por proporcionar o domínio de ligação de um anticorpo. Estas regiões variáveis abrigam as regiões complementares determinantes.

O termo "região complementar determinante" (CDR) é bem conhecida na técnica para ditar a especificidade do antígeno de um anticorpo. O termo "CDR-L" ou "L CDR" ou "LCDR" refere-se aos CDRs no VL, enquanto o termo "CDR-H" ou "H CDR" ou "HCDR" refere-se aos CDRs no VH.

- 5 Em uma modalidade alternativa preferencial da molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única da invenção o primeiro domínio de ligação capaz de se ligar a um epítipo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3ε compreende uma região VH que compreende CDR-H 1, CDR-H2 e CDR-H3 selecionados:
- 10 (a) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 12, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 13 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 14;
- (b) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 30, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 31 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 32;
- (c) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 48, CDR-H2 como
15 apresentado na SEQ ID Nº. 49 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 50;
- (d) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 66, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 67 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 68;
- (e) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 84, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 85 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 86;
- 20 (f) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 102, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 103 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 104;
- (g) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 120, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 121 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 122;
- (h) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 138, CDR-H2 como
25 apresentado na SEQ ID Nº. 139 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 140;
- (i) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 156, CDR-H2 como apresentado na SEQ ID Nº. 157 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 158;
- e
- (j) CDR-H1 como apresentado na SEQ ID Nº. 174, CDR-H2 como
30 apresentado na SEQ ID Nº. 175 e CDR-H3 como apresentado na SEQ ID Nº. 176.

Além disso, é preferível que o domínio de ligação capaz de se ligar a um epítopo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3ε compreenda uma região VL selecionada do grupo que consiste em uma região VL como mostrado na SEQ ID N°. 35, 39, 125, 129, 161 ou 165.

5 É preferível, de modo alternativo, que o primeiro domínio de ligação capaz de se ligar a um epítopo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3ε compreenda uma região VH selecionada do grupo que consiste em uma região VH como mostrado na SEQ ID N°.

15 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 ou 181.

15 Mais preferivelmente, a molécula biespecífica do anticorpo de cadeia única da invenção é caracterizada pelo primeiro domínio de ligação capaz de ligar a um epítopo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3ε , que compreende uma região VL e uma região VH selecionada do grupo consistindo em:

(a) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 17 ou 21 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 15 ou 19;

(b) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 35 ou 39 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 33 ou 37;

20 (c) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 53 ou 57 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 51 ou 55;

(d) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 71 ou 75 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 69 ou 73;

25 (e) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 89 ou 93 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 87 ou 91;

(f) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 107 ou 111 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 105 ou 109;

(g) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 125 ou 129 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 123 ou 127;

30 (h) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 143 ou 147 e

uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 141 ou 145;

(i) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 161 ou 165 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 159 ou 163; e

(j) uma região VL como apresentado na SEQ ID N°. 179 ou 183 e uma região VH como apresentado na SEQ ID N°. 177 ou 181.

De acordo com uma modalidade preferida da molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única da invenção, os pares das regiões-VH e regiões-VL no primeiro domínio de ligação ligando ao épsilon CD3 estão no formato de um anticorpo de cadeia única (scFv).

As regiões VH e VL estão dispostas na ordem VH-VL ou VL-VH. É preferível que a região-VH esteja posicionada N-terminalmente para uma sequência de ligante. A região-VL está posicionada C-terminalmente da sequência de ligante. Em outras palavras, o arranjo de domínio no domínio de ligação CD3 da molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única da invenção é preferivelmente VH-VL, com o dito domínio de ligação CD3 localizado C-terminalmente para o segundo domínio de ligação (antígeno de superfície celular, como PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α). De preferência, o VH-VL compreende ou é SEQ ID N°. 185.

Uma modalidade preferida da molécula biespecífica do anticorpo de cadeia única acima descrito da invenção é caracterizada pelo primeiro domínio de ligação capaz de ligar a um epítipo de cadeia humana e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3 ϵ que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 ou 187.

A invenção ainda refere-se a um anticorpo biespecífico de cadeia única acima descrito, sendo que o segundo domínio de ligação liga-se ao antígeno de superfície celular PSCA, CD19, C-MET, Endosialin, EpCAM, IGF-1R ou FAP α .

PSCA $\times$ CD3

De acordo com uma modalidade preferida da invenção uma molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única acima caracterizado compreende um

grupo das sequências seguintes CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de ligação selecionados do grupo composto por:

a) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 382 a 384 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 377 a 379;

5 b) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 400 a 402 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 395 a 397;

c) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 414 a 416 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 409 a 411;

10 d) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 432 a 434 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 427 a 429;

e) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1215 a 1217 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1220 a 1222;

f) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1187 a 1189 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1192 a 1194;

15 g) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1173 a 1175 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1178 a 1180;

h) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1229 a 1231 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1234 a 1236;

20 i) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1201 a 1203 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1206 a 1208;

k) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1257 a 1259 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1262 a 1264; e

l) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1243 a 1245 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1248 a 1250.

25 As sequências das regiões correspondentes VL e VH do segundo domínio de ligação da molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única da invenção, assim como dos respectivos scFvs são mostrados na listagem de sequência.

30 Na molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única da invenção dos domínios de ligação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH,

VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, como exemplificado nos exemplos anexados. Preferencialmente, os domínios de ligação são dispostos na ordem VH PSCA-VL PSCA-VH CD3-VL CD3 ou VL PSCA-VH PSCA-VH CD3-VL CD3.

Uma modalidade particularmente preferida da invenção diz respeito a um polipeptídeo caracterizado acima, sendo que a molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácidos como representado em qualquer das SEQ ID N^{os}: 389, 421, 439, 391, 405, 423, 441, 1226, 1198, 1184, 1240, 1212, 1268 ou 1254

(b) uma sequência de aminoácidos encodificados por uma sequência de ácidos nucleicos como descrito em qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 390, 422, 440, 392, 406, 424, 442, 1227, 1199, 1185, 1241, 1213, 1269 ou 1255; e

(c) uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica, mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica, mais preferencialmente pelo menos 96% idêntica a sequência de aminoácidos (a) ou (b).

A invenção se refere a uma molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única compreendendo uma sequência de aminoácidos como representado em qualquer das SEQ ID N^{os}: 389, 421, 439, 391, 405, 423, 441, 1226, 1198, 1184, 1240, 1212, 1268 ou 1254, assim como uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica, de preferência de 90%, mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica, mais preferencialmente, pelo menos, 96, 97, 98 ou 99% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N^{os}: 389, 421, 439, 391, 405, 423, 441, 1226, 1198, 1184, 1240, 1212, 1268 ou 1254. A invenção se refere também às sequências de ácido nucleico correspondentes como descrito em qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 390, 422, 440, 392, 406, 424, 442, 1227, 1199, 1185, 1241, 1213, 1269 ou 1255, assim como as sequências de ácidos nucleicos pelo menos 85% idêntica, de preferência de 90%, mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica, mais preferencialmente pelo menos, 96, 97, 98 ou 99% idêntica às sequências de ácidos nucleicos mostradas na SEQ ID N^{os}: 390, 422, 440, 392, 406, 424, 442, 1227, 1199, 1185, 1241, 1213, 1269 ou 1255. Deve-se entender que a identidade

da sequência é determinada em toda sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos. Para o alinhamento das sequências, por exemplo, os programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443 a 453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482 a 489), que está contido no

5 pacote de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA, 53.711 (1991). É um método de rotina para aqueles versados na técnica de determinar e identificar uma sequência de nucleotídeo ou de aminoácidos tendo por exemplo, 85% (90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de

10 identidade de sequência para as sequências de nucleotídeos ou de aminoácido do anticorpo biespecífico de cadeia única da invenção. Por exemplo, de acordo com a hipótese de Wobble de Crick, a base 5' no anticódon não é tão limitada espacialmente como as outras duas bases, e poderia assim ter um emparelhamento de base não padrão. Em outras palavras: a terceira posição em um trio de códon pode variar de modo que dois trios que diferem nesta terceira

15 posição podem encodificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida a pessoa versada na técnica (ver, por exemplo http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548 a 55).

Os arranjos de domínio preferidos nos construtos biespecíficos de

20 anticorpo de cadeia única PSCAxCD3 da invenção são mostrados nos exemplos a seguir.

Em uma modalidade preferida da invenção, os anticorpos biespecíficos de cadeia única são cruzamentos de espécies específicas para épsilon CD3 e para o antígeno de superfície celular humana e de primata não

25 pertencente ao gênero Chimpanzee PSCA reconhecido pelo seu segundo domínio de ligação.

CD19xCD3

De acordo com uma modalidade alternativa preferida da invenção uma molécula biespecífica de anticorpo de cadeia única acima caracterizada

30 compreende um grupo das seguintes sequências CDR H1, CDR H2, CDR H3,

CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de ligação selecionados a partir do grupo que consiste em:

- a) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 478 a 480 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 473 a 475;
- 5 b) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 530 a 532 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 525 a 527;
- c) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 518 a 520 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 513 a 515;
- d) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 506 a 508 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 501 a 503;
- 10 e) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 494 a 496 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 489 a 491;
- f) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 542 a 544 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 537 a 539;
- 15 g) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 554 a 556 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 549 a 551;
- h) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 566 a 568 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 561 a 563;
- i) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 578 a 580 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 573 a 575;
- 20 j) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 590 a 592 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 585 a 587;
- k) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 602 a 604 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 597 a 599;
- 25 l) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 614 a 616 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 609 a 611;
- m) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 626 a 628 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 621 a 623;
- n) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 638 a 640 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 633 a 635;
- 30

- o) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 650 a 652 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 645 a 647;
- p) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 662 a 664 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 657 a 659;
- 5 q) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 674 a 676 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 669 a 671;
- r) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 686 a 688 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 681 a 683;
- s) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 698 a 700 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 10 693 a 695;
- t) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 710 a 712 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 705 a 707;
- u) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 722 a 724 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 717 a 719;
- 15 v) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 734 a 736 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 729 a 731;
- w) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 746 a 748 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 741 a 743;
- x) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 758 a 760 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 20 753 a 755;
- y) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1271 a 1273 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1276 a 1278;
- z) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1285 a 1287 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1290 a 1292;
- 25 aa) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1299 a 1301 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1304 a 1306;
- ab) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1313 a 1315 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1318 a 1320;
- ac) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1327 a 1329 e CDR L1-3 da SEQ ID 30 Nº: 1332 a 1334;

ad) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1341 a 1343 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1346 a 1348;

ae) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1355 a 1357 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1360 a 1362;

5 af) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1369 a 1371 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1374 a 1376; e

ag) CDR H1-3 da SEQ ID Nº: 1383 a 1385 e CDR L1-3 da SEQ ID Nº: 1388 a 1390.

10 As sequências das regiões VL- e VH- correspondentes do segundo domínio de aglutinação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção bem como dos respectivos scFvs são mostradas na listagem de sequência.

Na molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH, 15 VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, conforme exemplificado nos exemplos em anexo. De preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VH CD19-VL CD19-VH CD3-VL CD3 ou VL CD19-VH CD19-VH CD3-VL CD3. Com mais preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL CD19-VH CD19-VH CD3-VL CD3.

20 Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nos. 481, 485, 483, 533, 521, 509, 497, 545, 557, 569, 581, 25 593, 605, 617, 629, 641, 653, 665, 677, 689, 701, 713, 725, 737, 749, 761, 1282, 1296, 1310, 1324, 1338, 1352, 1366, 1380 ou 1394 ;

(b) uma sequência de aminoácido codificada por uma sequência de ácido nucléico conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nº: 482, 486, 484, 534, 522, 510, 498, 546, 558, 570, 582, 594, 606, 618, 630, 642, 654, 30 666, 678, 690, 702, 714, 726, 738, 750, 762, 1283, 1297, 1311, 1325, 1339, 1353,

1367, 1381 ou 1395; e

(c) uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica, com mais preferência, pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência, pelo menos 96 % idêntica à sequência de aminoácido de (a) ou (b).

5 A invenção se refere a uma molécula de anticorpo de cadeia única
 biespecífica que compreende uma sequência de aminoácido conforme revelada
 em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 481, 485, 483, 533, 521, 509, 497, 545, 557,
 569, 581, 593, 605, 617, 629, 641, 653, 665, 677, 689, 701, 713, 725, 737, 749,
 761, 1282, 1296, 1310, 1324, 1338, 1352, 1366, 1380 ou 1394, bem como a uma
 10 sequência de aminoácido pelo menos 85% idêntica, de preferência, 90 %, com
 mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos
 96, 97, 98, ou 99 % idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 481, 485,
 483, 533, 521, 509, 497, 545, 557, 569, 581, 593, 605, 617, 629, 641, 653, 665,
 677, 689, 701, 713, 725, 737, 749, 761, 1282, 1296, 1310, 1324, 1338, 1352, 1366,
 15 1380 ou 1394. A invenção também se refere às sequências de ácido nucléico
 correspondentes conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 482, 486,
 484, 534, 522, 510, 498, 546, 558, 570, 582, 594, 606, 618, 630, 642, 654, 666,
 678, 690, 702, 714, 726, 738, 750, 762, 1283, 1297, 1311, 1325, 1339, 1353, 1367,
 1381 ou 1395 bem como a sequências de ácido nucléico pelo menos 85% idêntica,
 20 de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima
 preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica às sequências de ácido
 nucléico mostradas na SEQ ID N°: 482, 486, 484, 534, 522, 510, 498, 546, 558,
 570, 582, 594, 606, 618, 630, 642, 654, 666, 678, 690, 702, 714, 726, 738, 750,
 762, 1283, 1297, 1311, 1325, 1339, 1353, 1367, 1381 ou 1395. Deve ficar
 25 entendido que a identidade de sequência é determinada sobre toda sequência de
 aminoácido ou nucleotídeo. Para alinhamentos de sequência, por exemplo, os
 programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol.
 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que é
 contido no pacote de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science
 30 Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991). É um método de rotina para

aqueles elementos versados na técnica determinar e identificar uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo que tem, por exemplo, 85% (90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com as sequências de aminoácido ou nucleotídeo do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção. Por exemplo, de acordo com a hipótese Crick's Wobble, a base 5' no anti-códon não é espacialmente confinada como as outras duas bases, e poderiam, dessa forma, ter pareamento base não padrão. Em outras palavras: uma terceira posição em um triplete de códon pode variar de modo que dois triplets que diferem nesta terceira posição pode codificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida pelo elemento versado na técnica (vide, por exemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548–55).

As disposições de domínio preferenciais nos construtos de anticorpo de cadeia única biespecífico CD19xCD3 da invenção são mostradas nos seguintes exemplos.

Em uma modalidade preferencial da invenção, os anticorpos de cadeia única biespecífica são espécies cruzadas específicas para épsilon de CD3 e para um antígeno de superfície de célula de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee e humano CD19 reconhecido por seu segundo domínio de aglutinação.

c-METxCD3

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionada do grupo que consiste em:

a) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 821 - 823 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 816 - 818;

b) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 836 - 838 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 833 - 835;

- c) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 845 – 847 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 840 - 842;
- d) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 863 - 865 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 858 – 860;
- 5 e) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 881 – 883 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 876 – 878;
- f) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 899 – 901 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 894 – 896;
- g) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1401 – 1403 e CDR L1-3 de SEQ ID
10 NO: 1406 – 1408;
- h) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1415 – 1417 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 1420 – 1422;
- i) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1429 – 1431 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1434 – 1436;
- 15 j) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1443 – 1445 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1448 – 1450;
- k) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1457 – 1459 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 1462 – 1464;
- l) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1471 – 1473 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1476 – 1478;
- 20 m) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1639 – 1641 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 1644 – 1646;
- n) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1625 – 1627 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 1630 – 1632;
- 25 o) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1611 – 1613 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 1616 – 1618;
- p) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1597 – 1599 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 1602 – 1604;
- q) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1569 – 1571 e CDR L1-3 de SEQ ID
30 NO: 1574 – 1576;

r) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1555 – 1557 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1560 – 1562;

s) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1583 – 1585 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1588 – 1590;

5 t) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1541 – 1543 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1546 – 1548;

u) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1513 – 1515 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1518 – 1520;

10 v) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1527 – 1529 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1532 – 1534;

w) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1499 – 1501 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1504 – 1506; e

x) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1485 – 1487 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1490 – 1492.

15 As sequências das regiões VL- e VH correspondentes do segundo domínio de aglutinação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção bem como dos respectivos scFvs são mostradas na listagem de sequência.

20 Na molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH, VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, conforme exemplificado nos exemplos em anexo. Preferencialmente, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VH C-MET-VL C-MET-VH CD3-VL CD3 ou VL C-MET-VH C-MET-VH CD3-VL CD3.

25 Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nos. 829, 853, 871, 889, 831, 855, 873, 891, 905, 1412, 1426, 1440, 1454, 1468 ou 1482;

30 (b) uma sequência de aminoácido codificada por uma sequência

de ácido nucléico conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 830, 854, 872, 890, 832, 856, 874, 892, 906, 1413, 1427, 1441, 1455, 1469, ou 1483; e

- (c) uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96 % idêntica à sequência de aminoácido de (a) ou (b).

A invenção refere-se a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 829, 853, 871, 889, 831, 855, 873, 891, 905, 1412, 1426, 1440, 1454, 1468 ou 1482; bem como uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 829, 853, 871, 889, 831, 855, 873, 891, 905, 1412, 1426, 1440, 1454, 1468 ou 1482;. A invenção também se refere às sequências de ácido nucléico correspondentes conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 830, 854, 872, 890, 832, 856, 874, 892, 906, 1413, 1427, 1441, 1455, 1469, ou 1483; bem como às sequências de ácido nucléico pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica às sequências de ácido nucléico mostradas na SEQ ID N°: 830, 854, 872, 890, 832, 856, 874, 892, 906, 1413, 1427, 1441, 1455, 1469, ou 1483;. Deve ficar entendido que a identidade de sequência é determinada sobre toda a sequência de aminoácido ou nucleotídeo. Para alinhamentos de sequência, por exemplo, os programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que está contido no pacote de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991). É um método de rotina para aqueles versados na técnica determinar e identificar uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo que tem, por exemplo, 85% (90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido ou nucleotídeos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção. Por exemplo, de acordo com a

hipótese Crick's Wobble, a base 5' no anti-códon não é espacialmente confinada como as outras duas bases e poderia, dessa forma, ter pareamento base não padrão. Em outras palavras: a terceira posição em um tripleto de códon pode variar de modo que dois tripletos que diferem nesta terceira posição podem codificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida pelos elementos versados na técnica (vide, por exemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548–55).

As disposições de domínio preferenciais nos construtos de anticorpo de cadeia única biespecífica C-METxCD3 da invenção são mostradas nos seguintes exemplos.

Em uma modalidade preferencial da invenção, os anticorpos de cadeia única biespecífica são espécies cruzadas específicas épsilon de CD3 e para o antígeno de superfície de célula de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee e humano C-MET reconhecido por seu segundo domínio de aglutinação.

EndosialinxCD3

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionada do grupo que consiste em:

CDR H1-3 de SEQ ID NO: 910 - 912 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 907 - 909.

A partir destas sequências CDR da cadeia leve e pesada para o segundo domínio de aglutinação, o elemento versado na técnica pode produzir uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção sem qualquer atividade inventiva adicional. Em particular, as sequências CDR podem ser posicionadas em uma estrutura de trabalho de uma cadeia VL e VH e disposta na forma de scFv.

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado do grupo que consiste em:

a) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1653 – 1655 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1658 - 1660;

b) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1667 - 1669 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1672 - 1674;

c) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1681 – 1683 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1686 – 1688; e

d) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1695 – 1697 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1700 – 1702;

e) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1709 – 1711 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1714 – 1716; e

f) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1723 – 1725 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1728 – 1730.

Na molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH, VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, conforme exemplificado nos exemplos em anexo. De preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VH Endosialin -VL Endosialin -VH CD3-VL CD3 ou VL Endosialin -VH Endosialin -VH CD3-VL CD3.

Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende um primeiro domínio de aglutinação caracterizado acima capaz de se aglutinar a um epítipo de humano e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3ε e um segundo domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a dosialina e que compreende os CDR H1, 2 e 3 de SEQ ID Nº: 910 – 912 e o CDR L1, 2 e 3 de SEQ ID Nº: 907 - 909, ou sequência CDR de aminoácidos

pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, ou 90 % idêntica, com mais preferência pelo menos 95% idêntica, com máxima preferência pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica a cada uma das respectivas sequências de aminoácido dos CDRs definidos acima. Deve ficar entendido que a identidade de sequência é determinada sobre toda a sequência de aminoácido CDRH ou CDRL.

Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nos. 1664, 1678, 1692, 1706, 1720, ou 1734;

(b) uma sequência de aminoácido codificada por uma sequência de ácido nucléico conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 1665, 1679, 1693, 1707, 1721, ou 1735; e

(c) uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96 % idêntica à sequência de aminoácido de (a) ou (b).

A invenção se refere a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 1664, 1678, 1692, 1706, 1720, ou 1734, bem como uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 1664, 1678, 1692, 1706, 1720, ou 1734. A invenção também se refere às sequências de ácido nucléico correspondentes conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 1665, 1679, 1693, 1707, 1721, ou 1735; bem como a sequências de ácido nucléico pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica às sequências de ácido nucléico mostradas na SEQ ID N°: 1665, 1679, 1693, 1707, 1721, ou 1735.

Se não indicado de outro modo, deve ficar entendido que a identidade

de sequência é determinada sobre toda a sequência de aminoácido ou nucleotídeo. Para alinhamentos de sequência, por exemplo, os programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que está contido no pacote

5 de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991). É um método de rotina para aqueles versados na técnica determinar e identificar a sequência de aminoácido ou nucleotídeo ou sequência CDR com, por exemplo, 50% (60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência ao nucleotídeo ou

10 aminoácido ou sequências CDR do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção. Por exemplo, de acordo com a hipótese Crick's Wobble, a base 5' no anti-códon não é espacialmente confinada como as outras duas bases e poderiam, dessa forma, ter pareamento base não padrão. Em outras palavras: a terceira posição em um tripleto de códon pode variar de modo que dois tripletos que

15 diferem nesta terceira posição podem codificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida pelos elementos versados na técnica (vide, por exemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55).

As disposições de domínio preferenciais nos construtos de anticorpo

20 de cadeia única biespecífica EndosialinxCD3 da invenção são mostradas nos seguintes exemplos.

Em uma modalidade preferencial da invenção, os anticorpos de cadeia única biespecífica são espécies cruzadas específicas para épsilon de CD3 e para o antígeno de superfície de célula de primata não pertencente ao gênero

25 Chimpanzee e humano Endosialin reconhecido por seu segundo domínio de aglutinação.

EpCAMxCD3

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima

30 compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR

H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado do grupo que consiste em:

- a) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 940 – 942 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 935 - 937;
- 5 b) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 956 – 958 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 951 - 953;
- c) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 968 – 970 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 963 - 965; e
- 10 d) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 980 - 982 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 975-977;
- e) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 992 – 994 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 987 – 989;
- f) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1004 – 1006 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 999 – 1001;
- 15 g) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1028 – 1030 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1023 – 1025;
- h) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1040 – 1042 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1035 – 1037;
- i) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1052 – 1054 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1047 – 1049;
- 20 j) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1074 – 1076 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1069 – 1071;
- k) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1086 – 1088 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1081 – 1083;
- 25 l) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1098 – 1000 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1093 – 1095;
- m) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1110 – 1112 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1105 – 1107;
- n) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1122 – 1124 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1117 – 1119;
- 30

o) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1016 – 1018 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1011 – 1013; e

p) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1765 – 1767 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1770 – 1772.

5 As sequências regiões VL e VH correspondentes do segundo domínio de aglutinação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção bem como dos respectivos scFvs são mostradas na listagem de sequência.

Na molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH, 10 VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, conforme exemplificado nos exemplos em anexo. De preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VH EpCAM-VL EpCAM-VH CD3-VL CD3 ou VL EpCAM-VH EpCAM-VH CD3-VL CD3. Com mais preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL EpCAM-VH EpCAM-VH CD3-VL CD3.

15 Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nos. 944, 948, 946, 960, 972, 984, 996, 1008, 1032, 1044, 20 1056, 1078, 1090, 1102, 1114, 1126, 1020, ou 1776;

(b) uma sequência de aminoácido codificada por uma sequência de ácido nucléico conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nº: 945, 949, 947, 961, 973, 985, 979, 1009, 1033, 1045, 1057, 1079, 1091, 1103, 1115, 1127, 1021, ou 1777; e

25 (c) uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96 % idêntica à sequência de aminoácido de (a) ou (b).

A invenção refere-se a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende uma sequência de aminoácido conforme revelado 30 em qualquer uma dentre SEQ ID Nº: 944, 948, 946, 960, 972, 984, 996, 1008,

1032, 1044, 1056, 1078, 1090, 1102, 1114, 1126, 1020, ou 1776, bem como a uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica à sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 944, 948, 946, 960, 972, 984, 996, 1008, 1032, 1044, 1056, 1078, 1090, 1102, 1114, 1126, 1020, ou 1776. A invenção também se refere às sequências de ácido nucléico correspondentes conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 945, 949, 947, 961, 973, 985, 979, 1009, 1033, 1045, 1057, 1079, 1091, 1103, 1115, 1127, 1021, ou 1777 bem como às sequências de ácido nucléico pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica às sequências de ácido nucléico mostradas na SEQ ID N°: 945, 949, 947, 961, 973, 985, 979, 1009, 1033, 1045, 1057, 1079, 1091, 1103, 1115, 1127, 1021, ou 1777. Deve ficar entendido que a identidade de sequência é determinada sobre toda sequência de aminoácido ou nucleotídeo. Para alinhamentos de sequência, por exemplo, os programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que está contido no pacote de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991)). É um método de rotina para aqueles versados na técnica determinar e identificar uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo com, por exemplo, 85% (90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) identidade de sequência às sequências de aminoácido ou nucleotídeo do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção. Por exemplo, de acordo com hipótese Crick's Wobble, a base 5' no anti-códon não é espacialmente confinada como as outras duas bases, e poderiam, dessa forma, ter pareamento base não padrão. Em outras palavras: a terceira posição em um tripleto de códon pode variar de modo que dois tripletos que diferem nesta terceira posição podem codificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida pelos elementos versados na técnica (vide, por exemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55).

As disposições de domínio preferenciais nos construtos de anticorpo de cadeia única biespecífica EpCAMxCD3 da invenção são mostradas nos seguintes exemplos.

Em uma modalidade preferencial da invenção, os anticorpos de cadeia única biespecífica são espécies cruzadas específicas para épsilon de CD3 e para o antígeno de superfície de célula de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee e humano EpCAM reconhecido por seu segundo domínio de aglutinação.

FAP α xCD3

De acordo com a modalidade preferencial da invenção, uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionada de:

CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1137 - 1139 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1132 - 1134.

As sequências regiões VL e VH correspondentes do segundo domínio de aglutinação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção bem como dos respectivos scFvs são mostradas na listagem de sequência.

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma caracterizada acima molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionada do grupo que consiste em:

a) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1137 - 1139 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1132 - 1134;

b) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1849 - 1851 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1854 - 1856;

c) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1835 - 1837 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1840 - 1842; e

d) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1779 - 1781 e CDR L1-3 de SEQ ID NO:

1784 - 1786;

e) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1793 – 1795 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1798 – 1800;

f) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1863 – 1865 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1868 – 1870;

g) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1807 – 1809 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1812 – 1814;

h) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1821 – 1823 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1826 – 1828;

i) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1891 – 1893 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1896 – 1898;

j) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1877 – 1879 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1882 – 1884;

k) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1961 – 1963 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1966 – 1968;

l) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1947 – 1949 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1952-1954;

m) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1975 – 1977 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1980 – 1982;

n) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1933 – 1935 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1938 – 1940;

o) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1919 – 1921 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1924 – 1926; e

p) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 1905 – 1907 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 1910 – 1912.

Na molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH, VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, conforme exemplificado nos exemplos em anexo. De preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VH FAP alfa - VL FAP alfa -VH CD3-VL CD3 ou VL FAP alfa -VH FAP alfa -VH CD3-VL CD3.

Com mais preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL FAP alfa -VH FAP alfa -VH CD3-VL CD3.

Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID Nos. 1143, 1147, 1145, 1860, 1846, 1790, 1804, 1874, 1818, ou 1832;

(b) uma sequência de aminoácido codificada por uma sequência de ácido nucléico conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 1144, 1148, 1146, 1861, 1847, 1791, 1805, 1875, 1818 ou 1833; e

(c) uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96 % idêntica à sequência de aminoácido de (a) ou (b).

A invenção refere-se a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 1143, 1147, 1145, 1860, 1846, 1790, 1804, 1874, 1818, ou 1832, bem como uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 1143, 1147, 1145, 1860, 1846, 1790, 1804, 1874, 1818, ou 1832. A invenção também se refere às sequências de ácido nucléico correspondentes conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 1144, 1148, 1146, 1861, 1847, 1791, 1805, 1875, 1818 ou 1833, bem como as sequências de ácido nucléico pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica às sequências de ácido nucléico mostradas na SEQ ID N°: 1144, 1148, 1146, 1861, 1847, 1791, 1805, 1875, 1818 ou 1833. Deve ficar entendido que a identidade de sequência é determinada sobre toda a sequência de aminoácido ou nucleotídeo. Para alinhamentos de sequência, por exemplo, os

programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que está contido no pacote de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991)). É um método de rotina para

5 aqueles versados na técnica determinar e identificar uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo com, por exemplo, 85% (90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido ou nucleotídeos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção. Por exemplo, de acordo com

10 hipótese Crick's Wobble, a base 5' no anti-códon não é espacialmente confinada como outras duas bases, e poderiam, dessa forma, ter pareamento base não padrão. Em outras palavras: a terceira posição em um tripleto de códon pode variar de modo que dois tripletos que diferem nesta terceira posição possam codificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida pelos elementos versados na técnica (vide, por exemplo,

15 http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548–55).

As disposições de domínio preferenciais nos construtos de anticorpo de cadeia única biespecífica FAPalfaxCD3 da invenção são mostradas nos seguintes exemplos.

20 Em uma modalidade preferencial da invenção, os anticorpos de cadeia única biespecífica são espécies cruzadas específicas para épsilon de CD3 e para o antígeno de superfície de célula de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee e humano FAP alfa reconhecido por seu segundo domínio de aglutinação.

25 **IGF-1RxCD3**

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica caracterizada acima compreende um grupo das seguintes sequências como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado

30 do grupo que consiste em:

- a) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2016 - 2018 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2021 - 2023;
- b) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2030 - 2032 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2035 - 2037;
- 5 c) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2044 - 2046 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2049 - 2051; e
- d) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2058 - 2060 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2063 - 2065;
- e) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2072 - 2074 e CDR L1-3 de SEQ ID
10 NO: 2077 - 2079;
- f) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2086 - 2088 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2091 - 2093;
- g) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2100 - 2102 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 2105 - 2107;
- 15 h) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2114 - 2116 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 2119 - 2121;
- i) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2128 - 2130 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2133 - 2135;
- j) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2142 - 2144 e CDR L1-3 de SEQ ID NO:
20 2147 - 2149;
- k) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2156 - 2158 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 2161 - 2163;
- l) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2170 - 2172 e CDR L1-3 de SEQ ID NO: 2175 - 2177;
- 25 m) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2184 - 2186 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 2189 - 2191;
- n) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2198 - 2200 e CDR L1-3 de SEQ ID
NO: 2203 - 2205; e
- o) CDR H1-3 de SEQ ID NO: 2212 - 2214 e CDR L1-3 de SEQ ID
30 NO: 2217 - 2219.

As sequências regiões VL e VH correspondentes do segundo domínio de aglutinação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção bem como dos respectivos scFvs são mostradas na listagem de sequência.

Na molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção,
 5 os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VL-VH-VH-VL, VL-VH-VL-VH, VH-VL-VH-VL ou VH-VL-VL-VH, conforme exemplificado nos exemplos em anexo. De preferência, os domínios de aglutinação são dispostos na ordem VH IGF-1R-VL IGF-1R-VH CD3-VL CD3 ou VL IGF-1R-VH IGF-1R-VH CD3-VL CD3.

Uma modalidade particularmente preferencial da invenção se refere a
 10 um polipeptídeo caracterizado acima, em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica compreende uma sequência selecionada de:

(a) uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 2027, 2041, 2055, 2069, 2083, 2097, 2111, 2125, 2139, 2153, 2167, 2181, 2195, 2209, ou 2223;

15 (b) uma sequência de aminoácido codificada por uma sequência de ácido nucléico conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 2028, 2042, 2056, 2070, 2084, 2098, 2112, 2126, 2140, 2154, 2168, 2182, 2196, 2210, ou 2224; e

(c) uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica, com
 20 mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96 % idêntica à sequência de aminoácido de (a) ou (b).

A invenção refere-se a uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende uma sequência de aminoácido conforme revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 2027, 2041, 2055, 2069, 2083, 2097, 2111,
 25 2125, 2139, 2153, 2167, 2181, 2195, 2209, ou 2223, bem como uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 2027, 2041, 2055, 2069, 2083, 2097, 2111, 2125, 2139, 2153, 2167, 2181, 2195, 2209, ou 2223. A invenção
 30 também se refere às sequências de ácido nucléico correspondentes conforme

revelado em qualquer uma dentre SEQ ID N°: 2028, 2042, 2056, 2070, 2084, 2098, 2112, 2126, 2140, 2154, 2168, 2182, 2196, 2210, ou 2224 bem como às sequências de ácido nucléico pelo menos 85% idêntica, de preferência 90 %, com mais preferência pelo menos 95 % idêntica, com máxima preferência pelo menos 96, 97, 98, ou 99 % idêntica às sequências de ácido nucléico mostradas na SEQ ID N°: 2028, 2042, 2056, 2070, 2084, 2098, 2112, 2126, 2140, 2154, 2168, 2182, 2196, 2210, ou 2224. Deve ficar entendido que a identidade de sequência é determinada sobre toda a sequência de aminoácido ou nucleotídeo. Para alinhamentos de sequência, por exemplo, os programas Gap ou BestFit podem ser usados (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que está contido no pacote de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991)). É um método de rotina para aqueles versados na técnica determinar e identificar uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo com, por exemplo, 85% (90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido ou nucleotídeos do anticorpo de cadeia única biespecífico da invenção. Por exemplo, de acordo com hipótese Crick's Wobble, a base 5' no anticódon não é espacialmente confinada como as outras duas bases, e poderiam, dessa forma, ter pareamento base não padrão. Em outras palavras: a terceira posição em um tripleto de códon pode variar de modo que dois tripletos que diferem nesta terceira posição possam codificar o mesmo resíduo de aminoácido. A dita hipótese é bem conhecida pelos elementos versados na técnica (vide, por exemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55).

As disposições de domínio preferenciais nos construtos de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 da invenção são mostradas nos seguintes exemplos.

Em uma modalidade preferencial da invenção, os anticorpos de cadeia única biespecífica são espécies cruzadas específicas para épsilon de CD3 e para o antígeno de superfície de célula de primata não pertencente ao gênero

Chimpanzee e humano IGF-1R reconhecido por seu segundo domínio de aglutinação.

Em uma modalidade alternativa da presente invenção, é fornecida uma sequência de ácido nucléico que codifica uma molécula de anticorpo de
5 cadeia única biespecífica descrita acima da invenção.

A presente invenção também se refere a um vetor que compreende a molécula de ácido nucléico da presente invenção.

Muitos vetores adequados são conhecidos por elementos versados em biologia molecular, a escolha do que dependeria da função desejada e incluiria
10 plasmídeos, cosmídeos, vírus, bacteriófagos e outros vetores usados convencionalmente na engenharia genética. Os métodos que são bem conhecidos por aqueles elementos versados na técnica podem ser usados para construir vários plasmídeos e vetores; vide, por exemplo, as técnicas descritas em
Sambrook et al. (loc cit.) e Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green
15 Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y., EUA (1989), (1994). Alternativamente, os polinucleotídeos e vetores da invenção podem ser reconstituídos em lipossomos para distribuição em células alvo. Conforme discutido em maiores detalhes abaixo, um vetor de clonagem foi usado para isolar
sequências de DNA individuais. As sequências relevantes podem ser transferidas
20 para vetores de expressão onde a expressão de um polipeptídeo particular é requerida. Os vetores de clonagem típicos incluem pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322 e pGBT9. Os vetores de expressão típicos incluem pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT.

De preferência, o dito vetor compreende uma sequência de ácido
25 nucléico que é uma sequência regulatória operavelmente ligada à dita sequência de ácido nucléico definida na presente invenção.

O termo "sequência regulatória" se refere a sequências de DNA, que são necessárias para efetuar a expressão de sequências de codificação às quais estão ligadas. A natureza de tais sequências de controle difere dependendo do
30 organismo hospedeiro. Em procarióticas, as sequências de controle geralmente

incluem promotor, sítio de aglutinação ribossômica e terminadores. Em eucariotas geralmente as sequências de controle incluem promotores, terminadores e, em alguns casos, intensificadores, transativadores ou fatores de transcrição. O termo "sequência de controle" é destinado a incluir, no mínimo, todos os componentes necessários para a expressão, e também pode incluir componentes vantajosos adicionais.

O termo "operavelmente ligada" se refere a uma justaposição em que os componentes descritos estão em uma relação que os permite funcionar de sua maneira pretendida. Uma sequência de controle "operavelmente ligada" a uma sequência de codificação está ligada de tal forma que a expressão da sequência de codificação seja alcançada sob condições compatíveis com as sequências de controle. No caso em que a sequência de controle é um promotor, é óbvio para um elemento versado que ácido nucléico de filamento duplo é, de preferência, usado.

Dessa forma, o vetor mencionado é, de preferência, um vetor de expressão. Um "vetor de expressão" é um construto que pode ser usado para transformar um hospedeiro selecionado e fornece a expressão de uma sequência de codificação no hospedeiro selecionado. Os vetores de expressão podem, por exemplo, ser vetores de clonagem, vetores binários ou vetores integrantes. A expressão compreende a transcrição da molécula de ácido nucléico de preferência em um mRNA traduzível. Os elementos regulatórios que asseguram a expressão em células procarióticas e/ou eucariotas são bem conhecidos para aqueles elementos versados na técnica. No caso de células eucariotas, elas compreendem normalmente promotores que asseguram a iniciação de transcrição e opcionalmente sinais poli-A que asseguram a terminação de transcrição e a estabilização do transcrito. Possíveis elementos regulatórios que permitem a expressão em células hospedeiras procarióticas compreendem, por exemplo, o promotor P_L , *lac*, *trp* ou *tac* em *E. coli*, e os exemplos de elementos regulatórios que permitem a expressão em células hospedeiras eucarióticas são o promotor *AOX1* ou *GAL1* em levedura ou o promotor CMV-, SV40-, RSV (vírus Rous sarcoma), intensificador CMV, intensificador SV40 ou um íntron de globina em

células mamíferas e de outros animais.

Além dos elementos, que são responsáveis pela iniciação de transcrição de tais elementos regulatórios também podem estar compreendidos sinais de terminação de transcrição, como o sítio SV40-poli-A ou o sítio tk-poli-A, a jusante do polinucleotídeo. Adicionalmente, dependendo do sistema de expressão usado, sequências líderes capazes de direcionar o polipeptídeo para um compartimento celular ou secretar isto para o meio podem ser adicionadas à sequência de codificação da sequência de ácido nucléico mencionada e são bem conhecidas na técnica; vide também os Exemplos em anexo. A sequência(s) líder(s) é(são) montada em fase apropriada com sequências de tradução, iniciação e terminação e, de preferência, uma sequência líder capaz de direcionar a secreção de proteína traduzida, ou uma porção da mesma, no espaço periplásmico ou meio extracelular. Opcionalmente, a sequência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão que inclui um peptídeo de identificação de terminal N que confere as características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada de produto recombinante expressado; vide supra. Neste contexto, vetores de expressão adequados são conhecidos na técnica como vetor de expressão pcDV1 de cDNA Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogene), pEF-DHFR, pEF-ADA ou pEF-neo (Mack et al. PNAS (1995) 92, 7021-7025 e Raum et al. Cancer Immunol Immunother (2001) 50(3), 141-150) ou pSPORT1 (GIBCO BRL).

De preferência, as sequências de controle de expressão serão sistemas promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar a transfecção de células hospedeiras eucarióticas, mas sequências de controle para hospedeiras procarióticas também podem ser usadas. Uma vez que o vetor foi incorporado no hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão de alto nível das sequências de nucleotídeo, e conforme desejado, a coleta e a purificação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção pode seguir; vide, por exemplo, os exemplos em anexo.

Um sistema de expressão alternativo, que pode ser usado para expressar uma proteína que interage com o ciclo celular é um sistema de inseto. Em tal sistema, vírus poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) é usado como um vetor para expressar genes externos em células de *Spodoptera*
5 *frugiperda* ou em larvas *Trichoplusia*. A sequência de codificação de uma molécula de ácido nucléico mencionada pode ser clonada em uma região não essencial do vírus, tal como o gene poliedrina, e colocada sob controle do promotor de poliedrina. A inserção bem sucedida da dita sequência de codificação irá tornar o gene poliedrina inativo e produzir revestimento de proteína com carência de vírus
10 recombinante. Os vírus recombinantes são, então, usados para infectar células de *S. frugiperda* ou larvas *Trichoplusia* na quais a proteína da invenção é expressada (Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhard, Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 91 (1994), 3224-3227).

Os elementos regulatórios adicionais podem incluir intensificadores
15 de transcrição bem como intensificadores de tradução. Vantajosamente, os vetores da invenção descritos acima compreendem um marcador selecionável e/ou classificável.

Os genes marcadores selecionáveis úteis para a seleção de células transformadas e, por exemplo, tecido vegetal e plantas são bem conhecidos por
20 aqueles elementos versados na técnica e compreendem, por exemplo, resistência anti-metabolito como a base da seleção para dhfr, que confere resistência a metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149); npt, que confere resistência neomicina, canamicina e paromicina de aminoglicosídeos (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) e higo, que confere resistência à
25 higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Os genes selecionáveis adicionais foram descritos, a saber trpB, que permitem que as células utilizem indola no lugar de triptofan; hisD, que permite que as células utilizem histinol no lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85 (1988), 8047); manose-6-fosfato isomerase que permite que as células utilizem manose (WO 94/20627) e ODC
30 (ornitina decarboxilase) que confere resistência ao inibidor de ornitina

decarboxilase, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) ou deaminase de *Aspergillus terreus* que confere resistência a Blasticidin S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

5 Os marcadores classificáveis úteis também são conhecidos por aqueles elementos versados na técnica e são comercialmente disponíveis. Vantajosamente, o dito marcador é um gene que codifica luciferase (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), proteína fluorescente verde (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) ou β -glucuronidase (Jefferson, 10 EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Esta modalidade é particularmente útil para varredura simples e rápida de células, tecidos e organismos que contêm um vetor mencionado.

Conforme descrito acima, a molécula de ácido nucléico mencionada pode ser usada sozinha ou como parte de um vetor para expressar a molécula de 15 anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção em células, para, por exemplo, purificação, mas também para propósitos de terapia de gene. As moléculas ou vetores de ácidos nucléicos que contêm as sequência(s) de DNA que codificam qualquer uma das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção descritas acima são introduzidas nas células que, por sua vez, produzem o 20 polipeptídeo de interesse. A terapia gênica, que é baseada na introdução de genes terapêuticos nas células por técnicas ex-vivo ou in-vivo é uma das aplicações mais importantes de transferência gênica. Os vetores, métodos ou sistemas de distribuição de gene adequados para terapia gênica in-vitro ou in-vivo são descritos na literatura e são conhecidos pelo elemento versado na técnica; vide, por 25 exemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 30 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO

97/00957, US 5.580.859; US 5.589.466; ou Schaper, Current Opinion em Biotechnology 7 (1996), 635-640; dos Santos Coura e Nardi Virol J. (2007), 4:99. As moléculas e vetores de ácido nucléico podem ser projetadas para introdução direta ou para introdução através de lipossomos, ou vetores virais (por exemplo, adenoviral, retroviral) na célula. De preferência, a dita célula é uma célula de linhagem de germe, célula embrionária ou célula de ovo ou derivados disso, com máxima preferência, a dita célula é uma célula-tronco. Um exemplo para célula-tronco embrionária pode ser, inter alia, uma célula-tronco conforme descrito em Nagy, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90 (1993), 8424-8428.

A invenção também fornece um hospedeiro transformado ou transfectado com um vetor da invenção. O dito hospedeiro pode ser produzido através da introdução do vetor da invenção descrito acima ou da molécula de ácido nucléico da invenção descrita acima no hospedeiro. A presença de pelo menos um vetor ou pelo menos uma molécula de ácido nucléico no hospedeiro pode mediar a expressão de um gene que codifica os construtos de anticorpo de cadeia única descritos acima.

Uma molécula ou vetor de ácido nucléico da invenção descrito, que é introduzido no hospedeiro pode se integrar no genoma do hospedeiro ou pode ser mantido extracromossomicamente.

O hospedeiro pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica.

O termo "procariótica" se destina a incluir todas as bactérias, que podem ser transformadas ou transfectadas com moléculas de DNA ou RNA para a expressão de uma proteína da invenção. Os hospedeiros procarióticos podem incluir bactérias gram negativas bem como gram positivas como, por exemplo, E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens e Bacillus subtilis. O termo "eucariótica" se destina a incluir levedura, plantas vasculares, inseto e, de preferência, células de mamífero. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, a proteína codificada pelo polinucleotídeo da presente invenção pode ser glicosilado ou pode ser não glicosilado. É especialmente preferencial o uso de um plasmídeo ou um vírus que contém a sequência de

codificação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção e geneticamente fundido a isto no terminação N FLAG-tag e/ou C-terminal His-tag. De preferência, o comprimento do dito FLAG-tag é cerca de 4 a 8 aminoácidos, com máxima preferência, 8 aminoácidos. Um polinucleotídeo descrito acima pode
5 ser usado para transformar ou transfectar o hospedeiro com o uso de qualquer uma das técnicas comumente conhecida por aqueles elementos de conhecimento comum na técnica. Adicionalmente, os métodos para preparar genes operavelmente ligados e fundidos, e que expressam as mesmas em, por exemplo, células de mamífero e bactérias são bem conhecidos na técnica (Sambrook, loc
10 cit.).

De preferência, o dito hospedeiro é uma bactéria ou um inseto, célula fúngica, vegetal ou animal.

É particularmente contemplado que o hospedeiro mencionado pode ser uma célula de mamífero. As células hospedeiras especialmente preferenciais
15 compreendem células CHO, células COS, linhagens celulares de mieloma como SP2/0 ou NS/0. Conforme ilustrado nos exemplos em anexo, as células CHO são particularmente preferenciais como hospedeiras.

Com mais preferência, a dita célula hospedeira é uma célula humana ou linhagem celular humana, por exemplo, per.c6 (Kroos, Biotechnol. Prog., 2003,
20 19:163-168).

Em uma modalidade adicional, a presente invenção se refere, dessa forma, a um processo para a produção de uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, sendo que o dito processo compreende cultivar um hospedeiro da invenção sob condições que permitem a expressão da molécula de
25 anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção e recuperar o polipeptídeo produzido da cultura.

Os hospedeiros transformados podem ser desenvolvidos em fermentadores e cultivados de acordo com técnicas conhecidas para alcançar crescimento celular ideal. A molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da
30 invenção pode, então, ser isolada do meio de crescimento, lisatos celulares ou

frações de membrana celular. O isolamento e a purificação, por exemplo, das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica microbianamente expressadas podem ser por quaisquer meios convencionais como, por exemplo, separações cromatográficas preparativas e separações imunológicas como aquelas que
5 envolvem o uso de anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados, por exemplo, contra um tag da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção ou conforme descrito nos exemplos em anexo.

As condições para o cultivo de um hospedeiro, que permitem a expressão são conhecidas na técnica por dependerem do sistema hospedeiro e do
10 sistema de expressão/vetor usado em tal processo. Os parâmetros a serem modificados a fim de alcançar as condições que permitem a expressão de um polipeptídeo recombinante são bem conhecidos na técnica. Dessa forma, as condições adequadas podem ser determinadas pelo elemento versado na técnica na ausência de inserção inventiva adicional.

15 Uma vez expressada, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção pode ser purificada de acordo com procedimentos padrão da técnica, incluindo precipitação de sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia de coluna, eletroforese de gel e similares; vide, Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). Os polipetídeos substancialmente puros
20 de pelo menos cerca de 90 a 95% de homogeneidade são preferenciais, e 98 a 99% ou mais homogeneidade são de máxima preferência, para usos farmacêuticos. Uma vez purificada, parcialmente ou até a homogeneidade desejada, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção pode, então, ser usada terapeuticamente (incluindo extracorporeamente) ou no
25 desenvolvimento e execução de procedimentos de ensaio. Adicionalmente, os exemplos para métodos para a recuperação da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção de uma cultura são descritos em detalhes nos exemplos em anexo. A recuperação também pode ser alcançada por um método para o isolamento da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da
30 invenção capaz de se aglutinar a um epítipo de humano e primata não pertencente

ao gênero Chimpanzee épsilon de CD3 $\square$, o método que compreende as etapas de:

(a) colocar em contato o polipeptídeo(s) com um fragmento de terminação N do domínio extracelular de CD3 $\square$ de 27 aminoácidos máximos que compreende a sequência de aminoácido Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly (SEQ ID N° 341) ou Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Ile-Gly (SEQ ID N° 342), fixada através da terminação C para uma fase sólida;

(b) eluir o polipeptídeo(s) ligado do dito fragmento; e

(c) isolar o polipeptídeo(s) do eluído (b).

É preferencial que o polipeptídeo(s) isolado pelo método da invenção acima seja humano.

Este método ou o isolamento da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção é entendido como um método para o isolamento de um ou mais polipetídeos diferentes com a mesma especificidade para o fragmento do domínio extracelular de CD3 $\square$ que compreende em sua terminação N a sequência de aminoácido Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly (SEQ ID N° 341) ou Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Ile-Gly (SEQ ID N° 342) de uma pluralidade de ceidatos de polipeptídeo bem como um método para a purificação de um polipeptídeo a partir de uma solução. Um exemplo não limitante para o último método para a purificação de uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de uma solução é, por exemplo, a purificação de uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica recombinantemente expressada a partir de um sobrenadante de cultura ou uma preparação de tal cultura.

Conforme determinado acima, o fragmento usado neste método é um fragmento de terminação N do domínio extracelular da molécula CD3 $\square$ de primata. A sequência de aminoácido do domínio extracelular da molécula CD3 $\square$ de diferentes espécies é revelada em SEQ ID N°: 1, 3, 5 e 7. As duas formas de octâmero de terminação N são reveladas em SEQ ID N°: 341 e 342. É preferencial que esta terminação N seja livremente disponível para se aglutinar aos polipetídeos a serem identificados pelo método da invenção. O termo "livremente

disponível” é entendido no contexto da invenção como livre de motivos adicionais como His-tag. A interferência de tal His-tag em uma molécula de aglutinação identificada pelo método da invenção é descrita nos Exemplos em anexo 6 e 20.

De acordo com este método, o dito fragmento é fixado através da
5 terminação C para uma fase sólida. O elemento versado na técnica irá facilmente e sem qualquer atividade inventiva eleger um suporte de fase sólida adequado dependente da modalidade usada do método da invenção. Os exemplos para um suporte sólido compreendem, mas não se limitam a, matrizes como microesferas (por exemplo, microesferas de agarose, microesferas de sefarose, microesferas de
10 poliestirol, microesferas de dextran), placas (placas de cultura ou placas MultiWell) bem como chips conhecidos, por exemplo, da Biacore®. A seleção dos meios e métodos para a fixação/imobilização do fragmento ao dito suporte sólido depende da escolha do suporte sólido. Um método comumente usado para a fixação/imobilização é um acoplamento através de um éster de N-
15 hidroxisuccinimida (NHS). A química por baixo deste acoplamento bem como os métodos alternativos para a fixação/imobilização são conhecidos pelo elemento versado na técnica,, por exemplo, a partir de Hermanson “Bioconjugate Techniques”, Academic Press, Inc. (1996). Para a fixação/imobilização em suportes cromatográficos, os seguintes meios são comumente usados: sefarose
20 ativada por NHS (por exemplo, HiTrap-NHS de GE Life Science-Amersham), sefarose ativada por CnBr (por exemplo, GE Life Science-Amersham), microesferas de dextran ativadas por NHS (Sigma) ou polimetacrilato ativado. Estes reagentes também podem ser usados em uma abordagem de lote. Além disso, as microesferas de dextran que compreendem óxido de ferro (por exemplo,
25 disponíveis junto à Miltenyi) podem ser usadas em uma abordagem de lote. Estas microesferas podem ser usadas em conjunto com um magneto para a separação das microesferas de uma solução. Os polipetídeos podem ser imobilizados em um chip Biacore (por exemplo, chips CM5) através do uso de carboximetildextran ativada por NHS. Exemplos adicionais para um suporte sólido apropriados são
30 placas MultiWell reativas à amina (por exemplo, placas Nunc Immobilizer™).

De acordo com este método, o dito fragmento do domínio extracelular de épsilon de CD3 pode ser diretamente acoplado ao suporte sólido ou através de um estiramento de aminoácidos, que pode ser um ligador ou outra porção de proteína/polipeptídeo. Alternativamente, o domínio extracelular de épsilon de CD3
5 pode ser indiretamente acoplado através de uma ou mais moléculas adaptadoras.

Meios e métodos para a eluição de um peptídeo ou polipeptídeo ligado a um epitopo imobilizado são bem conhecidos na técnica. O mesmo permanece verdadeiro para métodos para o isolamento do polipeptídeo(s) identificado a partir do eluído.

10 Um método para o isolamento de uma ou mais moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica(s) diferentes com a mesma especificidade para o fragmento do domínio extracelular de CD3 ϵ que compreende em sua terminação N, a sequência de aminoácido Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-X-Gly (com X sendo Met ou Ile) de uma pluralidade de ceidatos de polipeptídeo pode
15 compreender uma ou mais etapas dos seguintes métodos para a seleção de entidades específicas de antígeno:

Os domínios de aglutinação específicos de CD3 ϵ podem ser selecionados de repertórios derivados de anticorpo. Uma biblioteca de exibição de fago pode ser construída com base em procedimentos padrão como, por exemplo,
20 revelados em "Phage Display: A Laboratory Manual"; Ed. Barbas, Burton, Scott & Silverman; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. O formato dos fragmentos de anticorpo na biblioteca de anticorpo pode ser scFv, mas também pode ser geralmente um fragmento Fab ou até mesmo um fragmento de anticorpo de domínio único. Para o isolamento, fragmentos de anticorpo intocado podem ser
25 usados. Para a seleção de entidades de aglutinação imunogênica potencialmente baixa em uso terapêutico posterior, as bibliotecas de fragmento de anticorpo humano podem ser favoráveis para a seleção direta de fragmentos de anticorpo humano. Em alguns casos, eles podem formar a base para bibliotecas de anticorpo sintéticas (Knappik et al. J Mol. Biol. 2000, 296:57 ff). O formato correspondente
30 também pode ser Fab, scFv (conforme descrito abaixo) ou anticorpos de domínio

(dAbs, conforme analisado em Holt et al., Trends Biotechnol. 2003, 21:484 ff).

Também é conhecido na técnica que em muitos casos, não existe fonte de anticorpo humano imune disponível contra o antígeno alvo. Portanto, os animais são imunizados com o antígeno alvo e as respectivas bibliotecas de anticorpo isoladas de tecido animal como, por exemplo, baço ou PBMCs. O fragmento de terminação N pode ser biotinilado ou covalentemente ligado a proteínas como KLH ou albumina do soro bovino (BSA). De acordo com as abordagens comuns, os roedores são usados para imunização. Alguns repertórios de anticorpo imune de origem não humana podem ser especialmente favoráveis por outras razões, por exemplo, para a presença de anticorpos de domínio simples (VHH) derivados de espécies camelóides (conforme descrito em Muyldermans, J Biotechnol. 74:277; De Genst et al. Dev Como Immunol. 2006, 30:187 ff). Portanto, um formato correspondente da biblioteca de anticorpo pode ser Fab, scFv (conforme descrito abaixo) ou anticorpos de domínio simples (VHH).

Em uma abordagem possível, um camundongo F1 com 10 semanas de idade de cruzamentos balb/c x C57black pode ser imunizado com células inteiras, por exemplo, expressando exibição de terminação N de EpCAM transmembrana como um fusão de tradução dos aminoácidos de terminação N 1 a 27 da cadeia de CD3 ϵ madura. Alternativamente, os camundongos podem ser imunizados com 1-27 proteína de fusão de épsilon de CD3-Fc (uma abordagem correspondente é descrita no Exemplo 2 em anexo). Após a imunização(s) acentuada, as amostras sanguíneas podem ser tomadas e o titulador de soro de anticorpo contra as células T positiva de CD3 podem ser testados, por exemplo, em análise FACS. Usualmente, os tituladores de soro são significativamente superiores em animais imunizados que em animais não imunizados.

Os animais imunizados podem formar a base para a construção de bibliotecas de anticorpo imune. Os exemplos de tais bibliotecas compreendem bibliotecas de exibição. Tais bibliotecas podem ser geralmente construídas com base em procedimentos padrão como, por exemplo, revelados em "Phage Display: A Laboratory Manual"; Ed. Barbas, Burton, Scott & Silverman; Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 2001.

Os anticorpos não humanos também podem ser humanizados através da exibição de fago devido à geração de bibliotecas de anticorpo mais variáveis que podem ser subsequentemente enriquecidas para aglutinadores durante a
5 seleção.

Em uma abordagem de exibição de fago, qualquer uma das reuniões de fagos que exibe as bibliotecas de anticorpo forma uma base para selecionar as entidades de aglutinação com o uso do respectivo antígeno como molécula alvo. A etapa de central na qual o antígeno específico, os fagos de ligação a antígeno são
10 isolados são designados como *panning*. Por causa da exibição dos fragmentos de anticorpo sobre a superfície dos fagos, este método geral é chamado de exibição de fago. Um método preferencial de seleção é o uso de proteínas pequenas como o domínio N2 de fago filamentoso fundido com tradução à terminação N do scFv exibido pelo fago. Um outro método de exibição conhecido na técnica, que pode
15 ser usado para isolar entidades de aglutinação é o método de exibição de ribossomo (analisado em Groves & Osbourn, Expert Opin Biol Ther. 2005, 5:125 ff; Lipovsek & Pluckthun, J Immunol Methods 2004, 290:52 ff). Com a finalidade de demonstrar a aglutinação de partículas de fago de scFv a uma proteína de fusão 1-27 de CD3 $\square$ -Fc, uma biblioteca de fago que porta o repertório de scFv clonado
20 pode ser colhida do respectivo sobrenadante de cultura por PEG (polietilenoglicol). As partículas de fago de ScFv podem ser incubadas com proteína de fusão CD3 $\square$ Fc imobilizada. A proteína de fusão CD3 $\square$ Fc imobilizada pode ser revestida para uma fase sólida. As entidades de aglutinação podem ser eluídas e o eluído pode ser usado para infecção de hospedeiros bacterianos não infectados frescos. Os
25 hospedeiros bacterianos transduzidos com sucesso com uma cópia de fagomídeo, que codifica um fragmento scFv humano, podem ser selecionados novamente para resistência à carbenicilina e subsequentemente infectados com, por exemplo, fago auxiliador VCMS 13 para iniciar a segunda rodada de exibição de anticorpo e a seleção in vitro. Um total de 4 a 5 rodadas de seleções é executado, normalmente.
30 A aglutinação de entidades de aglutinação isoladas pode ser testada em células

Jurkat de épsilon de CD3 positivas, células HPBall, PBMCs ou células eucariotas transfectadas que portam a sequência CD3□ de terminação N fundida à superfície exibida de EpCAM com o uso de um ensaio citométrico de fluxo (vide Exemplo 4 em anexo).

5 De preferência, o método acima pode ser um método, em que o fragmento do domínio extracelular de CD3□ consiste em um ou mais fragmentos de um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácido de qualquer uma revelada em SEQ ID Nos. 2, 4, 6 ou 8. Com mais preferência, o dito fragmento é 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ou 27 resíduos
10 de aminoácido em comprimento.

Este método de identificação de uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica pode ser um método de varredura de uma pluralidade de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende um domínio de aglutinação de espécies cruzadas específicas que se aglutina a um epitopo de
15 humano e primata não pertencente ao gênero Chimpanzee CD3□. Alternativamente, o método de identificação é um método de purificação/isolamento de uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica que compreende um domínio de aglutinação de espécies cruzadas específicas que se aglutina a um epitopo de humano e primata não pertencente ao gênero
20 Chimpanzee CD3□.

Adicionalmente, a invenção fornece uma composição que compreende uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção ou um anticorpo de cadeia única bioespecífico conforme produzido pelo processo revelado acima. De preferência, a dita composição é uma composição
25 farmacêutica.

A invenção fornece também uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica conforme definida na presente invenção, ou produzida de acordo com o processo definido na presente invenção, em que a dita molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica é para uso na prevenção, tratamento ou
30 melhora de câncer ou doenças autoimunes.

De preferência, para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica PSCAxCD3, o dito câncer é câncer de próstata, câncer de bexiga ou câncer de pâncreas.

Para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica CD19xCD3 , é preferencial que o dito câncer seja uma malignidade da célula B, como B-NHL (linfoma não Hodgkin de célula B), B-ALL (leucemia de célula B linfoblástica aguda), B-CLL (leucemia de célula B linfótica crônica), ou Múltiplo Mieloma (em que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção depleta vantajosamente as células tronco de câncer positivo de CD19/células iniciantes de câncer). Entretanto, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica também se destina ao uso na prevenção, tratamento ou melhora de doenças autoimunes mediadas por célula B ou doenças autoimunes com uma contribuição de célula B patogênica como artrite reumatóide ou a depleção de células B.

Para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica c-METxCD3 , é preferencial que o dito câncer seja um carcinoma, sarcoma, glioblastoma/astrocitoma, melanoma, mesotelioma, tumor Wilms ou uma malignidade hematopoiética como leucemia, linfoma ou múltiplo mieloma. Uma lista abrangente de vários tipos de câncer que podem ser tratados com o anticorpo de cadeia única bioespecífico pode ser encontrada, por exemplo, em <http://www.vai.org/met/>.

Para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica EndosialinxCD3, é preferencial que o dito câncer inclua, mas não se limitando a, carcinomas (mesotelioma de seio, rim, pulmão, colorretal, cólon, pâncreas), sarcomas e tumores neuroectodermiais (melanoma, glioma, neuroblastoma).

Para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica EpCAMxCD3, é preferencial que o dito câncer seja câncer epitelial ou um câncer residual mínimo.

Para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica FAP α xCD3, é preferencial que o dito câncer seja câncer epitelial.

Para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 é preferencial que o dito câncer seja câncer de tecido mole ou ósseo (por exemplo, sarcoma Ewing), seio, fígado, pulmão, cabeça e pescoço, colorretal, próstata, leiomiosarcoma, cervical e câncer endometrial, ovário, próstata e câncer pancreático. Alternativamente, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção IGF-1RxCD3 também é usada na prevenção, tratamento ou melhora de doenças autoimune, de preferência, psoríase.

É preferencial que a cadeia única biespecífica compreenda adicionalmente formulações adequadas de veículos, estabilizantes e/ou excipientes. Além disso, é preferencial que a dita molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica seja adequada para ser administrada em combinação com uma droga adicional. A dita droga pode ser um composto não proteináceo ou um composto proteináceo e pode ser administrado simultaneamente ou não simultaneamente com a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica definida na presente invenção.

De acordo com a invenção, o termo “composição farmacêutica” se refere a uma composição para administração em um paciente, de preferência, um paciente humano. A composição farmacêutica preferencial particular desta invenção compreende anticorpos de cadeia única biespecífica direcionados contra e gerados contra epitopos de CD3 independentes de contexto. De preferência, a composição farmacêutica compreende formulações adequadas de veículos, estabilizantes e/ou excipientes. Em uma modalidade preferencial, a composição farmacêutica compreende uma composição para administração parenteral, transdérmica, intraluminal, intra-arterial, intratecal e/ou intranasal ou por injeção direta no tecido. É em particular contemplado que a dita composição é administrada em um paciente através de infusão ou injeção. A administração das composições adequadas pode ser efetuada por diferentes maneiras, por exemplo, administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. Em particular, a presente invenção fornece uma administração ininterrupta da composição adequada. Como um exemplo não limitante,

administração ininterrupta, isto é, contínua pode ser realizada por um pequeno sistema de bombeamento vestido pelo paciente para medir o influxo do agente terapêutico no corpo do paciente. A composição farmacêutica que compreende os anticorpos de cadeia única biespecífica direcionada e gerada contra epítopos de CD3 independentes de contexto da invenção pode ser administrado através do uso dos ditos sistemas de bombeamento. Tais sistemas de bombeamento são geralmente conhecidos na técnica, e comumente dependem da troca periódica de cartuchos que contêm o agente terapêutico a ser infundido. Mediante a troca do cartucho em tal sistema de bombeamento, uma interrupção temporária do fluxo de outro modo ininterrupto de agente terapêutico para o interior do corpo do paciente pode suceder. Em tal caso, a fase de administração antes da substituição do cartucho e a fase de administração após a substituição do cartucho seriam consideradas inseridas no significado dos meios farmacêuticos e métodos da invenção que constituem uma “administração ininterrupta” de tal agente terapêutico.

A administração ininterrupta ou contínua destes anticorpos de cadeia única biespecífica direcionada e gerada contra epítopos de CD3 independentes de contexto desta invenção pode ser intravenosa ou subcutânea por meio de um dispositivo de distribuição de fluido ou sistema de bombeamento pequeno que inclui um mecanismo de direcionamento de fluido para direcionar o fluido para fora de um reservatório e um mecanismo de atuação para atuar o mecanismo de direcionamento. Os sistemas de bombeamento para administração subcutânea podem incluir uma agulha ou uma cânula para penetrar a pele de um paciente e distribuir a composição adequada para o corpo do paciente. Os ditos sistemas de bombeamento podem ser diretamente presos ou fixados à pele do paciente independentemente de uma veia, artéria ou vaso sanguíneo, permitindo assim um contato direto entre o sistema de bombeamento e a pele do paciente. O sistema de bombeamento pode ser fixado à pele do paciente por 24 horas até diversos dias. O sistema de bombeamento pode ser de tamanho pequeno com um reservatório para pequenos volumes. Como um exemplo não limitante, o volume do reservatório

para a composição adequada farmacêutica a ser administrado pode estar entre 0,1 e 50 ml.

A administração contínua pode ser transdérmica por meio de tal emplastro usado na pele e substituído em intervalos. Um elemento versado na técnica está ciente sobre sistemas de emplastro para distribuição de droga adequados para este propósito. Observa-se que a administração transdérmica é especialmente receptiva à administração ininterrupta, tendo em vista que a troca de um primeiro emplastro exaurido pode vantajosamente ser realizada simultaneamente a colocação de um segundo emplastro novo, por exemplo, sobre a superfície da pele imediatamente adjacente ao primeiro emplastro exaurido e imediatamente antes da remoção do primeiro emplastro exaurido. Problemas com interrupção de fluxo ou falha de célula de energia não surgem.

A composição da presente invenção, que compreende em particular anticorpos de cadeia única biespecífica direcionada e gerada contra epitopos de CD3 independentes de contexto pode compreender adicionalmente um veículo farmaceuticamente aceitável. Os exemplos de veículos farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica e incluem soluções, por exemplo, soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, como emulsões óleo/água, vários tipos de agentes umectantes, soluções estéreis, lipossomos, etc. As composições que compreendem tais veículos podem ser formuladas por métodos convencionais bem conhecidos. As formulações podem compreender carboidratos, soluções de tampão, aminoácidos e/ou tensoativos. Os carboidratos podem ser açúcares não redutores, de preferência, trealose, sacarose, octasulfato, sorbitol ou xilitol. Tais formulações podem ser usadas para administrações contínuas que podem ser intravenosas ou subcutâneas com e/ou sem sistemas de bombeamento. Os aminoácidos podem ser aminoácidos carregados, de preferência lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato e/ou histidina. Os tensoativos podem ser detergentes, de preferência com um peso molecular de $>1,2$ KD e/ou um poliéter, de preferência com um peso molecular de >3 KD. Os exemplos não limitantes para detergentes preferenciais são Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 ou Tween 85. Os

exemplos não limitantes para poliéteres preferenciais são PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 ou PEG 5000. Os sistemas de tampão usados na presente invenção podem ter um pH preferencial de 5 a 9 e podem compreender citrato, succinato, fosfato, histidina e acetato. As composições da presente invenção podem ser

5 administradas no indivíduo em uma dose adequada que pode ser determinada, por exemplo, por estudos de escala de dose por administração de doses crescentes da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção que exibem especificidade de espécies cruzadas descritas no presente documento para primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee, por exemplo, macacos.

10 Conforme apresentado acima, a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção que exhibe especificidade de espécies cruzadas descrita no presente documento pode ser vantajosamente usada em forma idêntica em realização de testes pré-clínicos em primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee e como droga em humanos. Estas composições também podem ser

15 administradas em combinação com outras drogas proteináceas e não proteináceas. Estas drogas podem ser administradas simultaneamente com a composição que compreende a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção definida na presente invenção ou separadamente antes ou após a administração do dito polipeptídeo em intervalos de tempo e doses definidas. O

20 regime de dosagem será determinado pelo médico em atendimento e fatores clínicos. Conforme se tem ciência nas técnicas medicinais, as dosagens para qualquer paciente dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, área de superfície corporal, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde geral e outras drogas sendo administradas

25 concomitantemente. As preparações para administração parenteral incluem soluções aquosas ou não aquosas estéreis, suspensões e emulsões. Os exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis como oleato de etila. Os veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões,

30 incluindo meios salinos e tamponados. Os veículos parenterais incluem solução de

cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, lactado de Ringer ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem repositores de nutriente e de fluido, repositores de eletrólito (tais como aqueles com base em dextrose de Ringer), e similares. Os conservantes e outros aditivos também podem estar

5 presentes como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes e similares. Além disso, a composição da presente invenção pode compreender veículos proteináceos, como, por exemplo, albumina de soro ou imunoglobulina, de preferência, de origem humana. Contempla-se que a composição da invenção possa compreender, além da molécula de anticorpo de

10 cadeia única biespecífica da invenção definida na presente invenção, agentes biologicamente ativos adicionais, dependendo do uso pretendido da composição. Tais agentes podem ser drogas que atuam no sistema gastrointestinal, drogas que atuam como citostática, drogas que impedem a hiperuricemia, drogas que inibem imunorreacções (por exemplo, corticosteróides), drogas que modulam a resposta

15 inflamatória, drogas que atuam no sistema circulatório sistema e/ou agentes como citocinas conhecidos na técnica.

A atividade biológica da composição farmacêutica definida na presente invenção pode ser determinada, por exemplo, através de ensaio de citotoxicidade, conforme descrito nos seguintes exemplos, em WO 99/54440 ou por

20 Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1 – 12). “Eficácia” ou “eficácia *in vivo*” conforme usado na presente invenção se refere à resposta à terapia através da composição farmacêutica da invenção, com o uso, por exemplo, de critérios de resposta de NCI padronizados. O sucesso ou eficácia *in vivo* da terapia com o uso de uma composição farmacêutica da invenção se refere à

25 eficiência da composição para seu propósito pretendido, isto é, a capacidade de a composição ocasionar seu efeito desejado, isto é, depleção de células patológicas, por exemplo, células tumorais. A eficácia *in vivo* pode ser monitorada por métodos padrão para as respectivas entidades de doença que incluem, mas não se limitam a, contagens celulares de glóbulos brancos, diferenciais, classificação de célula

30 com fluorescência ativada, aspiração de medula óssea. Além disso, vários

parâmetros químicos clínicos específicos e outros métodos padrão estabelecidos podem ser usados. Adicionalmente, tomografia auxiliada por computador, raio X, tomografia por ressonância magnética nuclear (por exemplo, para análise de resposta com base em critérios do Instituto de Câncer Nacional [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Relatório de um grupo de trabalho internacional para critérios de resposta padrão para critérios não Hodgkin. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1244]), varredura de tomografia por emissão de pósitron, contagens celulares de glóbulos brancos, diferenciais, classificação de célula com fluorescência ativa, aspiração de medula óssea, biópsias/histologias de nó da linfa, e vários parâmetros químicos clínicos específicos de câncer (por exemplo, lactato desidrogenase) e outros métodos padrão estabelecidos podem ser usados.

Um outro desafio principal no desenvolvimento de drogas como a composição farmacêutica da invenção é a modulação previsível de propriedades farmacocinéticas. Em suma, um perfil farmacocinético do ceidato de droga, isto é, um perfil dos parâmetros farmacocinéticos que efetuam a capacidade de uma droga particular para tratar uma dada condição, é estabelecido. Os parâmetros farmacocinéticos da droga que influencia na capacidade de uma droga para tratar uma certa entidade de doença incluem, mas não se limitam a: meia vida, volume de distribuição, metabolismo hepático de primeiro passo e grau de aglutinação de soro sanguíneo. A eficácia de um determinado agente de droga pode ser influenciada por cada um dos parâmetros mencionados acima.

"Meia vida" significa o tempo em que 50% de uma droga administrada é eliminada através de processo biológicos, por exemplo, metabolismo, excreção, etc.

"Metabolismo hepático de primeiro passo" significa a propensão de uma droga ser metabolizada mediante o primeiro contato com o fígado, isto é, durante sua primeira passagem através do fígado.

"Volume de distribuição" significa o grau de retenção de uma droga por todos os vários compartimentos do corpo, como, por exemplo, espaços intracelulares e extracelulares, tecidos e órgãos, etc. e a distribuição da droga nestes compartimentos.

- 5 "Grau de aglutinação de soro sanguíneo" significa a propensão de uma droga para interagir com e se aglutinar a proteínas de soro sanguíneo, como albumina, levando a uma redução ou perda de atividade biológica da droga.

Os parâmetros farmacocinéticos também incluem biodisponibilidade, período de incubação (T_{lag}), T_{max} , taxas de absorção, mais iniciais e/ou C_{max}
10 para uma dada quantidade de droga administrada.

"Biodisponibilidade" significa a quantidade de uma droga no compartimento sanguíneo.

- "Período de incubação" significa o atraso de tempo entre a administração da droga e sua detecção e a capacidade de ser medida em sangue
15 ou plasma.

- " T_{max} " é o tempo após o qual a concentração sanguínea máxima da droga é alcançada, e " C_{max} " é concentração sanguínea maximamente obtida com uma determinada droga. O tempo para alcançar uma concentração sanguínea ou de tecido da droga que é requerido para seu efeito biológico ser influenciado por
20 todos os parâmetros. Os parâmetros farmacocinéticos de anticorpos de cadeia única biespecífica que exibem especificidade de espécies cruzadas, que podem ser determinados em realização de testes animais pré-clínicos em primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee conforme esboçado acima também são apresentados, por exemplo, na publicação de Schlereth et al. (Cancer Immunol.
25 Immunother. 20 (2005), 1 – 12).

- O termo "toxicidade" conforme usado na presente invenção se refere aos efeitos tóxicos de uma droga manifestada em eventos adversos ou eventos adversos graves. Estes eventos colaterais podem se referir a uma falta de tolerabilidade da droga em geral e/ou a carência de tolerância após administração.
30 A toxicidade também poderia incluir efeitos teratogênicos ou carcinogênicos

ocasionados pela droga.

O termo “segurança”, “segurança in vivo” ou “tolerabilidade” conforme usado na presente invenção define a administração de uma droga sem induzir eventos adversos graves diretamente após a administração (tolerância local) e durante um período mais longo de aplicação da droga. “Segurança”, “segurança in vivo” ou “tolerabilidade” pode ser avaliada, por exemplo, em intervalos regulares durante o tratamento e período de acompanhamento. As medições incluem avaliação clínica, por exemplo, manifestações de órgão, e varredura de anormalidades laboratoriais. A avaliação clínica pode ser executada e divergir dos achados normais registrados/codificados de acordo com NCI-CTC e/ou dos padrões MedDRA. As manifestações de órgão podem incluir critérios como alergia/imunologia, medula óssea/sangue, arritmia cardíaca, coagulação e similares, conforme descrito, por exemplo, em Common Terminology Criteria para eventos adversos v3.0 (CTCAE). Os parâmetros laboratoriais que podem ser testados incluem, por exemplo, hematologia, química clínica, perfil de coagulação e análise de urina e examine de outros fluidos corporais como soro, plasma, linfóide ou fluido espinhal, licor e similares. A segurança pode, dessa forma, ser avaliada, por exemplo, por exame físico, técnicas de imageamento (isto é, ultrassom, raio x, varreduras de CT, Imageamento de Ressonância Magnética (MRI), outras medições com dispositivos técnicos (isto é, electrocardiograma), sinais vitais, através da medição de parâmetros laboratoriais e do registro de eventos adversos. Por exemplo, eventos adversos em primatas não pertencentes ao gênero Chimpanzee nos usos e métodos de acordo com a invenção podem ser examinados por métodos histopatológicos e/ou histoquímicos.

O termo “dose eficaz e não tóxica” conforme usado na presente invenção se refere a uma dose tolerável do anticorpo de cadeia única bioespecífico conforme definido na presente invenção que é alta o suficiente para ocasionar a depleção de células patológicas, eliminação de tumor, encolhimento tumoral ou estabilização de doença sem ou essencialmente sem efeitos tóxicos principais. Tais doses eficazes e não tóxicas podem ser determinadas, por exemplo, por

estudos de escala de dose descritos na técnica e devem estar abaixo da dose que induz eventos colaterais adversos graves (dose que limita a toxicidade, DLT).

Os termos acima também são chamados de, por exemplo, na avaliação de segurança pré-clínica de produtos farmacêuticos derivados de biotecnologia S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee em 16 de julho de 1997.

Além disso, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica desta invenção ou produzida de acordo com o processo de acordo com a invenção para a prevenção, tratamento ou melhora de câncer ou doenças autoimunes.

De preferência, o dito câncer é para um câncer de próstata, câncer de bexiga ou câncer pancreático de molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica PSCAxCD3.

De preferência, o dito câncer é para uma malignidade de célula B de molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica CD19xCD3 como linfoma de não Hodgkin, doenças autoimunes mediadas por célula B ou a depleção de células B.

De preferência, o dito câncer é para um carcinoma, sarcoma, glioblastoma/astrocitoma, melanoma, mesotelioma, tumor Wilms ou uma malignidade hematopoiética como leucemia, linfoma ou múltiplo mieloma de molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica c-METxCD3.

De preferência, o dito câncer é para um carcinoma (mesotelioma de seio, rim, pulmão, colorretal, colón e pâncreas), um sarcoma, ou um tumor neuroectodermal (melanoma, glioma, neuroblastoma) de molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica EndosialinxCD3.

De preferência, o dito câncer é para um câncer epitelial ou um câncer residual mínimo de molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica EpCAMxCD3.

De preferência, o dito câncer é um câncer epitelial de molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica FAP α xCD3.

De preferência, o dito câncer é para câncer de tecido mole ou ósseo (por exemplo, sarcoma Ewing), seio, fígado, pulmão, cabeça e pescoço, colorretal, próstata, leiomiosarcoma, câncer cervical e endometrial, câncer de ovário, próstata e pancreático para uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3. Alternativamente, a molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 definida na presente invenção acima também é usada na prevenção, tratamento ou melhora de doenças autoimunes, de preferência, psoríase.

De preferência, a dita composição farmacêutica compreende adicionalmente formulações adequadas de veículos, estabilizantes e/ou excipientes.

Um aspecto adicional da invenção se refere a um uso de uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica definida na presente invenção acima ou produzida de acordo com um processo definido na presente invenção acima, para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento ou melhora de uma doença. De preferência, a dita doença é câncer ou doenças autoimunes.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica PSCAxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer de próstata, câncer de bexiga ou câncer pancreático.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica CD19xCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é uma malignidade de célula B como linfoma não Hodgkin, doenças autoimunes mediadas por célula B ou a depleção de células B.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica c-METxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é um carcinoma, sarcoma, glioblastoma/astrocitoma, melanoma, mesotelioma, tumor Wilms ou uma malignidade hematopoiética como leucemia, linfoma ou múltiplo mieloma.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo

de cadeia única biespecífica EndosialinxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é um carcinoma (mesoteliona de seio, rim, pulmão, colorretal, colón, pâncreas), um sarcoma, ou um tumor neuroectodermal (melanoma, glioma, neuroblastoma).

5 Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica EpCAMxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer epitelial ou um câncer mínimo residual.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica FAP α xCD3 definida na presente invenção acima, o
10 dito câncer é câncer epitelial.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer de tecido mole ou ósseo (por exemplo, sarcoma Ewing), câncer de seio, fígado, pulmão, cabeça e pescoço, colorretal, próstata,
15 leiomiosarcoma, câncer cervical e endometrial, ovário, próstata e câncer pancreático. Alternativamente, a molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 definida na presente invenção acima também é usada na prevenção, tratamento ou melhora de doenças autoimunes, de preferência psoríase.

20 Em uma outra modalidade preferencial do uso da molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, a dita composição farmacêutica é adequada para ser administrado em combinação com uma droga adicional, isto é, como parte de uma co-terapia. Na dita co-terapia, um agente ativo pode ser opcionalmente incluído na mesma composição farmacêutica que a
25 molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, ou pode ser incluído em uma composição farmacêutica separada. Neste último caso, a dita composição farmacêutica separada é adequada para administração antes, simultaneamente ou após a administração da dita composição farmacêutica que compreende a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção. A
30 droga ou composição farmacêutica adicional pode ser um composto não

proteínáceo ou um composto protéínáceo. No caso em que a droga adicional é um composto protéínáceo, é vantajoso que o composto protéínáceo seja capaz de fornecer um sinal de ativação para células efectoras imunes.

De preferência, o dito composto protéínáceo ou composto não
5 protéínáceo pode ser administrado simultaneamente ou não simultaneamente com a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, uma molécula de ácido nucléico definida na presente invenção acima, um vetor definido na presente invenção acima, ou um hospedeiro definido na presente invenção acima.

Um outro aspecto da invenção se refere a um método para a
10 prevenção, tratamento ou melhora de uma doença em um indivíduo em necessidade da mesma, sendo que o dito método que compreende a etapa de administração de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica da invenção. De preferência, a dita doença é câncer ou doenças autoimunes.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo
15 de cadeia única biespecífica PSCAxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer de próstata, câncer de bexiga ou câncer pancreático.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica CD19xCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é uma malignidade de célula B como linfoma não Hodgkin, doenças
20 autoimunes mediadas por célula B ou a depleção de células B.

Com mais preferência para uma bispecific molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica c-METxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é um carcinoma, sarcoma, glioblastoma/astrocitoma, melanoma, mesotelioma, tumor Wilms ou uma malignidade hematopoiética como
25 leucemia, linfoma ou múltiplo mieloma.

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica EndosialinxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é um carcinoma (mesotelioma de seio, rim, pulmão, colorretal, colón, pâncreas), um sarcoma, ou um tumor neuroectodermal (melanoma, glioma,
30 neuroblastoma).

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica EpCAMxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer epitelial ou um câncer residual mínimo.

5 Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica FAP α xCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer epitelial

Com mais preferência para uma molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 definida na presente invenção acima, o dito câncer é câncer de tecido mole ou ósseo (por exemplo, sarcoma Ewing),
10 câncer de seio, fígado, pulmão, cabeça e pescoço, colorretal, próstata, leiomiosarcoma, cervical e endometrial, ovário, próstata e câncer pancreático. Alternativamente, a molécula/polipeptídeo de anticorpo de cadeia única biespecífica IGF-1RxCD3 definida na presente invenção acima também é usada na prevenção, tratamento ou melhora de doenças autoimunes, de preferência,
15 psoríase.

Em uma outra modalidade preferencial do método da invenção, a dita composição farmacêutica é adequada para ser administrada em combinação com uma droga adicional, isto é, como parte de uma co-terapia. Na dita co-terapia, um agente ativo pode ser opcionalmente incluído na mesma composição farmacêutica
20 que a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, ou pode ser incluído em uma composição farmacêutica separada. Neste último caso, a dita composição farmacêutica separada é adequada para administração antes, simultaneamente ou após a administração da dita composição farmacêutica que compreende a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção. A
25 droga ou composição farmacêutica adicional pode ser um composto não proteináceo ou a composto proteináceo. No caso em que a droga adicional é um composto proteináceo, é vantajoso que o composto proteináceo seja capaz de fornecer um sinal de ativação para células efetoras imunes.

De preferência, o dito composto proteináceo ou composto não
30 proteináceo pode ser administrado simultaneamente ou não simultaneamente com

a molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, uma molécula de ácido nucléico definida na presente invenção acima, um vetor definido na presente invenção acima ou um hospedeiro definido na presente invenção acima.

É preferencial para o método da invenção descrito acima que o dito
5 indivíduo seja um humano.

Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um kit que compreende uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica da invenção, uma molécula de ácido nucléico da invenção, um vetor da invenção ou um hospedeiro da invenção.

10 Estas e outras modalidades são reveladas e abrangidas pela descrição e Exemplos da presente invenção. As técnicas e métodos recombinantes em imunologia são descritas, por exemplo, em Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edição 2001; Lefkovits; Immunology Methods Manual; The Comprehensive Sourcebook of
15 Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Laboratory Press, 2002. A literatura adicional concernente a qualquer um dos anticorpos, métodos, usos e compostos a serem empregados de acordo com a presente invenção pode ser recuperada a partir de bibliotecas e bancos de dados públicos com o uso, por exemplo, de
20 dispositivos eletrônicos. Por exemplo, o banco de dados público "Medline", disponível na Internet, pode ser utilizado, por exemplo, em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Bancos de dados e endereços adicionais como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ou mencionados em paginas da internet de serviços de EMBL em <http://www.embl.de/services/index.html> são
25 conhecidos pelo elemento versado na técnica e também podem ser obtidos com o uso de, por exemplo, <http://www.google.com>.

As figuras mostram:

Figura 1

A fusão dos aminoácidos de terminação N 1-27 de épsilon de CD3 de
30 primata para uma proteína solúvel heteróloga.

Figura 2

A figura mostra os valores de absorção médios de amostras quadruplicadas medidas em um ensaio ELISA que detecta a presença de um construto que consiste nos aminoácidos de terminação N 1-27 da cadeia de épsilon de CD3 madura humana fundida à junção e porção Fc gama de IgG1 humano e um tag de 6 Histidina de terminação C em um sobrenadante de 293 células transientemente transfectado. A primeira coluna marcada "27 aa huCD3E" mostra o valor de absorção médio para o construto, a segunda coluna marcada "irrel. SN" mostra o valor médio para um sobrenadante de 293 células transfectado com um construto irrelevante como controle negativo. A comparação dos valores obtidos para o construto com os valores obtidos para o controle negativo demonstra claramente a presença do construto recombinante.

Figura 3

A figura mostra os valores de absorção médios de amostras quadruplicadas medidas em um ensaio ELISA que detecta a aglutinação das moléculas de aglutinação anti-CD3 de espécies cruzadas específicas na forma de preparações brutas de anticorpos de cadeia única expressados periplasmaticamente para um construto que compreende os aminoácidos 1-27 de terminação N da cadeia de épsilon de CD3 madura humana fundida à junção e porção Fc gama de IgG1 humano e uma His6 tag terminação C. As colunas mostram da esquerda para a direita os valores de absorção médios para as especificidades designadas como A2J HLP, I2C HLP E2M HLP, F7O HLP, G4H HLP, H2C HLP, E1L HLP, F12Q HLP, F6A HLP e H1E HLP. A coluna marcada mais à direita "neg. contr." mostra o valor de absorção médio para a preparação de cadeia única de um anticorpo de CD3 anti-humano de camundongo como controle negativo. A comparação dos valores obtidos para especificidades anti-CD3 com os valores obtidos para o controle negativo demonstra claramente a aglutinação forte das especificidades anti-CD3 aos aminoácidos 1-27 de terminação N da cadeia de épsilon de CD3 madura humana.

Figura 4

A fusão dos aminoácidos de terminação N 1-27 de épsilon de CD3 de primata a uma proteína ligado à membrana heteróloga.

Figura 5

As sobreposições de histograma de diferentes transfectantes testados em um ensaio FACS que detecta a presença de proteínas de fusão transmembrana recombinantes que consistem em EpCAM cinomolgos e os aminoácidos 1-27 de terminação N da cadeia de épsilon de CD3 de humano, marmoset, sagui, macaco de cheiro e suíno domestico respectivamente. As sobreposições de histograma da esquerda para a direita e do topo para o fundo do

mostram os resultados para os transfectantes que expressam os construtos que compreendem o humano 27 mer, marmoset 27 mer, sagui 27 mer, macaco de cheiro 27 mer e suíno 27 mer, respectivamente. Nas sobreposições individuais, a linha fina representa uma amostra incubada com PBS com 2% FCS em vez de anticorpo de anti-Flag M2 como controle negativo e a linha em negrito mostra uma amostra incubada com o anticorpo de anti-Flag M2. Para cada construto, a sobreposição dos histogramas mostra a aglutinação do anticorpo de anti-Flag M2 aos transfectantes, que demonstra claramente a expressão dos construtos recombinantes nos transfectantes.

Figura 6

As sobreposições de histograma de diferentes transfectantes testados em um ensaio FACS que detecta a aglutinação das molécula de aglutinações anti-CD3 de espécies cruzadas especificas na forma de preparações brutas de anticorpos de cadeia única expressados periplasmaticamente para os aminoácidos de terminação N 1-27 da cadeia de épsilon de CD3 de humano, marmoset, sagui e macaco de cheiro respectivamente fundida a EpCAM cinomolgos.

Figura 6A:

As sobreposições de histograma da esquerda para a direita e do topo para o fundo mostram os resultados para os transfectantes que expressam a EpCAM de CD3 1-27 que compreende o humano 27 mer testado com as

moléculas de aglutinação específicas de CD3 designada H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP e G4H HLP respectivamente.

Figura 6B:

5 As sobreposições de histograma da esquerda para a direita e do topo para o fundo mostram os resultados para os transfectantes que expressam o EpCAM de CD3 1-27 que compreende o marmoset 27 mer testado com as moléculas de aglutinação específicas de CD3 designada H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP e G4H HLP respectivamente.

Figura 6C:

10 As sobreposições de histograma da esquerda para a direita e do topo para o fundo mostram os resultados para os transfectantes que expressam o EpCAM de CD3 1-27 que compreende o sagui 27 mer testado com as moléculas de aglutinação específicas de CD3 designada H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP e G4H HLP respectivamente.

Figura 6D:

15 As sobreposições de histograma da esquerda para a direita e do topo para o fundo mostram os resultados para os transfectantes que expressam a EpCAM de CD3 1-27 que compreende o macaco de cheiro 27 mer testado com as moléculas de aglutinação específicas de CD3 designada H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP e G4H HLP respectivamente.

Figura 6E:

20 As sobreposições de histograma da esquerda para a direita e do topo para o fundo mostram os resultados para os transfectantes que expressam a EpCAM de CD3 1-27 que compreende o suíno 27 mer testado com as moléculas de aglutinação específicas de CD3 designada H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP e G4H HLP respectivamente.

25 Nas sobreposições individuais, a linha fina representa uma amostra incubada com uma preparação de cadeia única de um anticorpo de CD3 anti-humano de camundongo como controle negativo e a linha em negrito mostra uma amostra incubada com as respectivas moléculas de aglutinação anti-CD3

indicadas. Considerando a carência de aglutinação ao suíno 27 mer transfectantes e os níveis de expressão dos construtos mostradas na Figura 5, as sobreposições dos histogramas mostram aglutinação forte e específica das especificidades testadas anti-CD3 da anticorpos de cadeia única biespecífica humanos específicos de espécies completamente cruzadas para células que expressam as proteínas de fusão transmembrana recombinantes que compreendem os aminoácidos de terminação N 1-27 da cadeia de épsilon de CD3 de humano, marmoset, sagui e macaco de cheiro respectivamente fundidos aos EpCAM cinomolgos e mostram, portanto, múltipla especificidade de espécies cruzadas das moléculas de aglutinação anti-CD3.

Figura 7

O ensaio FACS para detecção de épsilon de CD3 humano em células EL4 T de camundongo transfectado. A análise gráfica mostra uma sobreposição de histogramas. A linha em negrito mostra células incubadas transfectadas com o anticorpo UCHT-1 de CD3 anti-humano. A linha fina representa células incubadas com um controle de isotipo IgG1 de camundongo. A aglutinação do anti CD3 anticorpo UCHT1 mostra claramente a expressão da cadeia de épsilon de CD3 humano na superfície celular de células EL4 T de camundongo transfectado.

Figura 8

A aglutinação de anticorpos anti CD3 específicos de espécies cruzadas a mutantes de alanina em um experimento de varredura de alanina. Nas Figuras individuais, as colunas mostram da esquerda para a direita os valores de aglutinação calculados em unidades arbitrárias em escala logarítmica para o transfectante do tipo selvagem (WT) e para todos os mutantes de alanina da posição 1 a 27. Os valores de aglutinação são calculados com o uso da seguinte fórmula:

$$value\_Sample(x,y) = \frac{Sample(x,y) - neg\_Contr.(x)}{(UCHT-1(x) - neg\_Contr.(x)) * \frac{WT(y) - neg\_Contr.(wt)}{UCHT-1(wt) - neg\_Contr.(wt)}}$$

Nesta equação *valor_Sample* significa o valor em unidades arbitrárias de aglutinação que revela o grau de aglutinação de um anticorpo anti-CD36

específico para um mutante de alanina específica conforme mostrada na Figura, *Sample* significa o valor de fluorescência mediana geométrica obtido para um anticorpo anti-CD36 específico analisado em um transfectante de varredura de alanina específico, *neg_Contr.* significa o valor de fluorescência mediana geométrica obtido para o controle negativo avaliado em um mutante de alanina específica, *UCHT-1* significa o valor de fluorescência mediana geométrica obtido para o anticorpo UCHT-1 avaliado em um mutante de alanina específica, *WT* significa o valor de fluorescência mediana geométrica obtido para um anticorpo anti-CD36 específico avaliado no transfectante do tipo selvagem, *x* especifica o respectivo transfectante, *y* especifica o respectivo anti-CD3 anticorpo e *wt* especifica que o respectivo transfectante é do tipo selvagem. As posições de mutante de alanina individuais são marcadas com o único código de letra do aminoácido do tipo selvagem e o número da posição.

Figura 8A:

A figura mostra os resultados para anticorpo anti CD3 específico de espécies cruzadas A2J HLP expressado como molécula IgG quimérica. A aglutinação reduzida é observada para mutantes para alanina na posição 4 (asparagina), na posição 23 (treonina) e na posição 25 (isoleucina). A perda completa de aglutinação é observada para mutações para alanina na posição 1 (glutamina), na posição 2 (aspartato), na posição 3 (glicina) e na posição 5 (glutamato).

Figura 8B:

A figura mostra os resultados para anticorpo anti CD3 específico de espécies cruzadas E2M HLP, expressado como molécula IgG quimérica. A aglutinação reduzida é observada para mutantes para alanina em posição 4 (asparagina), na posição 23 (treonina) e na posição 25 (isoleucina). A perda completa de aglutinação é observada para mutações para alanina na posição 1 (glutamina), na posição 2 (aspartato), na posição 3 (glicina) e na posição 5 (glutamato).

Figura 8C:

A figura mostra os resultados para anticorpo anti CD3 específico de espécies cruzadas H2C HLP, expressado como molécula IgG quimérica. A aglutinação reduzida é observada para mutantes para alanina em posição 4 (asparagina). A perda completa de aglutinação é observada para mutações para alanina glutamina na posição 1 (glutamina), na posição 2 (aspartato), na posição 3 (glicina) e na posição 5 (glutamato).

Figura 8D:

A figura mostra os resultados para anticorpo anti CD3 específico de espécies cruzadas F12Q HLP, testado como anticorpo de cadeia única expressado periplasmaticamente. A perda completa de aglutinação é observada para mutações to alanina na posição 1 (glutamina), na posição 2 (aspartato), na posição 3 (glicina) e na posição 5 (glutamato).

Figura 9

O ensaio FACS que detecta a aglutinação da molécula de aglutinação anti-CD3 específica de espécies cruzadas H2C HLP a CD3 humano com e sem His6 tag de terminação N.

As sobreposições de histograma são executadas a partir da linhagem da célula EL4 transfectada com cadeia de épsilon de CD3 humana do tipo selvagem (histograma esquerdo) ou a cadeia de épsilon de CD3 humano com His6 tag de terminação N (histograma direito) testada em um ensaio FACS que detecta a aglutinação de molécula de aglutinação específica de espécies cruzadas H2C HLP. As amostras são incubadas com um controle de isotipo apropriado como controle negativo (linha fina), anticorpo UCHT-1 de CD3 anti-humano como controle positivo (linha pontilhada) e espécies cruzadas anticorpo anti-CD36 específico H2C HLP na forma de uma molécula IgG quimérica (linha em negrito).

As sobreposições de histograma mostram aglutinação comparável do anticorpo UCHT-1 para ambos os transfectantes em comparação ao controle de isotipo que demonstra a expressão de ambos os construtos recombinantes. As sobreposições de histograma também mostram a aglutinação da molécula de aglutinação anti-CD3 H2C HLP somente à cadeia de épsilon de CD3 humana do

tipo selvagem, mas não à cadeia de épsilon de CD3 His6-humana. Estes resultados demonstram que uma terminação N livre é essencial para aglutinação da molécula de aglutinação anti-CD3 específica de espécies cruzadas H2C HLP.

Figura 10

5 A análise de aglutinação FACS de designada construtos de cadeia única biespecífica específicos de espécies cruzadas às células CHO transfectadas com o MCSP D3 humano, CD3 humano + linhagem celular T HPB-ALL, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo e linhagem celular T de macaco 4119 LnPx. A coloração FACS é executada conforme descrito no Exemplo 10. A

10 linha espessa representa células incubada com 2 µg/ml de proteína purificada que são subsequentemente incubadas com o anticorpo anti-his e um anticorpo de detecção marcado com PE. A linha de histograma fina reflete o controle negativo: células somente incubadas com o anticorpo anti-his e o anticorpo de detecção.

Figura 11

15 A análise de aglutinação FACS de designada construtos de cadeia única biespecífica específicos de espécies cruzadas às células CHO transfectadas com o MCSP D3 humano, CD3 humano + linhagem celular T HPB-ALL, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo e linhagem celular T de macaco 4119 LnPx. A coloração FACS é executada conforme descrito no Exemplo 10. A

20 linha espessa representa células incubada com 2 µg/ml d eproteína purificada que são subsequentemente incubadas com o anticorpo anti-his e um anticorpo de detecção marcado com PE. A linha de histograma fina reflete o controle negativo: células somente incubadas com o anticorpo anti-his e o anticorpo de detecção.

Figura 12

25 A análise de aglutinação FACS de designada construtos de cadeia única biespecífica específicos de espécies cruzadas às células CHO transfectadas com o MCSP D3 humano, CD3 humano + linhagem celular T HPB-ALL, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo e linhagem celular T de macaco 4119 LnPx. A coloração FACS é executada conforme descrito no Exemplo 10. A

30 linha espessa representa células incubada com 2 µg/ml d eproteína purificada que

são subsequentemente incubadas com o anticorpo anti-his e um anticorpo de detecção marcado com PE. A linha de histograma fina reflete o controle negativo: células somente incubadas com o anticorpo anti-his e o anticorpo de detecção.

Figura 13

5 A atividade citotoxicidade induzida por construtos de cadeia única específicos de MCSP específico de espécies cruzadas designadas redirecionada para linhagens celulares alvo indicadas. A) PBMCs humanos de CD4-/CD56- estimulados são usados como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 humano como células alvo. B) A linha celular T de macaco 4119 LnPx é
10 usada como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo como células alvo. O ensaio é executado conforme descrito no Exemplo 11.

Figura 14

A atividade citotoxicidade induzida por construtos de cadeia única
15 específicos de MCSP específico de espécies cruzadas designadas redirecionada para linhagens celulares alvo indicadas. A) e B) A linha celular T de macaco 4119 LnPx é usada como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo como células alvo. O ensaio é executado conforme descrito no Exemplo 11.

Figura 15

20 A atividade citotoxicidade induzida por construtos de cadeia única específicos de MCSP específico de espécies cruzadas designadas redirecionada para linhagens celulares alvo indicadas. A) e B) PBMCs humanos de CD4-/CD56- estimulados são usados como células efetoras, células CHO transfectadas com
25 MCSP D3 humano como células alvo. O ensaio é executado conforme descrito no Exemplo 11.

Figura 16

A atividade citotoxicidade induzida por construtos de cadeia única
específicos de MCSP específico de espécies cruzadas designadas redirecionada
30 para linhagens celulares alvo indicadas. A) Os PBMCs humanos de CD4-/CD56-

estimulados são usados como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 humano como células alvo. B) A linha celular T de macaco 4119 LnPx é usada como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo como células alvo. O ensaio é executado conforme descrito no

5 Exemplo 11.

Figura 17

A atividade citotoxicidade induzida por construtos de cadeia única específicos de MCSP específico de espécies cruzadas designadas redirecionada para linhagens celulares alvo indicadas. A) PBMCs de humano de CD4-/CD56-
10 estimulados são usados como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 humano como células alvo. B) A linha celular T de macaco 4119 LnPx é usada como células efetoras, células CHO transfectadas com MCSP D3 cinomólogo como células alvo. O ensaio é executado conforme descrito no Exemplo 11.

15

Figura 18

A estabilidade plasma de anticorpos de cadeia única biespecífica específicos de espécies cruzadas MCSP e CD3 testada através da medição de atividade de citotoxicidade induzida por amostras dos construtos de cadeia única designados incubados com 50% de plasma humano a 37°C e 4°C por 24 horas
20 respectivamente ou com adição de 50% de plasma humano imediatamente antes da realização de teste de citotoxicidade ou sem adição de plasma. As células CHO transfectadas com MCSP humano são usadas como linhagem celular alvo e PBMCs humanos de CD4-/CD56- estimulados são usados como células efetoras. O ensaio é executado conforme descrito no Exemplo 12.

25

Figura 19

A queda e a recuperação iniciais (isto é, redistribuição) de contagens de célula T absoluta (quadrados abertos), em sangue periférico de pacientes B-NHL (números de patente 1, 7, 23, 30, 31, e 33 da Tabela 4), que não tiveram essencialmente células B alvo CD19-positiva circulantes (triângulos cheios),
30 durante a fase inicial de infusão intravenosa com a molécula de aglutinação

CD19xCD3 de CD3 reconhecendo um epítipo de CD3 dependente de contexto convencional. As contagens celulares absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro ponto de dados mostra as contagens de linha de base imediatamente antes do início da infusão. A dose CD19xCD3 é dada em parênteses além do número do paciente.

Figura 20

(A) A redistribuição de célula T repetida (quadrados abertos) em paciente B-NHL nº19 (Tabela 4) que não teve células B alvo CD19-positivas circulantes (triângulos cheios) e sintomas de CNS desenvolvidos sob infusão intravenosa contínua com CD19xCD3 em uma dose inicial de $5\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ para um dia seguida por um aumento de dose repentino para $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. As contagens celulares absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro ponto de dados mostra as contagens de linha de base imediatamente prior antes do início da infusão. Após a recuperação de células T circulantes a partir do primeiro episódio de redistribuição acionado pelo início do tratamento a $5\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, o aumento de dose gradativo de 5 a $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ acionou um segundo episódio de redistribuição de célula T que foi associado ao desenvolvimento de sintomas de CNS dominados por confusão e desorientação.

(B) A redistribuição de célula T repetida em um paciente B-NHL, que desenvolveram sintomas de CNS sob infusão de bolo intravenosa repetida com CD19xCD3 a $1,5\mu\text{g}/\text{m}^2$. As contagens celulares absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O tempo de infusão para cada administração de bolo foi de 2 a 4 horas. As setas verticais indicam o início das infusões de bolo. Os pontos de dados no começo de cada administração de bolo mostram as contagens de célula T imediatamente antes do início da infusão de bolo. Cada infusão de bolo acionou um episódio de redistribuição de célula T seguido da recuperação das contagens de célula T antes da próxima infusão de bolo. Finalmente, o terceiro episódio de redistribuição de célula T foi associado ao desenvolvimento de sintomas de CNS neste paciente.

Figura 21

O padrão de redistribuição de célula T complexo (quadrados abertos) em paciente B-NHL nº20 (Tabela 4) sem células B alvo CD19-positivas circulantes (triângulos cheios), durante a iniciação ascendente da infusão de CD19xCD3, isto é, aumento gradual uniforme de taxa de fluxo de quase zero para $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ durante as primeiras 24 horas de tratamento. As contagens celulares absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro ponto de dados mostra contagens de linha de base imediatamente antes do início da infusão. A dose CD19xCD3 é dada em parênteses além do número do paciente. As células T que reaparecem no sangue circulante após a redistribuição inicial acionada pela primeira exposição a CD19xCD3 são parcialmente induzidas para desaparecerem novamente do sangue em circulação através ainda dos níveis crescentes de CD19xCD3 durante a fase ascendente.

Figura 22

As contagens de células T e B durante o tratamento com CD19xCD3 do paciente B-NHL nº13 (Tabela 4) que tiveram um número significativo de células B alvo (linfoma) CD19-positiva circulantes (triângulos cheios). As contagens celulares absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro ponto de dados mostra as contagens de linha de base imediatamente antes do início da infusão. A dose CD19xCD3 é dada em parênteses além do número do paciente. As células T (quadrados abertos) desaparecem completamente da circulação mediante o início da infusão de CD19xCD3 e não reaparecem até que as células B alvo (linfoma) CD19-positiva circulantes (triângulos cheios) sejam depletadas do sangue periférico.

Figura 23

A redistribuição de célula T repetida (quadrados abertos) em paciente B-NHL nº24 (Tabela 4), que não teve essencialmente as células B alvo CD19-positivas circulantes (triângulos cheios) e sintomas de CNS desenvolvidos mediante a iniciação da infusão de CD19xCD3 sem HSA adicional conforme requerido para estabilização da droga (painel superior). Após a primeira recuperação de células T circulantes a partir da redistribuição inicial, o fluxo de

droga não uniforme devido à carência de estabilização HSA acionou um segundo episódio de redistribuição de célula T que foi associado ao desenvolvimento de sintomas de CNS dominados por confusão e desorientação. Quando o mesmo paciente foi reiniciado corretamente com a solução de CD19xCD3 que contém

5 HSA adicional para estabilização de droga, nenhuma redistribuição de célula T repetida foi observada (painel inferior) e o paciente não desenvolveu novamente quaisquer sintomas de CNS. As contagens celulares absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro ponto de dados mostra contagens de linha de base imediatamente antes do início da infusão. A dose CD19xCD3 é dada

10 em parênteses além do número do paciente.

Figura 24

O modelo de adesão de célula T para células endoteliais induzido por aglutinação monovalente para epítopos de CD3 dependentes de contexto. A interação monovalente de molécula de aglutinação de CD3 convencional para seu

15 epítopo dependente de contexto em épsilon de CD3 pode levar a uma alteração alostérica na conformação de CD3 seguido do recrutamento de Nck2 para o domínio citoplásmico de épsilon de CD3 (Gil et al. (2002) Cell 109: 901). Como o Nck2 é diretamente ligado às integrinas através de PINCH e ILK (Legate et al. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7: 20), o recrutamento de Nck2 para o domínio

20 citoplásmico de épsilon de CD3 após uma alteração alostérica na conformação de CD3 através da aglutinação de uma molécula de aglutinação de CD3 convencional (como CD19xCD3 do exemplo 13) ao seu epítopo dependente de contexto em épsilon de CD3, pode aumentar a adesão de células T a células endoteliais através comutação transiente de integrinas na superfície da célula T em sua isoforma mais

25 adesiva através de sinalização de dentro para fora.

Figura 25

A atividade citotóxica do material de teste CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL usado para o estudo in vivo em macacos cinomólogos conforme descrito no Exemplo 14. A lise específica de células alvo CD33-positivas foi determinada em

30 uma ensaio de liberação ⁵¹crômio padrão em concentrações crescentes de CD33-

AF5 VH-VL x I2C VH-VL. A duração do ensaio foi de 18 horas. A linha celular T de macaco 4119 LnPx foi usada como fonte de células efetoras. As células CHO transfectadas com CD33 cinomólogo serviram como células alvo. A razão célula efetora para célula alvo (razão E:T) foi 10:1. A concentração de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL requerida para a lise de célula máxima alvo de metade (EC50) foi calculada a partir da curva de resposta de dose com um valor de 2,7 ng/ml.

Figura 26

(A) Depleção dependente de dose e tempo de monócitos CD33-positivos do sangue periférico de macacos cinomólogos através da infusão contínua intravenosa de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL conforme descrito no Exemplo 14. A porcentagem relativa à linha de base (isto é, 100%) de contagens monócitos de CD33-positivos circulantes após a duração do tratamento conforme indicado acima das colunas é mostrada para cada um dos dois macacos cinomólogos por nível de dose. O nível de dose (isto é, taxa de fluxo de infusão) é indicado abaixo das colunas. Nenhuma depleção de monócitos CD33-positivos circulantes foi observada nos animais 1 e 2 tratados por 7 dias em uma dose de 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. Nos animais 3 e 4 tratados por 7 dias a uma dose de 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, as contagens de monócito CD33-positivo circulante foram reduzidas para 68% e 40% da linha de base, respectivamente. Em 240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, os monócitos CD33-positivos circulantes foram quase completamente depletados do sangue periférico após 3 dias de tratamento (animais 5 e 6). Em 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, a depleção de monócitos CD33-positivos circulantes do sangue periférico foi completada já após o 1º dia de tratamento (animais 7 e 8).

(B) A contagem de célula T e monócito-CD33 no sangue periférico de dois macacos cynomolgus durante infusão contínua de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL por 14 dias a 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. As contagens de célula absoluta são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro ponto de dado mostra contagens da linha de base imediatamente antes do início da infusão. Após mobilização inicial de monócitos-CD33 durante as primeiras 12 horas após início da infusão, os monócitos-CD33 em sangue periférico (triângulos preenchidos) são

depletados por dois terços (animal 10) e 50% (animal 9) em relação às contagens da linha de base respectivas durante o curso adicional de infusão. As contagens de célula T que circulam (quadrados abertos) mostram uma queda inicial limitada seguida pela recuperação ainda durante a presença de células alvo monocítica

5 CD33-positiva que circulam.

Figura 27

A atividade citotóxica de material de teste MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL usado para o estudo in vivo em macacos cynomolgus conforme descrito no exemplo 15. A lise específica de células alvo positivass para MCSP foi
10 determinada em um ensaio de liberação de ⁵¹Cromo padrão a concentrações crescentes de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL. A duração do ensaio foi de 18 horas. A linha de célula T símio 4119 LnPx foi usada como fonte de células efetoras. As células CHO transfectadas com MCSP de cynomolgus serviram como células alvo. A razão de célula efetora para célula alvo (razão de E:T) foi de 10:1. A
15 concentração de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL necessária para lises de célula alvo com metade do efeito máximo (EC50) foi calculada a partir da curva de resposta de dosagem com um valor de 1,9 ng/ml.

Figura 28

A ausência de episódios iniciais de queda e recuperação
20 subsequente de contagens de célula T absolutas (isto é, redistribuição) em sangue periférico de macacos cynomolgus durante a fase inicial de infusão intravenosa com a molécula de aglutinação CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL reconhecendo um epítipo de CD3 independente essencialmente de contexto. As contagens de células absolutas são dadas em 1000 células por microlitro de sangue. O primeiro
25 ponto de dado mostra contagens da linha de base imediatamente antes do início da infusão. A dosagem de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL é dada em parêntese em adição ao número de animal. Na ausência conhecida de células alvo positivass para MCSP do sangue circulante de macacos cynomolgus não há indução de redistribuição de célula T (isto é, um episódio inicial de queda e recuperação
30 subsequente de contagens de células T absolutas) através da reticulação mediada

por célula alvo de CD3. Além disso, a indução de redistribuição de célula T (isto é, um episódio inicial de queda e recuperação subsequente de contagens de células T absolutas) através de um sinal, que as células T podem receber através de interação exclusiva com apenas um sítio de aglutinação de CD3, pode ser evitada

5 através do uso de moléculas de aglutinação CD3 como MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL que reconhecem um opítopo de CD3 independente essencialmente de contexto.

Figura 29

A análise de aglutinação de FACS de construtos biespecíficos

10 específicos de espécies cruzadas designados para células CHO transfectadas com CD33 humano, o CD3 humano + linha de célula T HPB-ALL, as células CHO transfectadas com CD33 símio e PBMC símio, respectivamente. O manchamento de FACS é realizado conforme descrito no exemplo 16.4. As linhas em negrito representam células incubadas com 5 µg/ml de sobrenadante de cultura celular

15 ou constructo de cadeia única específico purificado de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecíficos específicos para espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos refletem os controles negativos. O sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies

20 cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo para CD33 símio e humano e CD3 símio e humano.

Figura 30

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem a atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única

25 específicos de CD33 específico de espécies cruzadas designados redirecionados para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios são realizados conforme descrito no exemplo 16.5. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células efetoras símio e humana contra

30 CD33 símio e humano transfectado por células CHO, respectivamente.

Figura 31

A transferência Western blot e gel SDS PAGE que monitoram a purificação da molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas E292F3 HL x I2C HL designada. As amostras do eluato, do sobrenadante de cultura celular (SN) e do fluxo através da coluna (FT) foram analisadas conforme indicado. Um marcador de proteína (M) foi aplicado como referência de tamanho. Uma forte banda de proteína com um peso molecular entre 50 e 60 kDa no gel SDS PAGE demonstra a purificação eficaz da molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas para um grau muito elevado de pureza com o método de purificação de uma etapa descrito no Exemplo 17.2. A transferência Western blot que detecta a histidina₆ tag confirma a identidade da banda de proteína no eluato como a molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas. O sinal fraco para a amostra de fluxo atravessante neste método de detecção sensível mostra, ainda, a captura quase completa de moléculas de cadeia única biespecíficas através do método de purificação.

Figura 32

A transferência Western blot e gel SDS PAGE que monitoram a purificação da molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas V207C12 HL x H2C HL designados. As amostras do eluato, do sobrenadante de cultura celular (SN) e do fluxo atravessante da coluna (FT) foram analisadas conforme indicado. Um marcador de proteína (M) foi aplicado como referência de tamanho. Uma forte banda de proteína com um peso molecular entre 50 e 60 kDa no gel SDS PAGE demonstra a purificação eficaz da molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas para um grau muito elevado de pureza com o método de purificação de uma etapa descrito no Exemplo 17.2. A transferência Western que detecta a histidina₆ tag confirma a identidade da banda de proteína no eluato como a molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas. O sinal fraco para a amostra de fluxo atravessante neste método de detecção sensível mostra, ainda, a captura quase

completa de moléculas de cadeia única biespecíficas através do método de purificação.

Figura 33

A transferência Western blot e gel SDS PAGE que monitoram a purificação da molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas AF5HLxF12QHL designados. As amostras do eluato, do sobrenadante de cultura celular (SN) e do fluxo atravessante da coluna (FT) foram analisadas conforme indicado. Um marcador de proteína (M) foi aplicado como referência de tamanho. Uma forte banda de proteína com um peso molecular entre 50 e 60 kDa no gel SDS PAGE demonstra a purificação eficaz da molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas para um grau muito elevado de pureza com o método de purificação de uma etapa descrito no Exemplo 17.2. A transferência Western que detecta a histidina₆ tag confirma a identidade da banda de proteína no eluato como a molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas. O sinal na amostra de fluxo atravessante neste método de detecção sensível é explicado através da saturação da coluna de afinidade devido à alta concentração de moléculas de cadeia única biespecíficas no sobrenadante.

Figura 34

A curva padrão de AF5HLxI2CHL em 50% soro do macaco símio. O diagrama superior mostra a curva padrão gerada para o ensaio conforme descrito no exemplo 18.2.

O diagrama inferior mostra resultados para amostras de controle de qualidade de AF5HLxI2CHL em 50% soro do macaco símio. As taxas de recuperação estão acima de 90% para a amostra de QC alta e média e acima de 80% para a baixa mostra de QC.

Assim, o ensaio permite a detecção de AF5HLxI2CHL em amostras de soro na faixa de 10 ng/ml a 200 ng/ml (antes da diluição).

Figura 35

A curva padrão de MCSP-G4 HL x I2C HL em 50% de soro do macaco símio. O diagrama superior mostra a curva padrão gerada para o ensaio

conforme descrito no exemplo 18.2.

O diagrama inferior mostra resultados para amostras de controle de qualidade de MCSP-G4 HL x I2C HL em 50% de soro do macado símio. As taxas de recuperação estão acima de 98% para a amostra de QC alta e média e acima de 85% para a baixa amostra de QC.

Assim, o ensaio permite a detecção de MCSP-G4 HL x I2C HL em amostras de soro na faixa de 10 ng/ml a 200 ng/ml (antes da diluição).

Figura 36

A análise de aglutinação de FACS de um anticorpo anti-Flag para células CHO transfectadas com os aminoácidos de terminal N de 1-27 de épsilon de CD3 das espécies designados fundidas a EpCAM de cinomolgo. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 19.1. As linhas em negrito representam células incubadas com o anticorpo anti-Flag. Os histogramas preenchidos refletem os controles negativos. Foi usado PBS com 2 % de FCS como controle negativo. Os histogramas mostram aglutinação comparável e forte do anticorpo anti-Flag a todos os tensoativos que indicam expressão igual e forte dos construtos transfectados.

Figura 37

A análise de aglutinação de FACS do constructo I2C IgG1 às células CHO que expressam os aminoácidos de terminal N de 1-27 de épsilon de CD3 das espécies designados fundidas em EpCAM de cinomolgo. O manchamento de FACS é realizado conforme descrito no exemplo 19.3. As linhas em negrito representam células incubadas com 50 µl de sobrenadante de cultura celular de células que expressam os construtos I2C IgG1. Os histogramas preenchidos refletem o controle negativo. As células que expressas os aminoácidos de terminal N de 1-27 de épsilon de CD3 de suíno fundido em EpCAM de cinomolgo foram usadas como controle negativo. Em comparação com o controle negativo, os histogramas demonstram claramente a aglutinação dos construtos I2C IgG1 a aminoácidos de terminal N de 1-27 de épsilon de CD3 de humanp, marmoset, sagui e macaco-de-cheiro.

Figura 38

A análise de aglutinação de FACS dos construtos I2C IgG1 conforme descrito no exemplo 19.2 a CD3 humano com e sem tag His6 de terminal N conforme descrito nos exemplos 6.1 e 5.1, respectivamente. As linhas em negrito

5 representam células incubadas com o anticorpo CD3 anti-humano UCHT-1, o anticorpo penta-His (Qiagen) e o sobrenadante de cultura celular de células que expressam os construtos I2C IgG1, respectivamente, conforme indicado. Os histogramas preenchidos refletem as células incubadas com um anticorpo IgG1 murino irrelevante como controle negativo.

10 Enquanto duas sobreposições de histograma superior mostram aglutinação comparável do anticorpo UCHT-1 a ambos os tensoativos conforme comparado ao isótopo de controle que demonstra expressão de ambos os construtos recombinantes. As sobreposições de histograma de centro mostram a aglutinação do anticorpo penta his às células que expressam a cadeia de épsilon

15 de CD3 de His6-humano (His6-CD3), mas não às células que expressam a cadeia de épsilon de CD3 do tipo selvagem (WT-CD3). As sobreposições de Histograma inferior mostram a aglutinação dos construtos I2C IgG1 à cadeia de épsilon de CD3 humano de tipo selvagem, mas não à cadeia de épsilon de CD3 de His6 humano. Estes resultados demonstram que um terminal N livre é essencial para aglutinação

20 da molécula de aglutinação de anti-CD3 específico de espécies cruzadas I2C à cadeia de épsilon de CD3.

Figura 39

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados para as células CHO

25 transfectadas com human MCSP D3, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, as células CHO transfectadas com MCSP D3 símio e a linha de célula T símio 4119 LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 10. As linhas em negrito representam as células incubadas com 2 µg/ml de constructo de cadeia única biespecífica purificada ou sobrenadante

30 de célula que contém o constructo de cadeia única biespecífica, respectivamente.

Os histogramas preenchidos refletem os controles negativos. O sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo para aglutinação à linhas de célula T. Um constructo de cadeia única com especificidade alvo irrelevante foi usado como controle negativo para aglutinação ao MCSP D3 transfectado por células CHO. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos the histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao MCSP D3 humano e símio e CD3 humano e símio.

Figura 40

10 A atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única específica de MCSP específico de espécies cruzadas designados redirecionadas para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras e a razão efetora para alvo também foram usadas conforme indicado. O ensaio é realizado conforme descrito no exemplo 11. Os diagramas demonstram claramente potente
15 recrutamento específico de espécies cruzadas de atividade citotóxica por cada constructo.

Figura 41

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados à células CHO transfectadas com CD33 humano, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, as
20 células CHO transfectadas com CD33 símio e PBMC símio, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 21.2. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos refletem os
25 controles negativos. O sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao CD33 símio e humano e CD3 humano e
30 símio.

Figura 42

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única específicos de CD33 específico de espécies cruzadas designados redirecionadas para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito no exemplo 21.3. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células efetoras símio e humanas contra células CHO transfectados por CD33 símio e humano, respectivamente.

Figura 43

A redistribuição de célula T em um chimpanzé sob infusão semanal de bolo intravenoso com PBS/5% de HSA e PBS/5% de HSA mais constructo de anticorpo biespecífico para EpCAM/CD3 de cadeia única em dosagens de 1,6, 2,0, 3,0 e 4,5 µg/kg. O tempo de infusão para cada administração de bolo foi de 2 horas. As setas verticais indicam o início das infusões de bolo. Os pontos de dados no início de cada administração de bolo mostram as contagens de célula T imediatamente antes do início da infusão de bolo. Cada infusão de bolo do constructo de anticorpo biespecífico para EpCAM/CD3 de cadeia única, que reconhece um epítipo de CD3 dependente de contexto convencional, disparou um episódio de redistribuição de célula T seguido por recuperação de células T para valores de linha de base antes da próxima infusão de bolo.

Figura 44

A análise ELISA específica para CD3 de preparações periplásmicas que contêm fragmentos de proteína de scFv marcados por Flag tag de clones selecionados. A preparações periplásmicas de fragmentos de proteína scFv solúvel foram adicionadas às cavidades de uma placa ELISA, que foi revestida com épsilon de CD3 (aa 1-27) humano solúvel-proteína de fusão Fc e foi, ainda, bloqueada com 3% de BSA em PBS. A detecção foi realizada através de um anticorpo marcado por anti Flag-Biotina monoclonal seguida por Estreptavidina conjugada por peroxidase. A ELISA foi desenvolvida por uma solução de substrato

ABTS. Os valores de OD (eixo geométrico y) foram medidos a 405 nm por um leitor ELISA. Os nomes de clone são apresentados sobre o eixo geométrico x.

Figura 45

A análise ELISA de preparações periplásmicas que contém fragmentos de proteína de scFv marcados por Flag tag de clones selecionados. As mesmas preparações periplásmicas de fragmentos de proteína scFv solúvel como na Figura 44 foram adicionadas às cavidades de uma placa ELISA que não foi revestida com épsilon de CD3 (aa 1-27) humano-proteína de fusão Fc, mas com hulG1 (Sigma) e bloqueada com 3% de BSA em PBS.

A detecção foi realizada através de um anticorpo marcado por anti Flag-Biotina monoclonal seguida por Estreptavidina conjugada por peroxidase. A ELISA foi desenvolvida por uma solução de substrato ABTS. The Valores de OD (eixo geométrico y) foram medidos a 405 nm por um leitor ELISA. Os nomes de clone são apresentados sobre o eixo geométrico x.

Figura 46

As Figuras 46A-G: A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados a células CHO transfectadas com PSCA humano, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, as células CHO transfectadas com e à linha de célula T símio 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 24.5. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos refletem os controles negativos. O sobrenadante de células não transfectadas foi usado como um controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao PSCA símio e humano e CD3 humano e símio.

Figura 47

Figura 47A-C: Os diagramas mostram resultados de ensaios de

liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida pelos construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito

5 no exemplo 24.6. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células efetoras símio e humanas contra células positivas para PSCA símio e humano, respectivamente.

Figura 48

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados a células CHO transfectadas com PSCA humano, ao CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, às células CHO transfectadas com PSCA símio e à linha de célula T símio 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 45.5. As linhas em negrito representam células incubadas com

15 sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos mostram os controles negativos. O sobrenadante de células não transfectadas foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos

20 histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao PSCA símio e humano e CD3 humano e símio.

Figura 49

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as

25 linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito no exemplo 24.6. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células T efetoras humanas e de símio

30 contra células alvo positivass para PSCA símio e humano, respectivamente.

Figura 50

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados a células CHO transfectadas com CD19 humano, a linha de célula T de CD3 positivo humano HPB-ALL e a linha de célula T de CD3 positivo de símio 4119 LnPx. O manchamento de FACS é realizado conforme descrito no exemplo 25.4. Os histogramas de linha espessa representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular e, subsequentemente, com um anticorpo anti-His-tag de murino seguido uma anticorpo de detecção de Ig anti-murino marcado com PE. Os histogramas de linhas finas representam o controle negativo, isto é, células incubadas apenas com o anticorpo anti-His-tag e o anticorpo de detecção de Ig anti-murino.

Figura 51

A atividade de célula T citotóxica redirecionada por construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados contra a linha de célula alvo indicada. A) Os PBMCs humanos depletados por CD4/CD56 estimulados são usados como células T efetoras e células CHO transfectadas com CD19 humano como células alvo. B) A linha de célula T símio 4119 LnPx é usada como fonte de células efetoras e células CHO transfectadas com CD19 humano são usadas como células alvo. O ensaio é realizado conforme descrito no exemplo 25.5.

Figura 52

A análise de aglutinação de FACS dos construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados para a linha de câncer de mama humano positivo para C-MET MDA-MB-231, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL e para o CD3 símio+ linha de célula T 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 26.5. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos representam os

controles negativos. O sobrenadante de células não transfectadas foi usado como um controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao C-MET e ao CD3 humano e símio.

5 **Figura 53**

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida pelos construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito no exemplo 26.6. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células efetoras humanas contra células positivas para C-MET.

15 **Figura 54**

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados a células CHO que expressam cMET humano conforme descrito no exemplo 27.1, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, as células CHO que expressam cMET símio conforme descrito no exemplo 27.1 e a linha de célula T símio 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 27.2. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos mostram os controles negativos. O sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao cMET símio e humano e CD3 humano e símio.

25 **Figura 55**

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo

measuring atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única específico de cMET específico de espécies cruzadas designados redirecionados para a linha de célula alvo indicada gerada conforme descrito no exemplo 27.1. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados

5 conforme descrito no exemplo 27.4. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células T efetoras de símio contra células alvo positivas para cMET símio.

Figura 56

A análise de aglutinação de FACS de anticorpos de scFv específico

10 de espécies cruzadas designados para as células CHO que expressam cMET humano conforme descrito no exemplo 27.1 e às células CHO que expressam cMET símio conforme descrito no exemplo 27.1, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 27.3. As linhas em negrito representam células incubadas com preparações periplásmicas que contêm os

15 anticorpos de scFv específico de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos mostram os controles negativos. O Tampão usado para preparações periplásmicas foi usado como controle negativo. Para cada anticorpo de scFv específico de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao cMET símio e humano.

Figura 57

A análise de aglutinação de FACS de um fragmento de anticorpo de scFv específico de espécies cruzadas às células CHO transfectadas com Endosialin humano e às células CHO transfectadas com Endosialin símio. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 28.3. As linhas

25 em negrito representam células incubadas com uma preparação periplásmica que contém o fragmento de anticorpo de scFv. As linhas finas representam os controles negativos. As células não transfectadas CHO foram usadas como um controle negativo. As sobreposições dos histogramas mostra aglutinação específica do fragmento de anticorpo de scFv ao Endosialin símio e humano.

Figura 58

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados para as células CHO transfectadas com human CD248, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, as células CHO transfectadas com CD248 símio e a linha de célula T símio 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 29.1. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. As linhas finas mostram os controlos negativos. O sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao CD248 símio e humano e CD3 humano e símio.

Figura 59

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única específica de CD248 específico de espécies cruzadas designados redirecionados para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito no exemplo 29.1. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células T efetoras humanas e de símio contra células alvo positivas para CD248 símio e humano, respectivamente.

Figura 60

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados para as células CHO transfectadas com EpCAM humano, CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, e à linha de célula T símio 4119 LnPx. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 30.4. As linhas espessas representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular que foram, subsequentemente, incubadas com o anticorpo anti-his e o anticorpo de detecção marcado por PE. O

histograma de linha fina mostra o controle negativo: células incubadas apenas com o anticorpo anti-his e o anticorpo de detecção.

Figura 61

A atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única
 5 biespecífica específica de espécies cruzadas designados direcionados para as
 linhas de célula alvo indicadas. A) CD4-/CD56 estimulado- PBMCs humanas são
 usadas como células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM humano
 como células alvo. B) As linhas de célula T símio 4119 LnPx foram usadas como
 células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM humano como células
 10 alvo. O ensaio foi realizado conforme descrito no exemplo 30.5.

Figura 62

A atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única
 biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as
 linhas de célula alvo indicadas. A) CD4-/CD56 estimulado- PBMCs humanas são
 15 usadas como células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM humano
 como células alvo. B) As linhas de célula T símio 4119 LnPx foram usadas como
 células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM humano como células
 alvo. O ensaio foi realizado conforme descrito no exemplo 30.5.

Figura 63

20 A atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única
 biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as
 linhas de célula alvo indicadas. A) e B) CD4-/CD56 estimulado- PBMCs humanas
 são usadas como as células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM
 humano como células alvo. O ensaio foi realizado conforme descrito no exemplo
 25 30.5.

Figura 64 e 65

A atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única
 biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as
 linhas de célula alvo indicadas. A) e B) As linhas de célula T símio 4119 LnPx
 30 foram usadas como células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM

humano como células alvo. O ensaio foi realizado conforme descrito no exemplo 30.5

Figura 66

A atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única
 5 biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as
 linhas de célula alvo indicadas. A) CD4-/CD56 estimulado- PBMCs humanas são
 usadas como células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM humano
 como células alvo. B) AS linhas de célula T símio 4119 LnPx foram usadas como
 células efectoras, as células CHO transfectadas com EpCAM humano como células
 10 alvo. O ensaio foi realizado conforme descrito no exemplo 30.5

Figura 67

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única
 biespecífica específica de espécies cruzadas designados para as células CHO
 transfectadas com EpCAM híbrido humano-de camundongo, de camundongo ou
 15 humano. O mancha de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo
 30.7. As barras representam a intensidade de fluorescência média dos construtos
 designados para os antígenos EpCAM declarados.

Figura 68

Nas análise FACS, os construtos indicados mostraram aglutinação ao
 20 alfa de FAP e CD3 comparado ao controle negativo. A especificidade das
 espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos para CD3 humano e símio e
 antígenos alfa de FAP, respectivamente, foi demonstrada. O ensaio foi realizado
 conforme descrito no exemplo 31

Figura 69

25 Todos os construtos de anticorpo de cadeia única biespecífico
 específico para espécies cruzadas gerados demonstraram atividade citotóxica
 contra células alvo positivas para alfa de FAB humano eliciadas através de CD4
 humano estimulado/PBMC depletado por CD56 e as células alvo positivas para
 alfa de FAP símio eliciadas através da linha de célula T símio 4119LnPx. O ensaio
 30 foi realizado conforme descrito no exemplo 31

Figura 70

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados às células CHO transfectadas com alfa de FAP humano, o CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL, às células CHO transfectadas com alfa de FAP símio e à linha de célula T símio 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 32.1. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. As linhas finas mostram os controles negativos. O sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao alfa de FAP símio e humano e ao CD3 humano e símio.

Figura 71

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única específicos de alfa de FAP específico de espécies cruzadas designados redirecionados para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito no exemplo 32.1. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o potente recrutamento de atividade citotóxica de células T efetoras humanas e de símio contra células alvo positivas para alfa de FAP símio e humano, respectivamente.

Figura 72

A análise de aglutinação de FACS de anticorpos de scFv específico de espécies cruzadas designados às células CHO transfectadas com alfa de FAP humano e às células CHO transfectadas com alfa de FAP símio, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 32.2. As linhas em negrito representam células incubadas com preparações periplásmicas

que contêm os anticorpos de scFv específicos de espécies cruzadas. Os histogramas preenchidos mostram os controles negativos. O tampão usado para preparações periplásmicas foi usado como controle negativo. Para cada anticorpo de scFv específico de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra

5 aglutinação específica do constructo ao alfa de FAP símio e humano.

Figura 73

A análise de aglutinação de FACS de construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados às células CHO transfectadas com human IGF-1R, ao CD3 humano+ linha de célula T HPB-ALL,

10 às células CHO transfectadas com IGF-1R símio e à linha de célula T símio 4119LnPx, respectivamente. O manchamento de FACS foi realizado conforme descrito no exemplo 33.3. As linhas em negrito representam células incubadas com sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os construtos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas. Os

15 histogramas preenchidos mostram os controles negativos. O meio de cultura celular foi usado como controle negativo. Para cada constructo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas, a sobreposição dos histogramas mostra aglutinação específica do constructo ao IGF-1R símio e humano e ao CD3 humano e símio.

Figura 74

Os diagramas mostram resultados de ensaios de liberação de cromo que medem atividade citotóxica induzida por construtos de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas designados redirecionados para as linhas de célula alvo indicadas. As células efetoras também foram usadas

25 conforme indicado. Os ensaios foram realizados conforme descrito no exemplo 33.3. Os diagramas demonstram claramente para cada constructo o recrutamento de atividade citotóxica de células T efetoras humanas e de símio contra células alvo positivas para IGF-1R símio e humano, respectivamente.

A presente invenção é adicionalmente descrita por meio dos seguintes

30 exemplos não limitadores ilustrativos que proporcionam um melhor

compreendimento da presente invenção e de suas muitas vantagens.

EXEMPLOS

1. Identificação de sequências de épsilon de CD3 de amostras de sangue de primatas não humanos

5 As amostras de sangue dos seguintes primatas não humanos foram usadas para identificação de épsilon de CD3: *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* e *Saimiris ciureus*. Todas as amostras de sangue tratadas com heparina fresca foram preparadas para isolar RNA celular total de acordo com o protocolo do fabricante (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen). O mRNA extraído foi transcrito
10 em cDNA de acordo com os protocolos publicados. Em resumo, 10 µl de RNA precipitado foi incubado com 1,2 µl de 10x mistura de hexanucleotídeo (Roche) a 70 °C por 10 minutos e armazenado em gelo. Foi adicionada uma mistura de reação que consiste em 4 µl de 5x tampão sobrescrito II, 0,2 µl de ditiotretol a 0,1M, 0,8 µl de sobrescrito II (Invitrogen), 1,2 µl de trifosfatos de
15 desoxiribonucleosídeo (25 µM), 0,8 µl de Inibidor de RNase (Roche) e 1,8 µl de DNase e RNase livre de água (Roth). A mistura de reação foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos seguido por incubação a 42 °C por 50 minutos e a 90 °C por 5 minutos. A reação foi resfriada em gelo antes da adição de 0,8 µl de RNaseH (1 U/µl, Roche) e incubada por 20 minutos a 37°C.

20 Os cDNAs de primeiro filamento de cada espécie foram submetidos às reações de cadeia de polimerase de 35 ciclos separadas com o uso de polimerase Taq DNA (Sigma) e a seguinte combinação de iniciador projetada na pesquisa de base de dados: iniciador direto 5'-AGAGTTCTGGGCCTCTGC-3' (SEQ ID N°: 253); iniciador reverso 5'-CGGATGGGCTCATAGTCTG-3' (SEQ ID
25 N°: 254);. As bandas de 550 bp amplificadas foram purificadas por gel (Gel Extraction Kit, Qiagen) e seqüenciadas (Sequiserve, Vaterstetten/Alemanha, vide listagem de sequência).

Épsilon de CD3 *Callithrix jacchus*

Nucleotídeos

30 CAGGACGGTAATGAAGAAATGGGTGATACTACACAGAACCCATA

TAAAGTTTCCATCTCAGGAACACAGTAACACTGACATGCCCTCGGTATGATG
 GACATGAAATAAAATGGCTCGTAAATAGTCAAAACAAAGAAGGTCATGAGGAC
 CACCTGTTACTGGAGGACTTTTCGGAAATGGAGCAAAGTGGTTATTATGCCTG
 CCTCTCCAAAGAGACTCCCGCAGAAGAGGCGAGCCATTATCTCTACCTGAAG
 5 GCAAGAGTGTGTGAGAACTGCGTGGAGGTGGAT

Aminoácidos (SEQ ID N°: 3)

QDGNEEMGDTTQNPYKVSISGTTVTLTCPRYDGHEIKWLVNSQNKE
 GHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACLSKETPAEEASHYLYLKARVCENCVEVD

Épsilon de CD3 *Saguinus oedipus*

10 Nucleotídeos

CAGGACGGTAATGAAGAAATGGGTGATACTACACAGAACCCATA
 TAAAGTTTCCATCTCAGGAACACAGTAACACTGACATGCCCTCGGTATGATG
 GACATGAAATAAAATGGCTTGTAAATAGTCAAAACAAAGAAGGTCATGAGGAC
 CACCTGTTACTGGAGGATTTTTCGGAAATGGAGCAAAGTGGTTATTATGCCTG
 15 CCTCTCCAAAGAGACTCCCGCAGAAGAGGCGAGCCATTATCTCTACCTGAAG
 GCAAGAGTGTGTGAGAACTGCGTGGAGGTGGAT

Aminoácidos (SEQ ID N°: 5)

QDGNEEMGDTTQNPYKVSISGTTVTLTCPRYDGHEIKWLVNSQNKE
 GHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACLSKETPAEEASHYLYLKARVCENCVEVD

20 Épsilon de CD3 *Saimiris ciureus*

Nucleotídeos

CAGGACGGTAATGAAGAGATTGGTGATACTACCCAGAACCCATA
 TAAAGTTTCCATCTCAGGAACACAGTAACACTGACATGCCCTCGGTATGATG
 GACAGGAAATAAAATGGCTCGTAAATGATCAAAACAAAGAAGGTCATGAGGAC
 25 CACCTGTTACTGGAAGATTTTTCAGAAATGGAACAAAGTGGTTATTATGCCTGC
 CTCTCCAAAGAGACCCCCACAGAAGAGGCGAGCCATTATCTCTACCTGAAGG
 CAAGAGTGTGTGAGAACTGCGTGGAGGTGGAT

Aminoácidos (SEQ ID N°: 7)

QDGNEEIGDTTQNPYKVSISGTTVTLTCPRYDGQEIKWLVDNQNKE
 30 GHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACLSKETPTEEASHYLYLKARVCENCVEVD

2. Geração de fragmentos de anticorpo de cadeia única específica de espécies cruzadas (scFv) que se aglutinam a aminoácidos de 1-27 de terminal N de épsilon de CD3 de ser humano e primatas não pertencentes ao gênero chimpanzee diferentes

2.1. Imunização de camundongos com o suco do terminal N de épsilon de CD3 separado de seu contexto CD3 nativo através de fusão em uma proteína solúvel heteróloga

Camundongos F1 com 10 semanas de vida de cruzamento de balb/c x C57preto foram imunizados com a épsilon de CD3-proteína de fusão Fc que transporta a maioria dos aminoácidos de 1-27 de terminal N da cadeia de épsilon de CD3 madura (1-27 CD3-Fc) de ser humano e/ou saimiris ciureus. Para esse fim, foram injetados 40 µg de 1-27 CD3-proteína de fusão Fc com 10 nmol de um Cpg modificado por tioato-Oligonucleotídeo (5'-tccatgacgttcctgatgct-3') (SEQ ID N° 343) em 300 µl de PBS por camundongo de maneira intra-peritoneal. Os camundongos recebem imunizações aceleradas após 21, 42 e, opcionalmente, 63 dias da mesma maneira. Dez dias após a primeira imunização acelerada, as amostras de sangue foram tiradas e titulação de soro de anticorpo contra 1-27 CD3-proteína de fusão Fc foram testadas através ELISA. Adicionalmente, a titulação contra a linha de célula T humana positiva para CD3 HPBall foi testada em citometria de fluxo de acordo com os protocolos padrões. As titulações de soro foram significativamente mais elevadas em animais imunizados que em animais não imunizados.

2.2. Geração de uma biblioteca de scFv de anticorpo murino imune: Construção de uma biblioteca de anticorpo combinatório e exibição de fago

Três dias após a última injeção, as células de baço murino foram coletadas para a preparação de RNA total de acordo com os protocolos padrões.

Uma biblioteca de fragmentos de DNA de região variável (VH) de cadeia pesada de Ig e de região variável (VK) de cadeia leve (kappa) de imunoglobulina murina (Ig) foi construída através de RT-PCR em RNA de baço murino com o uso de iniciador específico de VK e VH. O cDNA foi sintetizado de

acordo com os protocolos padrões.

Os iniciadores foram projetados para resultarem em um sítio de reconhecimento 5'-XhoI e um 3'-BstEII para os fragmentos V de cadeia pesada amplificada e em um sítio de reconhecimento 5'-SacI e a 3'-SpeI para fragmentos de DNA de VK amplificada.

Para a amplificação por PCR dos fragmentos de DNA de VH, oito iniciadores específicos de 5'-VH-família (MVH1(GC)AG GTG CAG CTC GAG GAG TCA GGA CCT (SEQ ID N° 344); MVH2 GAG GTC CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT (SEQ ID N° 345); MVH3 CAG GTC CAA CTC GAG CAG CCT GGG GCT (SEQ ID N° 346); MVH4 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGG GCA (SEQ ID N° 347); MVH5 GA(AG) GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGA GGA (SEQ ID N° 348); MVH6 GAG GTG AAG CTT CTC GAG TCT GGA GGT (SEQ ID N° 349); MVH7GAA GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA (SEQ ID N° 350); MVH8 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT (SEQ ID N° 351)) foram combinados, cada um, com um iniciador de 3'-VH (3'MuVHBstEII tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gcc cca g (SEQ ID N° 352)); para a amplificação por PCR dos fragmentos de cadeia de VK, sete diferentes iniciadores específicos de 5'-VK-família (MUVK1 CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT (SEQ ID N° 353); MUVK2 CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGC AGC CGC CC (SEQ ID N° 354); MUVK3 CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA (SEQ ID N° 355); MUVK4 CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA (SEQ ID N° 356); MUVK5 CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA (SEQ ID N° 357); MUVK6 CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA (SEQ ID N° 358); MUVK7 CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA (SEQ ID N° 359)) foram, cada um, combinados com um iniciador de 3'-VK (3'MuVkJHindIII/BsiW1 tgg tgc act agt cgt acg ttt gat ctc aag ctt ggt ccc (SEQ ID N° 360)).

O seguinte programa de PCR foi usado para amplificação: desnaturação a 94°C por 20 segundos; iniciador que anela a 52°C por 50 segundos e a extensão do iniciador a 72°C por 60 segundos e 40 ciclos, seguido

por uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

450 ng dos fragmentos de cadeia leve kappa (digeridos por SacI-SpeI) foram ligados a 1400 ng do fagomídeo pComb3H5BHis (digerido por SacI-SpeI; grande fragmento). A biblioteca de anticorpo combinatório resultante foi,
5 então, transformada em 300 µl de células de *Escherichia coli* XL1 Blue eletrocompetentes através de eletroporação (2,5 kV, cubeta de intervalo de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm, pulsador de gene Biorad) que resulta em um tamanho de biblioteca maior que 10^7 clones independentes. Após uma hora de expressão de fenótipo, foram selecionados os transformantes positivos para resistência à
10 carbenicilina codificados através do vetor pComb3H5BHis em 100 ml de caldo de cultura (SB) super líquido da noite para o dia. As células foram, então, coletadas através de centrifugação e a preparação de plasmídeo foi executada com o uso de um kit de preparação de plasmídeo comercialmente disponível (Qiagen).

2800 ng deste DNA de plasmídeo que contém a biblioteca de VK
15 (digerido por XhoI-BstEII; grande fragmento) foram ligados a 900 ng dos fragmentos de V de cadeia pesada (digerido por XhoI-BstEII) e novamente transformados em duas alíquotas de 300 µl de células de *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes através de eletroporação (2,5 kV, cubeta de intervalo de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm) resultando em um tamanho de biblioteca (fragmento variável de
20 cadeia única) de scFv de VH-VK total maior que 10^7 de clones independentes.

Após expressão de fenótipo e lenta adaptação à carbenicilina, as células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo para meio de seleção de SB-Carbenicilina (50 µg/mL). As células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo foram, então, infectadas com uma dose infecciosa de 10^{12} partículas de
25 fago ajudante VCSM13 resultando na produção e secreção de fago M13 filamentoso, sendo que a partícula de fago contém pComb3H5BHis-DNA de filamento único que codifica um fragmento de scFv murino e exibiu a proteína de revestimento de fago III. Este grupo de fagos exibindo a biblioteca de anticorpo foi usado
30 posteriormente para a seleção de entidades de aglutinação de antígeno.

2.3. Exibição de fato com base na seleção de aglutinadores de CD3 específico

A biblioteca de fago que transporta o repertório de scFv clonado foi coletada do sobrenadante de cultura respectiva através de centrifugação e precipitação de PEG8000/NaCl. Aproximadamente, 10^{11} a 10^{12} partículas de fago de scFv foram resuspendidas em 0,4 ml de PBS/0,1% de BSA e incubadas em 10^5 a 10^7 células Jurkat (uma linha de célula T humana positiva para CD3) por 1 hora em gelo sob lenta agitação. These Jurkat células foram cultivadas de antemão em meio de RPMI enriquecido com soro fetal de bezerro (10 %), glutamina e penicilina/estreptomicina, coletadas através de centrifugação, lavadas em PBS e resuspendidas em PBS/1 % de FCS (contendo Ázido de Na). O fago de scFv que não se aglutina especificamente às células Jurkat foram eliminados por até cinco etapas de lavagem com PBS/1 % de FCS (contendo Azido de Na). Após lavagem, as entidades de aglutinação foram eluídas das células ao resuspender as células em HCl-glicina pH 2,2 (10 minutos de incubação com vortexação subsequente) e após neutralização com 2 M Tris pH 12, o eluato foi usado para infecção de uma cultura de E. coli XL1 Blue não infectada fresca ($OD_{600} > 0.5$). A cultura de E. coli que contém células de E. coli transduziu com sucesso com uma cópia de fagomídeo, codificando um fragmento de scFv humano, foi novamente selecionada para resistência à carbenicilina e, subsequentemente, infectada com fago ajudante de VCMS 13 para iniciar o segundo turno de exibição de anticorpo e seleção in vitro. Um total de 4 a 5 turnos de seleções foi executado, normalmente.

2.4. Varredura para aglutinadores de CD3 específico

O DNA de plasmídeo que corresponde a 4 e 5 turnos de panning foi isolado das culturas de E. coli após seleção. Para a produção de proteína de scFv solúvel, os fragmentos de DNA VH e VL foram excisados dos plasmídeos (XhoI-SpeI). Estes fragmentos foram clonados através dos mesmos sítios de restrição no plasmídeo pComb3H5BFlag/His que difere do original pComb3H5BHis em que o constructo de expressão (por exemplo, scFv) inclui um Flag-tag (TGD YKDDDDK) entre o scFv e o His6-tag e as proteínas de fago adicionais foram deletadas. Após

ligação, cada grupo (diferentes turnos de panning) de DNA de plasmídeo foi transformado em 100 µl de *E. coli* TG1 ou XLI blue competente por choque térmico e plaqueado sobre carbenicilina LB-agar. As únicas colônias foram escolhidas em 100 µl de LB carb (50 µg/ml).

5 *E. coli* transformada com pComb3H5BHis que contém um segmento de VL e VH produz scFv solúvel em quantidade suficiente após excisão do fragmento II de gene e indução com 1 mM de IPTG. Devido a uma sequência de sinal adequada, a cadeia de scFv foi exportada para o periplasma onde se incorpora a uma conformação funcional.

10 As únicas colônias bacterianas de *E. coli* TG1 das placas de transformação foram escolhidas para preparações periplásmicas de pequena escala e cultivadas em meio de SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20 mM de MgCl₂ e 50 µg/ml de carbenicilina (e re-dissolvidas em PBS (por exemplo, 1 ml) após coleta. Por quatro turnos de congelamento a -70°C e descongelamento a 15 37°C, a membrana externa da bateria foi destruída por choque de temperatura e as proteínas periplásmica solúveis, incluindo os scFvs, foram liberadas no sobrenadante. Após eliminação de células intactas e detritos de célula através de centrifugação, o sobrenadante que contém scFvs-CD3 anti-humano humano foi coletado e usado para exame posterior.

20 **2.5. Identificação de aglutinadores de CD3 específico**

A aglutinação dos scFvs isolados foi testada através de citometria de fluxo em células eucarióticas que, em sua superfície, expressam uma proteína heteróloga que exhibe, em seu terminal N, os primeiros 27 aminoácidos de terminal N de épsilon de CD3.

25 Conforme descrito no Exemplo 4, os primeiros aminoácidos 1-27 da sequência de terminal N da cadeia de épsilon de CD3 madura do complexo de receptor de célula T humana (sequência de aminoácido: QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT SEQ ID N°: 2) foram fundidos com o terminal N da proteína de transmembrana EpCAM de modo que o terminal N fosse 30 colocado na superfície celular externa. Adicionalmente, um epítipo de FLAG foi

inserido entre a sequência de épsilon de CD3 de 1-27 de terminal N e a sequência EpCAM. Este produto de fusão foi expresso em células de ovário de hamster chinês (CHO) e de rim embrionárias humanas (HEK).

As células eucarióticas que exibem os 27 aminoácidos mais próximos
 5 ao terminal N de épsilon de CD3 maduro de outra espécie de primata foram preparadas da mesma maneira para *Saimiri ciureus* (macaco-de-cheiro) (sequência de aminoácido de terminal N de épsilon de CD3: QDGNEEIGD TTQNPYKVSISGTTVT LT SEQ ID N°: 8), para *Callithrix jacchus* (sequência de aminoácido de terminal N de épsilon de CD3:
 10 QDGNEEMGD TTQNPYKVSISGTTVT LT SEQ ID N°: 4) e para *Saguinus oedipus* (sequência de aminoácido de terminal N de épsilon de CD3: QDGNEEMGD TTQNPYKVSISGTTVT LT SEQ ID N°: 6).

Para citometria de fluxo a $2,5 \times 10^5$, as células são incubadas com 50 μ l de sobrenadante ou com 5 μ g/ml dos construtos purificados em 50 μ l de PBS
 15 com 2% de FCS. A aglutinação dos construtos foi detectada com o anticorpo anti-His (Anticorpo Penta-His, livre de BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 μ g/ml em 50 μ l de PBS com 2% de FCS. Como um reagente de segunda etapa, um fragmento de F(ab')₂ purificado de afinidade conjugado por R-Ficoeritrina, IgG de anti-camundongo de cabra (fragmento de Fc-gammao específico), diluído 1:100 em
 20 50 μ l de PBS com 2% de FCS (Dianova, Hamburg, FRG) foi usado. As amostras foram medidas em um FACSScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

A aglutinação sempre foi confirmada através de citometria de fluxo conforme descrito no parágrafo antecedente em células T primárias de ser humano e de diferentes primatas (por exemplo, *saimiris ciureus*, *callithrix jacchus*, *saguinus*
 25 *oedipus*).

2.6. Geração de equivalentes humano/humanizados de scFvs específicos de épsilon de CD3 não-humano

A região de VH do scFvs de CD3 anti-murino foi alinhado contra sequência de aminoácidos de linha germinativa de anticorpo humano. A sequência
 30 de VH de linha germinativa de anticorpo humano foi escolhida que tem a

homologia mais próxima ao VH de não-humano e um alinhamento direto das duas sequências de aminoácido foi realizado. Houve inúmeros resíduos de estrutura do VH não-humano que difere das regiões de estrutura de VH humano ("posições de estrutura diferente"). Alguns destes resíduos podem contribuir para a aglutinação e atividade do anticorpo para seu alvo.

Para construir uma biblioteca que contém os CDRs murino e em todas as posições de estrutura que diferem da sequência de VH humano escolhida, ambas as possibilidades (o resíduo de aminoácido murino maternal e o humano), foram sintetizados os oligonucleotídeos degenerados. Estes oligonucleotídeos incorporam, nas diferentes posições, o resíduo humano com uma probabilidade de 75 % e o resíduo murino com uma probabilidade de 25 %. Para um VH humano, por exemplo, seis dentre estes oligonucleotídeos devem ser sintetizados para que cubra que se sobrepõem em um trecho terminal de aproximadamente 20 nucleotídeos. Para esta finalidade, todo segundo iniciador foi um iniciador antisense. Os sítios de restrição necessários para clonagem posterior nos oligonucleotídeos foram deletados.

Estes iniciadores podem ter o comprimento de 60 a 90 nucleotídeos, dependendo do número de iniciadores que foram necessários para transpor toda a sequência V.

Por exemplo, estes seis iniciadores foram misturados em quantidade igual (por exemplo, 1 µl de cada iniciador (iniciador armazenado de 20 a 100 µM) a 20 µl de reação de PCR) e adicionados a um misturador de PCR que consiste em tampão de PCR, nucleotídeos e polimerase Taq. Esta mistura foi incubada a 94 °C por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um cicladador de PCR. Subsequentemente, o produto foi passado em uma eletroforese de gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 isolado do gel de acordo com o método padrão.

O produto de PCR foi, então usado como um modelo para uma reação padrão de PCR com o uso de iniciadores que incorporam sítio de restrição

de clonagem adequada de C terminal e terminal N. O fragmento de DNA do tamanho correto (para um VH, aproximadamente 350 nucleotídeos) foi isolado através de eletroforese de gel de agarose de acordo com o método padrão. Desta maneira, fragmento de DNA de VH suficiente foi amplificado. Este fragmento de

5 CH era um grupo de fragmentos de VH que teve, cada um, uma quantidade diferente de resíduos de murina e humanos nas posições de estrutura diferentes respectivas (grupo de VH humanizado). O mesmo procedimento foi realizado para a região de VL dos scFvs de CD3 anti-murino (grupo de VL humanizado).

O grupo de VH humanizado foi, então, combinado com o grupo de VL

10 humanizado no vetor de exibição de fago pComb3H5Bhis para formar uma biblioteca de scFvs funcionais a partir da qual – após exibição em fagos filamentosos – foram selecionados aglutinadores anti-CD3, varridos, identificados e confirmados conforme descrito acima para o scFv anti-CD3 não-humano (murino) parental. Os únicos clones foram, então, analisados para propriedades favoráveis e

15 sequência de aminoácido. Estes scFvs que estiveram mais próximos na homologia de sequência de aminoácido aos segmentos V da linha germinativa humana são preferenciais, particularmente aqueles em que ao menos um CDR dentre CDR I e II de VH e CDR I e II de VLkappa ou CDR I e II de VLambda mostre mais de 80% de identidade de sequência de aminoácido em relação ao CDR respectivo mais

20 próximo de todos os segmentos V da linha germinativa humana. Os scFvs anti-CD3 foram convertidos em anticorpos de cadeia única biespecífica recombinante conforme descritos nos seguintes Exemplos 9, 16, e 24.

3. Geração de uma proteína de fusão recombinante dos aminoácidos de 1-27 de terminal N da cadeia de épsilon de CD3 humano

25 **fundido com a parte Fc de um IgG1 (1-27 CD3-Fc).**

3.1. Clonagem e expressão de 1-27 CD3-Fc

A sequência de codificação dos aminoácidos de terminal N de 1-27 da cadeia de épsilon de CD3 humano fundido a uma região de junta e gamma de Fc de imunoglobulina humana IgG1 bem como 6 Histidina Tag foi obtida através de

30 síntese de gene de acordo com o protocolo padrão (a sequência de cDNA e a

sequência de aminoácido da proteína de fusão recombinante estão listadas sob SEQ ID N°s 230 e 229). O fragmento de síntese de gene foi projetado para conter, primeiramente, um sítio de Kozak para expressão eucariótica do constructo, seguido por um peptídeo líder de imoglobulina de 19 aminoácidos, seguido na

5 estrutura pela sequência de codificação dos primeiros 27 aminoácidos da porção extracelular cadeia de épsilon de CD3 humano maduro, seguido na estrutura pela sequência de codificação da região de junta e da porção gamma de Fc de IgG1 humano, seguido na estrutura pela sequência de codificação de um 6 Histidina tag e de um códon de terminação (Figura 1). O fragmento de síntese de gene também

10 foi projetado para introduzir sítios de restrição no início e no final do cDNA que codifica a proteína de fusão. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3', são utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento de síntese de gene foi clonado através de EcoRI e Sall em plasmídeo projetado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Mack et al. Proc.

15 Natl. Acad. Sci. EUA 92 (1995) 7021 a 7025 e Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo o protocolo padrão. Um plasmídeo verificado de sequência foi usado para transfecção no Sistema de Expressão FreeStyle 293 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Após 3 dias, os sobrenadantes de cultura celular dos tensoativos

20 foram coletados e testados para a presença do constructo recombinante em um ensaio ELISA. O anticorpo específico de fragmento de Fc-gamma de IgC anti-humano de cabra (obtido junto à Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido) foi diluído em PBS a 5 µg/ml e revestido com 100 µl por cavidade sobre uma placa ELISA de 96 cavidades MaxiSorp (Nunc

25 GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Alemanha) de um dia para o outro a 4 °C. As cavidades foram lavadas com PBS com 0,05 % de Tween 20 (PBS/Tween e bloqueadas com 3 % de BSA em PBS (Albumina bovina, fração V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) por 60 minutos a temperatura ambiente (RT). Subsequentemente, as cavidades foram novamente lavadas com

30 PBS/Tween e, então, incubadas com sobrenadantes de cultura celular por 60

minutos a RT. Após a lavagem, os poços foram incubados com um anticorpo anti-His6 conjugado de peroxidase (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) diluídos a uma fração de 1:500 em PBS com 1 % de BSA por 60 minutos a RT. Subsequentemente, as cavidades foram lavadas com 200 µl
5 PBS/Tween e 100 µl de solução de substrato SIGMAFAST OPD (SIGMAFAST OPD [dihidrocloreto de o-fenilenodiamina] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) foram adicionados de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi interrompida através da adição de 100 µl 1 M H₂SO₄. A reação de coloração foi medida em um espectômetro de microplaca PowerWaveX
10 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA) a 490 nm e subtração de absorção de fundo a 620 nm. Conforme mostrado na Figura 2, a presença do constructo conforme comparado ao sobrenadante irrelevante de células HEK 293 transfectadas por simulação usadas como controle negativo foi claramente detectável.

15 **3.2. Ensaio de aglutinação de anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas a 1-27 CD3-Fc.**

A aglutinação de preparações em bruto de anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas periplasmaticamente expressados específicos para épsilon de CD3 a 1-27 CD3-Fc foi testada em um ensaio ELISA. O anticorpo
20 específico de fragmento de Fc-gamma de IgC anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido) foi diluído em PBS a 5 µg/ml e revestido com 100 µl por cavidade sobre uma placa ELISA de 96 cavidades MaxiSorp 96-well Placa ELISA (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Alemanha) de um dia para o outro a 4 °C. As cavidades foram lavadas com PBS
25 com 0,05 % de Tween 20 (PBS/Tween e bloqueadas com PBS com 3 % de BSA (Albumina bovina, fração V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) por 60 minutos a RT. Subsequentemente, as cavidades foram lavadas com PBS/Tween e incubadas com os sobrenadantes de células que expressam o constructo 1-27 CD3-Fc por 60 minutos a RT. As cavidades foram lavadas com
30 PBS/Tween e incubadas com preparações em bruto de anticorpos de cadeia única

específica de espécies cruzadas periplasmaticamente expressados conforme descrito acima por 60 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS/Tween, as cavidades foram incubadas com anticorpo anti-Flag M2 conjugado de peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) diluídas a uma fração de 1:10000 em PBS com 1 % de BSA por 60 minutos a RT. As cavidades foram lavadas com PBS/Tween e incubadas com 100 µl da solução de substrato SIGMAFAST OPD (OPD [dihidrochoreto de o-fenilenodiamina] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de coloração foi interrompida com 100 µl 1 M H₂SO₄ e medida em um espectômetro de microplaca PowerWaveX (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA) a 490 nm e subtração de absorção de fundo a 620 nm. A aglutinação forte de anticorpos cadeia única humanos específicos de espécies cruzadas específicos para épsilon de CD3 ao constructo 1-27 CD3-Fc comparados a um anticorpo de cadeia única de anti-CD3 murino foi observado (Figura 3).

4. Geração de proteínas de fusão de transmembrana recombinante dos aminoácidos de 1-27 de terminal N de épsilon de CD3 de primatas não pertencentes ao gênero chimpamzee diferentes fundidos ao EpCAM de macaco cinomolgo (1-27 CD3-EpCAM).

4.1. Clonagem e expressão de 1-27 CD3-EpCAM

O épsilon de CD3 foi isolado de primatas não pertencentes ao gênero chimpamzee diferentes (marmoset, sagui, macaco-de-cheiro) e suíno. As sequências de codificação dos aminoácidos de terminal N de 1-27 de cadeia de épsilon de CD3 do humano maduro, marmoset comum (*Callithrix jacchus*), sagui do tipo cottontop (*Saguinus oedipus*), macaco-de-cheiro comum (*Saimiri sciureus*) e suíno doméstico (*Sus scrofa*; usado como controle negativo) fundido ao terminal N de EpCAM de cinomolgo marcado por Flag tag foram obtidos através de síntese de gene de acordo com os protocolos padrões. A sequência de cDNA e a sequência de aminoácido da proteínas de fusão recombinante são listadas sob SEQ ID N°s 231 a 240). Os fragmentos de síntese de gene foram projetados para conter, primeiramente, um sítio BsrGI a fim de permitir fusão na estrutura de leitura

correta com a sequência de codificação de um peptídeo líder de imoglobulina de 19 aminoácidos já presente no vetor de expressão alvo, que é seguido na estrutura pela sequência de codificação do terminal N de 1-27 de aminoácidos da porção extracelular das cadeias de épsilon de CD3 maduras, que é seguido na estrutura

5 pela sequência de codificação de um Flag tag e seguido na estrutura pela sequência de codificação da da proteína de transmembrana de EpCAM de cinomolgo maduro (Figura 4). Os fragmentos de síntese de gene também foram projetados para introduzir um sítio de restrição na terminação do cDNA que codifica para a proteína de fusão. Os sítios de restrição BsrGI introduzidos na

10 terminação 5' e Sall na terminação 3', foram utilizados no seguintes procedimentos de clonagem. Os fragmentos de síntese de gene foram, então, clonados através de BsrGI e Sall em um derivativo do plasmídeo designado pEF DHFR (pEF-DHFR é descrito em Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 92 (1995) 7021 a 7025), que já continha a sequência de codificação do peptídeo líder de imoglobulina de 19

15 aminoácidos seguindo protocolo padrão. Os plasmídeos sverificado de sequência foram usados para células 293-HEK transitoriamente transfectadas com o uso do Reagente the MATra-A (IBA GmbH, Göttingen, Alemanha) e 12 µg de DNA de plasmídeo para células 293-HEK aderentes em frascos de cultura células de 175 ml de acordo com o protocolo do fabricante. Após 3 dias de cultura celular, os

20 tensoativos foram testados para expressão de superfície celular da proteína de transmembrana recombinante através de um ensaio FACS de acordo com os protocolos padrões. Para este propósito, um número de $2,5 \times 10^5$ células foram incuadas com o anticorpo de M2 anti-Flag (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) a 5 µg/ml em PBS com 2% de FCS. O anticorpo

25 aglutinado foi detectado com um fragmento de F(ab')₂ purificado de afinidade conjugado por R-Ficoeritrina, IgG anti-camundongo de cabra, fragmento Fc-gamma específico 1:100 em PBS com 2% FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha). As expressão das proteínas

30 de fusão de transmembrana recombinante marcadas por flag tag que consiste em

EpCAM de cinomolgo e os aminoácidos de terminal N de 1-27 de cadeia de épsilon de CD3 humano, marmoset, sagui, macaco-de-cheiro e suíno, respectivamente, em células transfectadas foi claramente detectável (Figura 5).

4.2. Aglutinação de anticorpos de cadeia única anti-CD3 específicos de espécies cruzadas ao 1-27 CD3-EpCAM

A aglutinação de preparações em bruto de anticorpos de cadeia única anti-CD3 específico de espécies cruzadas periplasmaticamente expressados aos aminoácidos de terminal N de 1-27 das cadeias de épsilon de CD3 humano, marmoset, sagui e macaco-de-cheiro, respectivamente, fundido ao Ep-CAM de cinomolgo foi testada em um ensaio FACS de acordo com os protocolos padrões. Para este propósito, um número de $2,5 \times 10^5$ células foram incubadas com preparações em bruto de anticorpos de cadeia única anti-CD3 específico de espécies cruzadas periplasmaticamente expressados (a preparação foi realizada conforme descrito acima e de acordo com os protocolos padrões) e um anticorpo CD3 anti-humano murino de cadeia única como controle negativo. Como anticorpo secundário, o anticorpo Penta-His (Qiagen GmbH, Hildesheim, Alemanha) foi usado a 5 µg/ml em 50 µl PBS com 2% de FCS. A aglutinação do anticorpo foi detectada com um fragmento de F(ab') purificado de afinidade conjugado por R-Ficoeritrina, IgC anti-camundongo de cabra, fragmento de Fc-gamma específico, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha). Conforme mostrado na Figuras 6 (A a E), a aglutinação de anticorpos de cadeia única aos tensoativos que expressam as proteínas de fusão de transmembrana recombinante que consiste nos aminoácidos de terminal N de 1-27 de épsilon de CD3 humano, marmoset, sagui ou macaco-de-cheiro fundido ao EpCAM de cinomolgo foi observada. Nenhuma aglutinação de anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas foi observada para uma proteína de fusão que consiste no 1-27 N-terminal épsilon de CD3 de suíno fundido ao EpCAM de cinomolgo usado como controle negativo. Foi mostrada a especificidade de espécies cruzadas de multi-primata dos anticorpos de cadeia

única de anti-CD3. Os sinais obtidos com o anticorpo de M2 anti-Flag e os anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas foram comparáveis, indicando uma forte atividade de aglutinação dos anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas aos aminoácidos de 1-27 de terminal N de épsilon de CD3.

5. Análise de aglutinação de anticorpos de cadeia única anti-CD3 específicos de espécies cruzadas por varredura de alanina de células transfectadas de camundongos com a cadeia de épsilon de CD3 humano e seus mutantes de alanina

5.1. Clonagem e expressão de épsilon de CD3 de tipo selvagem humano

A sequência de codificação da cadeia de épsilon de CD3 humano foi obtida através de síntese de gene de acordo com os protocolos padrões (a sequência de cDNA e a sequência de aminoácido da cadeia de épsilon de CD3 humano são listadas sob SEQ ID N°s 242 e 241). O fragmento de síntese de gene foi projetado para conter um sítio de Kozak para expressão eucariótica do constructo e sítios de restrição no início e na terminação do cDNA que codifica para épsilon de CD3 humano. Os sítios de restrição EcoRI introduzidos na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento de síntese de gene foi, então, clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF NEO seguindo protocolo padrão. pEF NEO foi derivado de pEF DHFR (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 92 (1995) 7021 a 7025) ao substituir o cDNA do DHFR com o cDNA da resistência a neomicina através de clonagem molecular convencional. Um plasmídeo verificado de sequência foi usado para transfectar a linha de célula T EL4 murino (ATCC N° TIB-39) cultivado em RPMI com L-glutamina estabilizada suplementada com 10 % de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de HEPES, 1% de piruvato, 1% de aminoácidos não-essenciais (all Biochrom AG Berlin, Alemanha) a 37 C, 95 % de unidade e 7 % de CO₂. A transfecção foi realizada com o Reagente de Transfecção SuperFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e 2 µg

de DNA de plasmídeo de acordo com o protocolo do fabricante. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e novamente cultivadas no meio de cultura celular mencionado acima com 600 µg/ml de G418 para seleção (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Áustria). De 16 a 20 dias após transfecção, o crescimento de células resistente foi observado. Após 7 a 14 dias adicionais, as células foram testadas para expressão de épsilon de CD3 humano através de análise FACS de acordo com os protocolos padrões. $2,5 \times 10^5$ células foram incubadas com anticorpo CD3 anti-humano UCHT-1 (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha) a 5 µg/ml em PBS com 2% de FCS. A aglutinação do anticorpo foi detectada com um fragmento de F(ab') purificado de afinidade conjugado por R-Ficoeritrina, IgC anti-camundongo de cabra, fragmento de Fc-gamma específico, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACSCalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha). A expressão de CD3 do tipo selvagem humano em células EL4 transfectadas é mostrada na Figura 7.

5.2. Clonagem e expressão dos anticorpos de cadeia única anti-CD3 específicos de espécies cruzadas como anticorpos de IgG1

A fim de fornecer meios aprimorados de detecção de aglutinação dos anticorpos de anti-CD3 de cadeia única específica de espécies cruzadas H2C HLP, A2J HLP e E2M HLP foram convertidos em anticorpos de IgG1 com IgG1 murino e regiões constantes de lambda humano. As sequências de cDNA que codificam ára as cadeias leve e pesada de anticorpos de IgG respectivos foram obtidas através de síntese de gene de acordo com os protocolos padrões. Os fragmentos de síntese de gene para cada especificidade foram projetados para conter, primeiramente, um sítio de Kozak para permitir expressão eucariótica do constructo, que é seguido por um peptídeo líder de imoglobulina de 19 aminoácidos (SEQ ID N°s 244 e 243), que é seguido na estrutura pela sequência de codificação da respective região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia leve respectiva, seguido na estrutura pela sequência de codificação of the região constante de cadeia pesada de IgG1 murino (SEQ ID N°s 246 e 245) ou

a sequência de codificação da região constante de cadeia leve lambda humano (SEQ ID N° 248 e 247), respectivamente. Os sítios de restrição foram introduzidos no início e na terminação do cDNA que codifica para a proteína de fusão. Os sítios de restrição EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3' foram usados para os
5 seguintes procedimentos de clonagem. Os fragmentos de síntese de gene foram clonados através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF DHFR (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 92 (1995) 7021 a 7025) para os construtos de cadeia pesada e pEF ADA (pEF ADA está descrito em Raum et al., Cancer Immunol Immunother., 50(3), (2001), 141 a 50) para os construtos de cadeia leve)
10 de acordo com os protocolos padrões. Os plasmídeos verificados de sequência foram usados para co-transfecção de construtos de cadeia pesada e leve respectivos no Sistema de Expressão FreeStyle 293 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Após 3 dias, os sobrenadantes de cultura celular dos tensoativos foram coletados e usados para o
15 experimento de varredura de alanina.

5.3. Clonagem e expressão de mutantes de alanina de épsilon de CD3 humano para varredura de alanina

Foram obtidos 27 fragmentos de cDNA que codifica para a cadeia de épsilon de CD3 humano com uma troca de um códon da sequência do tipo
20 selvagem de épsilon de CD3 humano em um códon que codifica para alanina (GCC) para cada aminoácido de 1-27 aminoácidos do domínio extracelular da cadeia de épsilon de CD3 humano maduro, respectivamente, através de síntese de gene. Exceto pelo códon trocado, os fragmentos de cDNA foram idênticos ao fragmentos de cDNA de CD3 de tipo selvagem humano mencionados acima.
25 Apenas um códon foi substituído em cada constructo comparado aos fragmentos de cDNA de CD3 de tipo selvagem humano descritos acima. Os sítios de restrição EcoRI e Sall foram introduzidos no fragmentos de cDNA em posições idênticas compradas ao constructo de tipo selvagem. Todos os construtos de varredura de alanina foram clonados em pEF NEO e os plasmídeos verificados de sequência
30 foram transfectados nas células EL4. A transfecção e seleção de tensoativos foram

realizadas conforme descrito acima. Como resultado, um painel de construtos expressados foi obtido no qual o primeiro aminoácido da cadeia de épsilon de CD3 humano, a glutamina (Q, Gln) na posição 1 foi substituída por alanina. O último aminoácido substituído por alanina foi o treonina (T, Thr) na posição 27 de épsilon de CD3 de tipo selvagem humano maduro. Para cada aminoácido entre glutamina 1 e treonina, foram gerados 27 tensoativos respectivos com uma troca do aminoácido do tipo selvagem em alanina.

5.4. Experimento de varredura de alanina

Os anticorpos de IgG quiméricos, conforme descrito em 5.2, e os anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas específicos para épsilon de CD3 foram testados em experimento de varredura de alanina. A aglutinação dos anticorpos às linhas de célula EL4 transfectadas com os construtos de alanina mutante de épsilon de CD3 humano, conforme descrito em 5.3, foi testada por ensaio FACS de acordo com os protocolos padrões. As $2,5 \times 10^5$ células dos tensoativos respectivos foram incubadas com 50 µl de sobrenadante de cultura celular que contém os anticorpos de IgG quiméricos ou com 50 µl de preparações em bruto de anticorpos de cadeia única periplasmaticamente expressados. Para amostras incubadas com preparações em bruto de anticorpos de cadeia única periplasmaticamente expressados, o anticorpo de M2 anti-Flag (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) foi usado como anticorpo secundário a 5 µg/ml em 50 µl PBS com 2% de FCS. Para amostras incubadas com os anticorpos de IgG quiméricos, não foi necessário um anticorpo secundário. Para todas as amostras, a aglutinação das moléculas de anticorpo foi detectada com um fragmento de F(ab') purificado de afinidade conjugado por R-Ficoeritrina, IgC anti-camundongo de cabra, fragmento de Fc-gamma específico, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACSCalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha). A aglutinação diferencial de moléculas de IgG quiméricas ou anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas à linhas de célula EL4 transfectadas com o mutantes de alanina de épsilon de CD3 humano

foi detectada. Como controle negativo, foi usado ou um controle de isótopo ou uma preparação em bruto de um anticorpo de cadeia única periplasmaticamente expressado de especificidade irrelevante, respectivamente. O anticorpo UCHT-1 foi usado como controle positivo para o nível de expressão dos mutantes de alanina de épsilon de CD3 humano. As linhas de célula EL4 transfectadas com os mutantes de alanina para os aminoácidos tirosina na posição 15, valina na posição 17, isoleucina na posição 19, valina na posição 24 ou leucina na posição 26 da cadeia de épsilon de CD3 maduro foram avaliadas devido aos níveis de expressão muito baixos (dados não mostrados). A aglutinação dos anticorpos de cadeia única específica de espécies cruzadas e dos anticorpos de cadeia única formato de IgG quimérico às linhas de célula EL4 transfectadas com os mutantes de alanina de épsilon de CD3 humano é mostrada na Figura 8 (A-D) como aglutinação relativa em unidades arbitrárias com os valores de fluorescência do meio geométrico dos controles negativos respectivos subtraídos de todos os valores de amostra de fluorescência de meio geométrico respectivo. Para compensar os níveis de expressão, todos os valores de amostra para um determinado transfectante foram, então, divididos através do valor de fluorescência de meio geométrico do anticorpo UCHT-1 para o transfectante respectivo. Para comparação ao valor de amostra de tipo selvagem de uma especificidade, todos os valores de amostra da especificidade respectiva foram finalmente divididos através do valor de amostra de tipo selvagem, configurando assim o valor de amostra de tipo selvagem para 1 unidade arbitrária de aglutinação.

Os cálculos usados são mostrados em detalhes na seguinte fórmula:

$$Amostra\_valor(x,y) = \frac{Amostra(x,y) - neg\_Contr.(x)}{(UCHT-1(x) - neg\_Contr.(x)) * \frac{WT(y) - neg\_Contr.(wt)}{UCHT-1(wt) - neg\_Contr.(wt)}}$$

Nesta equação, *Amostra_valor* significa o valor em unidades arbitrárias de aglutinação que relata o grau de aglutinação de um anticorpo anti-CD3 específico a um mutante de alanina específico conforme mostrado na Figura 8

(A-D), *Amostra* significa o valor de fluorescência de meio geométrico obtido para um anticorpo anti-CD3 específico analisado em um transfectante de varredura de alanina específico, *neg_Contr.* significa o valor de fluorescência de meio geométrico obtido para o controle negativo analisado em um mutante de alanina específico, *UCHT-1* significa o valor de fluorescência de meio geométrico obtido para o anticorpo UCHT-1 analisado em um mutante de alanina específico, *WT* significa o valor de fluorescência de meio geométrico obtained para um anticorpo anti-CD3 específico analisado no transfectante de tipo selvagem, *x* especifica o transfectante respectivo, *y* especifica o anticorpo anti-CD3 respectivo e *wt* especifica que o transfectante respectivo é do tipo selvagem.

Conforme pode ser visto na Figura 8 (A-D), o anticorpo de IgG A2J HLP mostrou uma perda pronunciada de aglutinação para os aminoácidos asparagina na posição 4, treonina na posição 23 e isoleucina na posição 25 da cadeia de épsilon de CD3 maduro. Uma perda completa de aglutinação de anticorpo de IgG A2J HLP foi observada para os aminoácidos glutamina na posição 1, aspartato na posição 2, glicina na posição 3 e glutamato na posição 5 da cadeia de épsilon de CD3 maduro. O anticorpo de IgG E2M HLP mostrou uma perda pronunciada de aglutinação para os aminoácidos asparagina na posição 4, treonina na posição 23 e isoleucina na posição 25 da cadeia de épsilon de CD3 maduro. O anticorpo de IgG E2M HLP mostrou uma perda completa de aglutinação para os aminoácidos glutamina na posição 1, aspartato na posição 2, glicina na posição 3 e glutamato na posição 5 da cadeia de épsilon de CD3 maduro. O anticorpo de IgG H2C HLP mostrou uma perda intermediária de aglutinação para os aminoácido asparagina na posição 4 da cadeia de épsilon de CD3 maduro e mostrou uma perda completa de aglutinação para os aminoácidos glutamina na posição 1, aspartato na posição 2, glicina na posição 3 e glutamato na posição 5 da cadeia de épsilon de CD3 maduro. O anticorpo de cadeia única F12Q HLP mostrou uma perda essencialmente completa de aglutinação para os aminoácidos glutamina na posição 1, aspartato na posição 2, glicina na posição 3 da cadeia de épsilon de CD3 maduro e glutamato na posição 5 da cadeia de épsilon de CD3

maduro.

6. Análise de aglutinação da molécula de aglutinação de anti-CD3 específico de espécies cruzadas H2C HLP à cadeia de épsilon de CD3 humano com e sem tag His6 de terminal N transfectado para a linha de célula

5 T EL4 murino

6.1. Clonagem e expressão da cadeia de épsilon de CD3 humano com seis histidina tag de N terminal (His6 tag)

Um fragmento de cDNA que codifica para a cadeia de épsilon de CD3 humano com um tag His6 de terminal N foi obtido através de síntese de gene. O
 10 fragmento de síntese de gene foi designado para conter, primeiramente, um sítio de Kozak para expressão eucariótica do constructo, que é seguido na estrutura pela sequência de codificação de um peptídeo líder de imoglobulina de 19 aminoácidos, que é seguido na estrutura pela sequência de codificação of a His6 tag que é seguido na estrutura pela sequência de codificação da cadeia de épsilon
 15 de CD3 humano maduro (as sequência de aminoácidos do constructo e de cDNA são listadas como SEQ ID N^{os} 256 e 255). O fragmento de síntese de gene também foi designado para conter sítios de restrição no início e na terminação do cDNA. Os sítios de restrição EcoRI introduzidos na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram usados nos seguintes procedimentos de clonagem. O
 20 fragmento de síntese de gene foi, então, clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF-NEO (conforme descrito acima) seguindo protocolo padrão. Um plasmídeo verificado de sequência foi usado para transfectar a linha de célula T EL4 murino. A transfecção e seleção dos tensoativos foram realizadas conforme descrito acima. Após 34 dias de cultura celular, os tensoativos foram
 25 usados para o ensaio descrito abaixo.

6.2. Aglutinação da molécula de aglutinação de anti-CD3 específico de espécies cruzadas H2C HLP à cadeia de épsilon de CD3 humano com e sem tag His6 de terminal N

Um anticorpo de IgG quimérico com a especificidade de aglutinação
 30 H2C HLP específica para épsilon de CD3 foi testado para aglutinação ao épsilon

de CD3 humano com e sem tag His6 de terminal N. A aglutinação do anticorpo às linhas de célula EL4 transfectadas ap His6-épsilon de CD3 humano e épsilon de CD3 humano de tipo selvagem, respectivamente, foi testada por um ensaio FACS de acordo com os protocolos padrões. As $2,5 \times 10^5$ células dos tensoativos foram incubadas com 50 µl de sobrenadante de cultura celular que contém o anticorpo de IgG quimérico ou 50 µl dos anticorpos de controle respectivos a 5µg/ml em PBS com 2% de FCS. Como controle negativo, foi usado um controle de isótopo apropriado e como controle positivo para expressões de construtos foi usado o anticorpo específico de CD3 UCHT-1, respectivamente. A aglutinação dos anticorpos foi detectada com um fragmento de F(ab') purificado de afinidade conjugado por R-Ficoeritrina, IgC anti-camundongo de cabra, fragmento de Fc-gamma específico, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACSCalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha). Comparada à linha de célula EL4 transfectadas com épsilon de CD3 humano do tipo selvagem, uma perda clara de aglutinação do IgG quimérico com especificidade de aglutinação H2C HLP ao épsilon de CD3 humano com um tag His6 de terminal N foi detectada. Estes resultados mostraram que um N terminal livre de épsilon de CD3 é essencial para aglutinação da especificidade de aglutinação de anti-CD3 específico de espécies cruzadas à cadeia de épsilon de CD3 humano (Figura 9).

7. Clonagem e expressão do terminal C, transmembrana e domínios extracelulares truncados de MCSP humano

A sequência de codificação do terminal C, a transmembrana e o domínio extracelular truncado de MCSP humano (aminoácidos 1538 a 2322) foram obtidos através de síntese de gene de acordo com os protocolos padrão (sequência de cDNA e sequência de aminoácido do construto recombinante para expressão do terminal C, transmembrana e domínio extracelular truncado de MCSP humano (designado D3 humano) são listadas sob as SEQ ID N^{os} 250 e 249). O fragmento de síntese de gene foi projetado para conter, em primeiro lugar,

um sítio de Kozak para permitir a expressão eucariótica do construto sucedida pela sequência de codificação de um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos sucedida em estrutura por um FLAG tag, sucedida em estrutura por uma sequência que contém diversos sítios de restrição para propósitos de

5 clonagem e codificação para um ligante artificial com 9 aminoácidos (SRTRSGSQL), sucedida em estrutura pela sequência de codificação do terminal C, transmembrana e domínio extracelular truncado de MCSP humano e um códon de parada. Os sítios de restrição são introduzidos no início e no final do fragmento de DNA. Os sítios de restrição EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3'

10 foram usados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento foi digerido com EcoRI e Sall e clonado em pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021 a 7025) seguindo protocolos padrão. Um plasmídeo verificado por sequência foi usado para transfectar células CHO/dhfr (ATCC Nº CRL 9096). As células foram cultivadas em RPMI 1640 com glutamina

15 estabilizada, suplementada com 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina (todos obtidos junto à Biochrom AG Berlin, Alemanha) e nucleosídeos provenientes de uma solução de estoque de reagentes de grau de cultura celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) até uma concentração final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Deoxiadenosina e 10 µg/ml de Timidina, em uma

20 incubadora a 37°C, 95% de umidade e 7% de CO₂. A transfecção foi realizada com o uso do Reagente de Transfecção PolyFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e 5 µg de DNA de plasmídeo de acordo com o protocolo do fabricante. Após o cultivo por 24 horas, as células foram lavadas uma vez com PBS e cultivadas novamente em RPMI 1640 com glutamina estabilizada e 1% de penicilina/estreptomicina.

25 Portanto, o meio de cultura celular não continha nucleosídeos e, desse modo, a seleção foi aplicada nas células transfectadas. Aproximadamente, 14 dias após a transfecção, o crescimento de células resistentes foi observado. Após 7 a 14 dias adicionais, os tensoativos foram testados para a expressão do constructo através de análise de FACS. 2,5x10⁵ células foram incubadas com 50 µl de um anticorpo

30 anti-Flag-M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) diluído até 5

µg/ml em PBS com 2% de FCS. A aglutinação do anticorpo foi detectada com um fragmento F(ab')₂ purificado por afinidade de R-Ficoeritrina-conjugada, IgG anti-camundongo de cabra, fragmento Fc-gama específico diluído a 1:100 em PBS com 2% de FCS (ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha).

8. Clonagem e expressão do terminal C, transmembrana e domínios extracelulares truncados de MCSP de símio

A sequência de cDNA do terminal C, a transmembrana e os domínios extracelulares truncados de MCSP de símio (designados D3 de símio) foram obtidos por um conjunto de três PCRs em cDNA de pele de símio (Categoria N° C1534218-Cy-BC; BioCat GmbH, Heidelberg, Alemanha) com o uso das seguintes condições de reação: 1 ciclo a 94°C, 3 minutos, 40 ciclos com 94°C por 0,5 minuto, 52°C por 0,5 minuto e 72°C para 1,75 minuto, ciclo terminal de 72°C por 3 minutos.

Os iniciadores a seguir foram usados:

iniciador direto: 5'-GATCTGGTCTACACCATCGAGC-3' (SEQ ID N° 361)

iniciador reverso: 5'-GGAGCTGCTGCTGGCTCAGTGAGG-3' (SEQ ID N° 362)

iniciador direto: 5'- TTCCAGCTGAGCATGTCTGATGG-3' (SEQ ID N° 363)

iniciador reverso: 5'- CGATCAGCATCTGGGCCCAGG-3' (SEQ ID N° 364)

iniciador direto: 5'- GTGGAGCAGTTCACTCAGCAGGACC-3' (SEQ ID N° 365)

iniciador reverso: 5'- GCCTTCACACCCAGTACTGGCC-3' (SEQ ID N° 366)

Aqueles PCRs geraram três fragmentos sobrepostos (A: 1 a 1329, B: 1229 a 2428, C: 1782 a 2547) que foram isolados e seqüenciados de acordo com protocolos padrão com o uso dos iniciadores de PCR e, desse modo, forneceram

iniciador

tcccgtacgagatctggatcccaattggatggcggactcgctgctgttctcacacagagg-3' (SEQ ID N° 367)

direto:

5'-

iniciador reverso: 5'-agtgggtcgactcacaccagtagtgccattctaagggcaggg-3' (SEQ ID N° 368)

Os iniciadores para esse PCR são projetados para introduzir sítios de restrição no início e no final da codificação de fragmento de cDNA para o terminal C, transmembrana e domínios extracelulares truncados de MCSP de símio. Os sítios de restrição introduzidos MfeI na terminação 5' e Sall na terminação 3' foram usados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento de PCR foi, então, clonado por meio de MfeI e Sall em um plasmídeo Bluescript que contém o fragmento EcoRI/MfeI do plasmídeo pEF-DHFR supramencionado (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) através da substituição do terminal C, transmembrana e domínios extracelulares truncados de MCSP humano. O fragmento de síntese de gene continha as sequências de codificação do peptídeo líder de imunoglobulina e o Flag tag, bem como o ligante artificial (SRTRSGSQL) em estrutura para a terminação 5' da codificação de fragmento de cDNA para o terminal C, transmembrana e domínios extracelulares truncados de MCSP de símio. Esse vetor foi usado para transfectar células CHO/dhfr (ATCC N° CRL 9096). As células foram cultivadas em RPMI 1640 com glutamina estabilizada suplementada com 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina (todos disponíveis juntos à Biochrom AG Berlin, Alemanha) e nucleosídeos provenientes de uma solução de estoque de reagentes

de grau de cultura celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) até uma concentração final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Deoxiadenosina e 10 µg/ml de Timidina, em uma incubadora a 37 C, 95% de umidade e 7% de CO₂. A transfecção foi realizada com Reagente de Transfecção PolyFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e 5 µg de DNA de plasmídeo, de acordo com o protocolo do fabricante. Após o cultivo por 24 horas, as células foram lavadas uma vez com PBS e cultivadas novamente em RPMI 1640 com glutamina estabilizada e 1% de penicilina/estreptomicina. Portanto, o meio de cultura celular não continha nucleosídeos e, portanto, a seleção foi aplicada nas células transfectadas. Aproximadamente 14 dias após a transfecção, o crescimento de células resistentes é observado. Após 7 a 14 dias adicionais, os tensoativos foram testados para expressão do constructo recombinante por meio de FACS. 2,5x10⁵ células foram incubadas com 50 µl de um anticorpo anti-Flag-M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) diluído até 5 µg/ml em PBS com 2% de FCS. Um anticorpo de ligação foi detectado com um fragmento F(ab')₂ purificado por afinidade de R-Ficoeritrina-conjugada, IgG anti-camundongo de cabra, fragmento Fc-gama específico, diluído a 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). As amostras foram medidas em um FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemanha).

20

9. Geração e caracterização de MCSP e molécula de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas de CD3

As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, sendo que cada uma compreende um espécies cruzadas de domínio de aglutinação específicas para épsilon de CD3 humano e de primata não pertencente ao gênero Chimpanzee, bem como espécies cruzadas de domínio de aglutinação específicas para MCSP humano e de primata não pertencendo ao gênero Chimpanzee, são designadas conforme estabelecido na Tabela 1 a seguir:

30

Tabela 1: Formatos de MCSP e CD3 anticorpos biespecíficos de

cadeia única específicos de espécies cruzadas de MCSP e CD3

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
190/189	MCSP-G4 HL x H2C HL
192/191	MCSP-G4 HL x F12Q HL
194/193	MCSP-G4 HL x I2C HL
196/195	MCSP-G4 HLP x F6A HLP
198/197	MCSP-G4 HLP x H2C HLP
202/201	MCSP-G4 HLP x G4H HLP
206/205	MCSP-G4 HLP x E1L HLP
208/207	MCSP-G4 HLP x E2M HLP
212/211	MCSP-G4 HLP x F12Q HL
214/213	MCSP-G4 HLP x I2C HL
216/215	MCSP-D2 HL x H2C HL
218/217	MCSP-D2 HL x F12Q HL
220/219	MCSP-D2 HL x I2C HL
222/221	MCSP-D2 HLP x H2C HLP
224/223	MCSP-F9 HL x H2C HL
226/225	MCSP-F9 HLP x H2C HLP
228/227	MCSP-F9 HLP x G4H HLP
318/317	MCSP-A9 HL x H2C HL
320/319	MCSP-A9 HL x F12Q HL
322/321	MCSP-A9 HL x I2C HL
324/323	MCSP-C8 HL x I2C HL
328/327	MCSP-B7 HL x I2C HL
326/325	MCSP-B8 HL x I2C HL
330/329	MCSP-G8 HL x I2C HL
332/331	MCSP-D5 HL x I2C HL
334/333	MCSP-F7 HL x I2C HL

336/335	MCSP-G5 HL x I2C HL
338/337	MCSP-F8 HL x I2C HL
340/339	MCSP-G10 HL x I2C HL

Os constructos mencionados acima que contém as espécies cruzadas de domínios de cadeia pesada variável (VH) e de cadeia leve variável (VL) específicas para D3 de MCSP humano e de símio e as VH e VL espécies cruzadas de domínios específicas para CD3 humano e de símio foram obtidos por síntese de gene. O fragmento de síntese de genes foram projetados para conter, em primeiro lugar, um sítio de Kozak para expressão eucariótica do constructo, sucedida por um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos, sucedida em estrutura pela sequência de codificação da molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única respectiva, sucedida em estrutura pela sequência de codificação de uma histidina₆-tag e um códon de parada. O fragmento de síntese de gene também foi projetado para introduzir os sítios de restrição de terminal N e C adequados. O fragmento de síntese de gene foi clonado por meio desses sítios de restrição em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) de acordo com os protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Os constructos foram transfectados de modo estável ou transiente em células CHO deficientes de DHFR (ATCC Nº CRL 9096) através de eletroporação ou alternativamente em HEK 293 (células de rim embrionárias humanas, ATCC Número: CRL-1573) de uma maneira transiente, de acordo com os protocolos padrão.

A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene dos constructos foi induzida através da adição de concentrações crescentes de metotrexato (MTX) até as concentrações finais de 20 nM de MTX. Após duas passagens de cultura fixa, as células foram cultivadas em garrafas rotatórias com meio de soja líquido de CHO de PF de HyQ

livre de nucleosídeo (com 4,0 mM de L-Glutamina com 0,1% de Plurônico F – 68; HyClone) por 7 dias antes da colheita. As células foram removidas através de centrifugação e o sobrenadante que contém a proteína expressa é armazenado a – 20°C.

5 Äkta® Explorer System (GE Health Systems) e Unicorn® Software foram usados para cromatografia. A *cromatografia* de afinidade por íons metálicos imobilizados (“IMAC”) foi realizada com o uso de um Fractogel EMD chelate® (Merck) que foi carregado com ZnCl₂, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com tampão A (20 mM de tampão de fosfato de
10 sódio com pH 7,2, 0,1 M de NaCl) e o sobrenadante de cultura celular (500 ml) foi aplicado à coluna (10 ml) a uma taxa de fluxo de 3 ml/minuto. A coluna foi lavada com tampão A para remover a amostra não ligada. A proteína ligada foi eluída com o uso de um gradiente de duas etapas de tampão B (20 mM de tampão de fosfato de sódio com pH 7,2, 0,1 M de NaCl, 0,5 M de Imidazola) de acordo com o
15 seguinte:

Etapa 1: 20% de tampão B em 6 volumes de coluna

Etapa 2: 100% de tampão B em 6 volumes de coluna

As frações de proteína eluídas da etapa 2 foram acumuladas para uma purificação adicional. Todos os produtos químicos são de grau de pesquisa e
20 foram adquiridos junto à Sigma (Deisenhofen) ou Merck (Darmstadt).

a cromatografia de filtração em gel foi realizada em uma coluna HiLoad 16/60 marca Superdex graduação 200 (GE/Amersham) equilibrado com Equi-tampão (25 mM de Citrato, 200 mM de Lisina, 5% de Glicerol, pH 7,2). As amostras de proteína eluídas (taxa de fluxo de 1 ml/minuto) foram submetidas à
25 SDS-PAGE padrão e Western Blot para detecção. Antes da purificação, a coluna foi calibrada para determinação de peso molecular (kit de marcador de peso molecular, Sigma MW GF-200). As concentrações de proteína foram determinadas usando OD280 nm.

A proteína de anticorpo biespecífico de cadeia única purificada foi
30 analisada em SDS PAGE sob condições de redução realizadas com pré-fundição

com 4 a 12% de géis Bis Tris (Invitrogen). O preparo e a aplicação da amostra foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O peso molecular foi determinado com padrão de proteína MultiMark (Invitrogen). O gel foi manchado com Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). A pureza da proteína isolada é >95%, conforme determinado por SDS-PAGE.

O anticorpo biespecífico de cadeia única tem um peso molecular de cerca de 52 kDa sob condições nativas, conforme determinado pela filtração em gel em tampão fosfato-salino (PBS). Todos os constructos foram purificados de acordo com esse método.

O Western Blot foi realizado com o uso de uma membrana Optitran® BA-S83 e o Invitrogen Blot Module, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a detecção de anticorpos de proteína do anticorpo biespecífico de cadeia única, um anticorpo anti-His Tag foi usado (Penta His, Qiagen). Um anticorpo Ig anti-camundongo de cabra marcado com fosfatase alcalina (AP) (Sigma) foi usado como anticorpo secundário e BCIP/NBT (Sigma) como substrato. Uma única banda foi detectada a 52 kD correspondendo ao anticorpo biespecífico de cadeia única purificado.

Alternativamente, os constructos foram expressos de modo transiente em células CHO deficientes de DHFR. Resumindo, 4×10^5 células por constructo foram cultivadas em 3 ml de RPMI 1640, todo o meio com glutamina estabilizada suplementada com 10% de soro de feto de bezerro, 1% de penicilina/estreptomicina e nucleosídeos provenientes de uma solução de estoque de reagentes de grau de cultura celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) até uma concentração final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Deoxiadenosina e 10 µg/ml de Timidina, em uma incubadora a 37 °C, 95% de umidade e 7% de CO₂ uma vez ao dia antes da transfecção. A transfecção foi realizada com Reagente de Transfecção de Eugene 6 (Roche, nº 11815091001) de acordo com o protocolo do fabricante. 94 µl de meio de OptiMEM (Invitrogen) e 6 µl de Eugene 6 são misturados e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, 1,5 µg de DNA por constructo foram adicionados,

misturados e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Enquanto isso, as células CHO deficientes de DHFR foram lavadas com 1x PBS e suspensa novamente em 1,5 ml de RPMI 1640 em todo o meio. A mistura de transfecção foi diluída com 600 µl RPMI de 1640 de todo o meio, adicionada às células e incubadas de um dia para o outro a 37 °C, 95% de umidade e 7% de CO₂. No dia após a transfecção, o volume de incubação de cada abordagem foi estendido até 5 ml de RPMI 1640 em todo o meio. O sobrenadante foi cultivado após 3 dias de incubação.

10. Análise de união citométrica de fluxo dos anticorpos

10.1. Análise de união citométrica de fluxo dos anticorpos

Com a finalidade de testar a funcionalidade dos constructos de anticorpo biespecífico específico de cruzamento entre espécies com relação à capacidade de se unir a MCSP D3 e CD3 humano e de macaco, respectivamente, uma análise de FACS foi desempenhada. Para esse propósito, as células CHO transfectadas com MCSP D3 humano (conforme descrito no exemplo 7) e a HPB-ALL de linha de célula de leucemia de célula T positiva de CD3 humano (DSMZ, Braunschweig, ACC483) foram usadas para testar a união aos antígenos humanos. A reatividade de união a antígenos de macaco foi testada usando o transfectante de MCSP D3 de macaco gerado (descrito no Exemplo 8) e a linha de célula T de símio 4119LnPx (gentilmente fornecida pelo Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado em Knappe A, et al., e Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). 200.000 células das respectivas linhas de célula foram incubadas por 30 min sobre gelo com 50 µl da proteína purificada dos constructos de anticorpo biespecífico específico de cruzamento entre espécies (2 µg/ml) ou sobrenadante de cultura celular de células transfectadas expressando os constructos de anticorpo biespecífico específico de cruzamento entre espécies. As células foram lavadas duas vezes em PBS com FCS a 2% e a união do constructo foi detectada com um anticorpo anti-His murino (anticorpo Penta His; Qiagen; diluído a 1:20 em 50 µl de PBS com FCS a 2%). Após lavagem, anticorpos anti-His ligados foram detectados com um anticorpo específico de Fc gama

(Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluída a 1:100 em PBS com FCS a 2%. Sobrenadante de células CHO não transfectadas foi usado como controle negativo para união às linhas de célula T. Um constructo de cadeia única com especificidade alvo irrelevante foi usado como controle negativo para união às células CHO transfectadas com MCSP-D3.

A citometria de fluxo foi desempenhada em um aparelho FACS-Calibur; o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). A medição e a coloração de FACS da intensidade de fluorescência foram desempenhadas conforme descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A biaglutinação específica das moléculas de cadeia única listada conforme acima, que são específicas de cruzamento entre espécies para MCSP D3 e específicas de cruzamento entre espécies para CD3 de macaco e ser humano foi claramente detectável conforme mostrado nas Figuras 10, 11, 12 e 39. Na análise de FACS, todos os constructos mostraram união a CD3 e MCSP D3, conforme comparado aos respectivos controles negativos. A especificidade de cruzamento entre espécies dos anticorpos biespecíficos para antígenos de MCSP D3 e CD3 humano e de macaco foi demonstrada.

11. Bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos de MCSP e CD3 específicos de cruzamento entre espécies

A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados foi analisada por meio de ensaios de citotoxicidade in vitro de liberação de cromo 51 (⁵¹Cr) usando as linhas de célula positiva de MCSP D3 descritas nos Exemplos 7 e 8. Como PBMC depletadas de CD4/CD56 humano estimuladas por células efetoras, as PBMC humanas estimuladas ou a linha de célula T de símio 4119LnPx são usadas conforme especificado nas respectivas figuras.

A geração das PBMC depletadas de CD4/CD56 estimuladas foi desempenhada conforme segue:

O revestimento de uma placa de Petri (145 mm de diâmetro, Greiner

bio-one GmbH, Kremsmünster) foi realizado com um anticorpo específico anti-CD3 comercialmente disponível (por exemplo, OKT3, Othoclone) em uma concentração final de 1 µg/ml por 1 hora a 37°C. A proteína não-associada foi removida por meio de uma etapa de lavagem com PBS. As PBMC frescas foram isoladas a partir do sangue periférico (30 a 50 ml de sangue humano) por meio de centrifugação por gradiente de Ficoll de acordo com os protocolos padrão. 3 a 5 x 10⁷ de PBMC foram adicionados à placa de petri pré-revestida em 120 ml de RPMI 1640 com glutamina estabilizada / FCS a 10% / IL-2 20 U/ml (Proleukin, Chiron) e estimulados por 2 dias. No terceiro dia, as células foram coletadas e lavadas uma vez com RPMI 1640. IL-2 foi adicionada a uma concentração final de 20 U/ml e as células foram cultivadas novamente por um dia no mesmo meio de cultura de célula conforme acima. Por meio de depleção de células T CD4⁺ e células NK CD56⁺ de acordo com os protocolos padrão linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) foram enriquecidos.

Células alvo foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas com 11,1 MBq ⁵¹Cr em um volume final de 100 µl de RPMI com FCS a 50% por 45 minutos a 37°C. Subsequentemente as células alvo marcadas foram lavadas 3 vezes com 5 ml de RPMI e, então, usadas no ensaio de citotoxicidade. O ensaio foi desempenhado em uma bandeja de 96 cavidades em um volume total de 250µl de RPM suplementado (conforme acima) com uma razão E:T de 10:1. 1 µg/ml das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífico específico de cruzamento entre espécies e 20 diluições triplicadas das mesmas foram aplicadas. Se o uso de sobrenadante contendo as moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífico específico de cruzamento entre espécies, 21 diluições duplicadas e 20 diluições triplicadas das mesmas foram aplicadas para o ensaio de citotoxicidade de ser humano e de macaco, respectivamente. O tempo de ensaio foi de 18 horas e a citotoxicidade foi medida como valores relativos de cromo liberado no sobrenadante relacionado à diferença de lise máxima (adição de Triton-X) e lise espontânea (sem células efectoras). Todas as medições foram feitas em quadruplicados. A medição de atividade de cromo nos sobrenadantes foi

desempenhada com um contador gama Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Köln, Alemanha). A análise dos dados experimentais foi desempenhada com Prism 4 para Windows (versão 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, USA). As curvas de resposta de dose sigmoidal têm tipicamente valores de $R^2 > 0,90$ conforme determinado por meio do software. Os valores de EC_{50} calculados por meio do programa de análise foram usados para comparação de bioatividade.

Conforme mostrado nas Figuras 13 a 17 e 40, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecífico específico de cruzamento entre espécies geradas demonstram atividade citotóxica contra células alvo positivas de MCSP D3 humano evocadas por meio de PBMC depletadas de CD4/CD56 humano estimulado ou PBMC estimuladas e contra células alvo positivas de MCSP D3 de macaco evocadas por meio da linha de célula T de símio 4119LnPx.

12. Estabilidade de plasma de anticorpos de cadeia única biespecíficos específicos de cruzamento entre espécies MCSP e CD3

A estabilidade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados em plasma humano foi analisada por meio de incubação dos anticorpos de cadeia única biespecíficos em Plasma humano a 50% a 37°C e 4°C por 24 horas e a testagem subsequente de bioatividade. A bioatividade foi estudada em um ensaio de citotoxicidade in vitro de liberação de cromo 51 (^{51}Cr) usando uma linha de célula CHO positiva de MCSP (expressando MCSP conforme clonado de acordo com o exemplo 14 ou 15) como células T positivas de CD8 humano estimulado e alvo como células efectoras.

Os valores de EC_{50} calculados por meio do programa de análise conforme descrito acima foram usados para comparação de bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos incubados com plasma humano a 50% por 24 horas a 37°C e 4°C respectivamente com anticorpos de cadeia única biespecíficos sem adição de plasma ou misturados com a mesma quantidade de plasma imediatamente antes do ensaio.

Conforme mostrado na Figura 18 e na Tabela 2, a bioatividade dos

anticorpos biespecíficos G4 H-L x I2C H-L, G4 H-L x H2C H-L e G4 H-L x F12Q H-L não foi reduzida significativamente, conforme comparado com os controles sem a adição de plasma ou com a adição de plasma antes da testagem de bioatividade.

Tabela 2: bioatividade dos anticorpos biespecíficos sem ou com a

5 adição de Plasma

Constructo	Sem plasma	Com plasma	Plasma a 37°C	Plasma a 4°C
G4 H-L x I2C H-L	300	796	902	867
G4 H-L x H2C H-L	496	575	2363	1.449
G4 H-L x F12Q H-L	493	358	1.521	1.040

13. **Redistribuição de células T circulantes na ausência de células alvo circulantes por meio de primeira exposição a moléculas de aglutinação CD3 direcionadas em convencional, isto é, os epítomos CD3 dependentes de contexto são um fator de risco maior para eventos adversos**

10 relacionados à iniciação de tratamento

Redistribuição de célula T em pacientes com Linfoma Não-Hodgkin de célula B (B-NHL) seguindo iniciação de tratamento com a molécula de aglutinação CD3 convencional

15 Moléculas de aglutinação CD19xCD3 convencionais são moléculas de aglutinação CD3 do formato scFV em conjunto biespecífico (Loffler (2000, Blood, Volume 95, Número 6) ou WO 99/54440). A mesma consiste em duas porções de união diferentes direcionadas em (i) CD19 sobre a superfície de células B humanas malignas e normais e (ii) CD3 em células T humanas. Por meio de reticulação de CD3 em células T com CD19 em células B, esse constructo dispara

20 a lise redirecionada de células B malignas e normais por meio da atividade citotóxica de células T. O epítomo CD3 reconhecido por meio de tal molécula de aglutinação CD3 fica localizado na cadeia épsilon de CD3, onde o mesmo somente obtém a conformação correta se for inserido dentro do resto da cadeia épsilon e

mantido na posição direita por meio de heterodimerização da cadeia épsilon com a cadeia delta ou gama de CD3. A interação desse epítipo altamente dependente de contexto com uma molécula de aglutinação CD3 convencional (vide, por exemplo, Loffler (2000, Blood, Volume 95, Número 6) ou WO 99/54440) – mesmo quando

5 ocorre em um molde puramente monovalente e sem nenhuma reticulação – pode induzir uma alteração alostérica na conformação de CD3 conduzindo à exposição de uma região rica em prolina de outra forma escondida dentro do domínio citoplasmático de épsilon de CD3. Uma vez exposta, a região rica em prolina pode recrutar a molécula de transdução de sinal Nck2, que é capaz de disparar sinais

10 intracelulares adicionais. Embora isso não seja suficiente para a ativação completa de célula T, que exige definitivamente a reticulação de diversas moléculas CD3 sobre a superfície de célula T, por exemplo, por meio de reticulação de diversas anti-moléculas CD3 unidas a diversas moléculas CD3 em uma célula T por meio de diversas moléculas CD19 sobre a superfície de uma célula B, a interação

15 monovalente pura de moléculas de aglutinação CD3 convencionais para seu epítipo dependente de contexto em épsilon de CD3 ainda não é inerte para células T em termos de sinalização. Sem estarem unidas por meio da teoria, as moléculas de aglutinação CD3 convencionais monovalentes (conhecidas na técnica) podem induzir algumas reações de célula T quando infundidas nos seres humanos mesmo

20 naqueles casos em que nenhuma célula alvo circulante está disponível para reticulação de CD3. Uma reação de célula T importante para a infusão intravenosa de molécula de aglutinação CD19xCD3 monovalente convencional em pacientes com B-NHL que não têm essencialmente nenhuma célula B positiva de CD19 circulante é a redistribuição de células T após o início do tratamento. Foi

25 encontrado em uma avaliação clínica de fase I que essa reação de célula T ocorre durante a fase inicial de infusão intravenosa de molécula de aglutinação CD19x em todos os indivíduos sem células B alvo positivas de CD19 circulante essencialmente independentes da dose de molécula de aglutinação CD19xCD3 (Figura 19). Entretanto, aumentos súbitos em exposição de molécula de

30 aglutinação CD19xCD3 foram encontrados por dispararem virtualmente a mesma

reação de célula T redistribuicional nesses pacientes como a exposição inicial de células T à molécula de aglutinação CD19xCD3 em início de tratamento (Figura 20 A) e os mesmos aumentos graduais em exposição de molécula de aglutinação CD19xCD3 ainda podem ter efeitos redistribuicionais em células T circulantes (Figura 21). Além disso, foi encontrado que essa reação de célula T redistribuicional essencialmente independente de dose na ausência de células alvo circulantes conforme disparado por meio de moléculas de aglutinação CD3 convencionais semelhante à molécula de aglutinação CD19xCD3 (por exemplo, descrita em WO 99/54440) em 100% de todos os indivíduos tratados é um fator de risco maior para eventos adversos relacionados à iniciação de tratamento.

De acordo com o protocolo de estudo, pacientes com Linfoma Não-Hodgkin (B-NHL) de célula B indolente histologicamente confirmado, reincidente incluindo linfoma de célula do manto, foram recrutados para um ensaio clínico aberto multi-centro de fase I, com escalção de dose entre pacientes. O protocolo de estudo foi aprovado por meio dos comitês de ética independentes de todos os centros participantes e enviado para notificação para a autoridade reguladora responsável.

Doença mensurável (pelo menos uma lesão $\geq 1,5$ cm) conforme documentado por varredura por TC foi exigida para inclusão no estudo. Os pacientes receberam molécula de aglutinação CD19xCD3 convencional por meio de infusão intravenosa contínua com um sistema de minibomba portátil por quatro semanas em taxa de fluxo constante (isto é, nível de dose). Os pacientes foram hospitalizados durante as primeiras duas semanas de tratamento antes de serem liberados do hospital e continuaram o tratamento em casa. Aos pacientes sem evidência de progressão de doença após quatro semanas foi oferecida a continuação do tratamento por mais quatro semanas. Até aqui seis níveis diferentes de dose foram testados sem atingir uma dose máxima tolerada (*maximum tolerated dose*, MTD): 0,5, 1,5, 5, 15, 30 e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. Os coortes consistiram em três pacientes cada sem nenhum evento adverso definido pelo protocolo de estudo como DLT (*dose limiting toxicity*, toxicidade limitadora de dose)

sendo observado. Em caso de uma DLT dentre os três primeiros pacientes, o coorte foi expandido para seis pacientes, o que – na ausência de uma segunda DLT – permitiu escalção de dose adicional. Assim sendo, os níveis de dose sem DLT em coortes com 3 pacientes ou com uma DLT em coortes com 6 pacientes foram relacionados como seguros. O tratamento de estudo foi interrompido em todos os pacientes que desenvolveram uma DLT. A 15 e 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, modos diferentes de iniciação de tratamento durante as primeiras 24h foram testados em diversos coortes adicionais: (i) Aumento gradual após 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ nas primeiras 24h até a dose de manutenção de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ (coortes de paciente na etapa 15), (ii) aumento contínuo regular da taxa de fluxo partindo quase do zero até 15 ou 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ (coortes de paciente com evolução de 15 e 30) e (iii) início com a dose de manutenção a partir de cada início (coortes de paciente com estabilidade de 15, 30 e 60). Todos os coortes de paciente em 0,5, 1,5 e 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ de níveis de dose foram iniciados com a dose de manutenção desde o início (isto é, inibição de plano).

Os cursos de tempo de contagens de célula T e B absolutas em sangue periférico foram determinados por meio de quatro análises de FACS de cor conforme segue:

Coleta de amostras de sangue e análise de rotina

Em coortes de paciente com evolução de 15, estabilidade de 15, evolução de 30, estabilidade de 30 e estabilidade de 60, as amostras de sangue (6 ml) foram obtidas antes e 0,75, 2, 6, 12, 24, 30, 48 horas após o início da infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3 (conforme descrito em WO 99/54440) bem como em dias de tratamento 8, 15, 17, 22, 24, 29, 36, 43, 50, 57 e 4 semanas após o fim da infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3 convencional usando tubos de EDTA-contendo Vacutainer™ (Becton Dickinson) que foram remetidos para análise a 4°C. Em coortes de paciente na etapa 15, as amostras de sangue (6 ml) foram obtidas antes e 6, 24, 30, 48 horas após o início da infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3 bem como em dias de tratamento 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 e 4 semanas após o fim da infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3.

Em níveis de dose 0,5, 1,5 e 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, as amostras de sangue (6 ml) foram obtidas antes e 6, 24, 48 horas após o início da infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3 bem como em dias de tratamento 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 e 4 semanas após o fim da infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3. Em alguns

5 casos, ligeiras variações desses pontos de tempo ocorreram por razões operacionais. A análise de FACS de subpopulações de linfócito foi desempenhada dentro de 24 a 48 h após coleta de amostra de sangue. Quantidades absolutas de subpopulações de leucócito nas amostras de sangue foram determinadas através de análise de sangue diferencial em um CoulterCounter™ (Coulter).

10 **Isolamento de PBMC a partir de amostras de sangue**

O isolamento de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*, células de sangue periférico mononuclear) foi desempenhado por meio de um protocolo de separação por gradiente Ficoll™ adaptado. O sangue foi transferido em temperatura ambiente no interior de tubos Leucosep™ de 10 ml (Greiner) pré-

15 carregados com 3 ml de solução de Biocoll™ (Biochrom). A centrifugação foi realizada em um rotor do tipo swing-out por 15 min em 1,700xg e 22°C sem desaceleração. As PBMC acima da camada de Biocoll™ foram isoladas, lavadas uma vez com tampão de FACS (PBS / FBS a 2% [*Foetal Bovine Serum*, Soro Fetal Bovino; Biochrom]), centrifugadas e ressuspensas em tampão de FACS. A

20 centrifugação durante todas as etapas de lavagem foi realizada em um rotor do tipo swing-out por 4 min em 800xg e 4°C. Se necessário, a lise de eritrócitos foi desempenhada incubando as PBMC isoladas em 3 ml de tampão de lise de eritrócito (8,29 g de NH_4Cl , 1,00 g de KHCO_3 , 0,037 g de EDTA, adição de 1,0 l de $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, pH 7,5) por 5 min em temperatura ambiente seguido por uma etapa de

25 lavagem com tampão de FACS.

Coloração de PBMC com anticorpos marcados com fluorescência contra moléculas de superfície de célula

Os anticorpos monoclonais foram obtidos a partir de Invitrogen (1ª Categoria Nº MHCD1301, 2ª Categoria Nº MHCD1401), Dako (5ª Categoria Nº C7224) ou Becton Dickinson (3ª Categoria Nº 555516, 4ª Categoria Nº 345766) usado

30

de acordo com as recomendações dos fabricantes. 5×10^5 a 1×10^6 células foram coloridas com a seguinte combinação de anticorpo: anti-CD13¹ / anti-CD14² (FITC) x anti-CD56³ (PE) x anti-CD3⁴ (PerCP) x anti-CD19⁵ (APC). As células foram peletadas em placas de multititulação de 96 cavidades em formato de V (Greiner) e o sobrenadante foi removido. Pelotas de célula ficaram ressuspensas em um volume total de 100 µl contendo os anticorpos específicos diluídos em tampão de FACS. A incubação foi realizada no escuro por 30 min a 4°C. Subsequentemente, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão de FACS e as pelotas de célula ficaram ressuspensas em tampão de FACS para análise fluxocitométrica.

Detecção fluxocitométrica de linfócitos coloridos por meio de FACS

Os dados coletos foram desempenhados com um BD FACSCalibur™ de 4 cores (Becton Dickinson). Para cada medição, 1×10^4 células de subpopulações definidas de linfócito foram adquiridas. A análise estatística foi desempenhada com o programa CellQuest Pro™ (Becton Dickinson) para obter porcentagens de subpopulação de linfócito e para classificar intensidade de expressão de molécula de superfície de célula. Subsequentemente, as porcentagens de subconjuntos de linfócito único relacionados a linfócitos totais (isto é, B mais T mais células NK excluindo quaisquer células mielóides via coloração de CD13/14), conforme determinado por FACS foram correlacionadas com a contagem de linfócito a partir da análise de sangue diferencial para calcular números absolutos de célula de células T (CD3⁺, CD56⁻, CD13/14⁻) e células B (CD19⁺, CD13/14⁻).

A redistribuição de célula T durante a fase inicial de tratamento de molécula de aglutinação CD19xCD3 convencional (por exemplo, descrita em WO 99/54440) em todos aqueles pacientes que não tiveram essencialmente nenhuma célula B positiva de CD19 circulante em início de tratamento é mostrada na (Figura 19). Para comparação, um exemplo representativo de redistribuição de célula T durante a fase inicial do tratamento de molécula de aglutinação CD19xCD3 em um paciente com uma quantidade significativa de células B positivas de CD19

circulante é mostrado na Figura 22.

Em ambos os casos (isto é, essencialmente, nenhuma ou muitas células B circulantes), as contagens de célula T circulantes diminuem rapidamente mediante início de tratamento. Entretanto, na ausência de células B circulantes, as células T tendem a retornar para o sangue circulante muito cedo, enquanto o retorno das células T para o sangue circulante daqueles pacientes que têm uma quantidade significativa de células B circulantes em início de tratamento é usualmente retardado até que essas células B circulantes estejam depletadas. Assim, os padrões de redistribuição de célula T diferem principalmente na cinética do reaparecimento de célula T no sangue circulante.

A avaliação da eficácia com base em varredura por TC foi realizada por meio de radiologia de referência central após 4 semanas de tratamento e em pacientes recebendo 4 semanas adicionais também após 8 semanas de tratamento mais, em todos os casos, quatro semanas após o fim do tratamento. O desaparecimento e/ou a normalização em tamanho de todas as lesões conhecidas (incluindo um baço inchado) mais folga de medula óssea a partir de células de linfoma em casos de infiltração de medula óssea foi contado como resposta completa (*complete response*, CR). A redução por pelo menos 50% a partir da linha de base da soma de produtos dos dois diâmetros maiores (SPD) de cada lesão alvo pré-definida foi definida como resposta parcial (*partial response*, PR); uma redução por pelo menos 25% foi relacionada a uma resposta mínima (*minimal response*, MR). A doença progressiva (*progressive disease*, PD) foi definida como $\geq 50\%$ de aumento de SPD a partir da linha de base. Os desvios de SPD a partir da linha de base entre $+50\%$ e -25% foram relacionados como doença estável (*stable disease* SD).

A demografia de paciente, as doses recebidas e o resultado clínico em 34 pacientes são sumarizados na Tabela 3. A atividade anti-tumor clínica da molécula de aglutinação CD19xCD3 foi claramente dependente de dose: a depleção consistente de célula B positiva de CD19 circulante (linfoma) a partir de sangue periférico foi observada a partir de $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ para frente. Em 15

$\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ e $30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, as primeiras respostas clínicas objetivas (PRs e CRs) foram gravadas bem como casos de eliminação completa e parcial de células B de linfoma a partir de medula óssea infiltrada. Finalmente, em $60 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, a taxa de resposta aumentou para 100% (PRs e CRs) e a folga de medula óssea a partir das células B de linfoma ficou completa em todos os casos que podem ser avaliados.

A molécula de aglutinação CD19xCD3 foi bem tolerada por meio da maior parte dos pacientes. Os eventos adversos mais frequentes de graus 1 a 4 in 34 pacientes, independente de causalidade são sumarizados na Tabela 4. Os eventos adversos relacionados à molécula de aglutinação CD19xCD3 eram usualmente transientes e completamente reversíveis. Em particular, existiram 2 pacientes (pacientes nº19 e nº24 na Tabela 3) essencialmente sem células B positivas de CD19 circulante cujo tratamento foi interrompido antecipadamente por causa dos eventos adversos de CNS (sintomas guia: confusão e desorientação) relacionados a redistribuição repetida de célula T durante a fase inicial de infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3.

Um desses pacientes (nº19) estava no coorte na etapa 15. O paciente recebeu $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ de molécula de aglutinação CD19xCD3 para as primeiras 24h seguidas por aumento súbito para dose de manutenção de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. O padrão de redistribuição de célula T correspondente mostra que as contagens de célula T circulantes diminuíram rapidamente mediante início de infusão em $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ seguido por reaparecimento antecipado de células T no sangue circulante essencialmente sem células B positivas de CD19 circulante. Como um consequência, as contagens de célula T periférica foram recuperadas completamente quando a dose de molécula de aglutinação CD19xCD3 foi aumentada após 24h de 5 para $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. Portanto, a etapa de dose poderia disparar um segundo episódio de redistribuição de célula T conforme mostrado na Figura 20 A. Essa redistribuição repetida de célula T estava relacionada com efeitos colaterais de CNS (sintomas guia: confusão e desorientação) nesse paciente, o que conduziu à interrupção de infusão. A relação entre a redistribuição repetida de célula T e tais eventos adversos de CNS também foi observada em

avaliações clínicas de fase prévias em pacientes com B-NHL que receberam a molécula de aglutinação CD19xCD3 (por exemplo, descrita em WO 99/54440) como infusão de bolus repetido por 2 a 4 horas cada, usualmente seguido por 2 dias de intervalo livre de tratamento (Figura 20 B). Toda infusão de bolus única disparou um episódio de redistribuição de célula T consistindo em uma diminuição rápida em contagens de célula T circulantes e recuperação de célula T antes da próxima infusão de bolus. No total, eventos adversos de CNS relacionados à redistribuição repetida de célula T foram observados em 5 dentre 21 pacientes. A Figura 20 B mostra o exemplo representativo de um paciente a partir das avaliações de infusão de bolus, que desenvolveu sintomas de CNS após o terceiro episódio de redistribuição de célula T. Tipicamente, os pacientes com eventos adversos de CNS nas avaliações de infusão de bolus também tiveram contagens baixas de célula B circulante.

O segundo paciente (nº24) a partir da avaliação de infusão contínua, cujo tratamento foi interrompido antecipadamente por causa dos eventos adversos de CNS (sintomas guia: confusão e desorientação) relacionados à redistribuição repetida de célula T durante a fase inicial de infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3, estava em coorte com estabilidade de 15. Por engano, esse paciente recebeu uma infusão de molécula de aglutinação CD19xCD3 sem HSA adicional conforme exigido para estabilização da droga. O fluxo de droga irregular resultante disparou episódios repetidos de redistribuição de célula T em lugar de somente uma (Figura 23 A) com a consequência de que a infusão teve de ser interrompida por causa dos sintomas de CNS em desenvolvimento. Ainda, quando o mesmo paciente foi reiniciado corretamente com solução de molécula de aglutinação CD19xCD3 contendo HSA adicional para estabilização de droga (por exemplo, descrito em WO 99/54440), nenhuma redistribuição repetida de célula T foi observada e o paciente não desenvolveu novamente nenhum sintoma de CNS (Figura 23 B). Pelo fato de esse paciente também não ter essencialmente nenhuma célula B circulante, as células T circulantes poderiam reagir com cinética de redistribuição rápida até para alterações sutis em exposição de droga conforme

observado. Os eventos adversos de CNS relacionados à redistribuição de célula T em pacientes que não têm essencialmente nenhuma célula alvo circulante podem ser explicados por meio de um aumento transiente de aderência de célula T às células endoteliais seguido por maciça de células T circulantes às paredes de vaso sanguíneo com uma queda consecutiva de quantidades de célula T no sangue circulante conforme observado. A fixação simultânea maciça de células T às paredes de vaso sanguíneo pode ocasionar um aumento em permeabilidade endotelial e ativação de célula endotelial. As consequências de permeabilidade endotelial aumentada são deslocamentos de fluidos a partir do compartimento intravascular no interior de compartimentos de tecido intersticial incluindo o interstício de CNS. A ativação de célula endotelial por meio de células T fixadas pode ter efeitos procoagulantes (Monaco et al. J Leukoc Biol 71 (2002) 659-668) com distúrbios possíveis em fluxo de sangue (incluindo fluxo de sangue cerebral) particularmente com relação à microcirculação capilar. Assim, eventos adversos de CNS relacionados à redistribuição de célula T em pacientes essencialmente sem células alvo circulantes podem ser a consequência de vazamento capilar e/ou distúrbios em microcirculação capilar através de aderência de células T a células endoteliais. A tensão endotelial ocasionada por um episódio de redistribuição de célula T é tolerada pela maior parte dos pacientes, enquanto a tensão endotelial intensificada ocasionada pela redistribuição repetida de célula T ocasiona frequentemente eventos adversos de CNS. Mais do que um episódio de redistribuição de célula T pode ser menos arriscado somente em pacientes que têm contagens baixas da linha de base de células T circulantes. Entretanto, também a tensão endotelial limitada ocasionada por um episódio de redistribuição de célula T pode ocasionar eventos adversos de CNS em casos raros de suscetibilidade aumentada para tais eventos conforme observado em 1 dentre 21 pacientes nas avaliações de infusão de bolus com a molécula de aglutinação CD19xCD3.

Sem se ater à teoria, o aumento transiente do Poder de adesão da célula T em relação às células endoteliais em pacientes que têm essencialmente

células alvo que não circulam pode ser explicado como a Reação da célula T em relação à interação monovalente de uma molécula de ligação de CD3 convencional, como a molécula de ligação CD19xCD3 (por exemplo, WO 99/54440) para seu epítipo contexto-dependente no épsilon CD3 resultando em

5 uma alteração alostérica na conformação de CD3 seguido pelo recrutamento de Nck2 em relação ao domínio citoplásmico de épsilon de CD3 conforme descrito acima. Como o Nck2 é ligado diretamente às integrinas através de PINCH e de ILK (figura 28), o recrutamento de Nck2 em relação ao domínio citoplásmico de épsilon de CD3 seguindo uma alteração alostérica na conformação de CD3 através da

10 ligação de uma molécula de ligação de CD3 convencional, como a molécula de ligação CD19xCD3 em relação a seu epítipo contexto-dependente no épsilon de CD3, pode aumentar o poder de adesão das células T às células endoteliais mediante a alteração de maneira transiente das integrinas sobre a superfície da célula T em sua isoforma mais adesiva por meio da sinalização de dentro pra fora.

15 Tabela 3. Resultado clínico e demográfico do Paciente

Coorte	Paciente	Idade/ Sexo	Doença (Classificação de Ann Arbor)	Nível de dosagem [mg/m ² /Dia]	Clareza da medula óssea	Melhor resposta* (Duração de CR em Meses ou Semanas)
1	1	71/m	IC, Binet C	0,0005	Não há	SD
	2	67/f	MCL, Estágio IV/A/E	0,0005	sem data	PD
	3	67/m	CLL, Estágio IV/B/E	0,0005	não determinado	MR
2	4	69/m	MCL, Estágio IV/B	0,0015	sem informação	SD
	5	49/m	MCL, Estágio IV/A/S	0,0015	não determinado	SD

	6	71/m	MCL, Estágio IV/B/E	0,0015	sem informação	PD
	7	77/m	MCL, Estágio IV/B/E/S	0,0015	sem informação	SD
	8	65/m	CLL, Estágio IV/B/E/S	0,0015	não determinado	PD
	9	75/m	FL, Estágio II/B	0,0015	sem informação	SD
3	10	58/m	MCL, Estágio III/B/S	0,005	sem informação	PD
	11	68/f	FL, Estágio IV/B	0,005	não determinado	SD
	12	65/m	MCL, Estágio III/A/E	0,005	sem informação	SD
4 ^a	13	60/m	SLL, Estágio IV/B/S	0,015	Completa	PR
	14	73/m	MCL, Estágio II/A/E	0,015	sem informação	SD
	15	44/m	FL, Estágio IV/B/E/S	0,015	Parcial	PR
	16	61/m	FL, Estágio IV/A/S	0,015	Completa	CR (7mo)
	17	67/m	MZL, Estágio IV/B/S	0,015	sem informação	n.e.
	18	64/m	FL, Estágio IV/A/E	0,015	sem informação	PD
	19	75/m	MCL, Estágio III/A	0,015	sem informação	n.e.
	20	65/f	FL; Estágio III/A	0,015	sem informação	SD

	21	60/m	MCL, Estágio IV/A/E	0,015	Não há	SD
	22	67/f	FL, Estágio IV/B	0,015	Completa	MR
	23	67/m	DLBCL, Estágio III/B	0,015	sem informação	n.e.
	24	65/f	FL, Estágio III/A	0,015	não determinado	SD
	25	74/f	WD, Estágio IV/B	0,015	Parcial	SD
5	26	67/m	MCL, Estágio IV/A	0,03	Completa	SD
	27	48/m	FL, Estágio III/A	0,03	não infiltrado	PD
	28	58/m	MCL, Estágio III/A	0,03	não infiltrado	CR (10mo+)
	29	45/f	MCL, Estágio IV/B	0,03	Parcial	PD
	30	59/m	MZL, Estágio III/A	0,03	não infiltrado	n.e.
	31	43/m	FL, Estágio III/A	0,03	não infiltrado	MR
6	32	72/m	MCL, Estágio IV/A	0,06	Completa	PR
	33	55/m	MCL, Estágio IV/B	0,06	Completa	CR (4mo+)
	34	52/m	FL, Estágio IV/A	0,06	não infiltrado	CR^b (1w+)

*As respostas (PR) parciais e (CR) completas confirmadas centralmente pelo critério de Cheson em bold; MR, resposta mínima (≥ 25 a $< 50\%$);

SD, doença estável; PD, doença progressiva; duração a partir da primeira documentação de resposta entre parênteses; + denota uma resposta progressiva

^aCoorte 4 foi expandido ao estudo de três cronogramas diferentes de iniciação de tratamento

5 ^bPR após 8 semanas de tratamento que transformou-se em CR após um ciclo de tratamento adicional de 4 semanas com a mesma dose seguindo 7 semanas de intervalo sem tratamento

n.e.: não avaliável porque o período de tratamento foi <7 dias

n.d.: não determinado (infiltrado, mas não foi executada uma segunda

10 biópsia ao final do tratamento)

n.i.: não infiltrado no início do tratamento

Tabela 4. Incidência de eventos adversos observados durante o tratamento

Eventos adversos independentemente da relação, ocorrendo em ≥ 3 pacientes (N=34)	Grade 1-4 N (%)	Grade 3-4 N (%)
Pirexia	22 (64,7)	2 (5,9)
Leucopenia	21 (61,8)	11 (32,4)
Linfopenia	21 (61,8)	21 (61,8)
Coagulopatia (aumento nos dímeros D)	16 (47,1)	6 (17,6)
Anormalidade enzimática (AP, LDH, CRP)	16 (47,1)	10 (29,4)
Anormalidade de função hepática (ALT, AST, GGT)	16 (47,1)	1 (2,9)
Anemia	13 (38,2)	5 (14,7)
Calafrios	13 (38,2)	0 (0,0)
Dor de cabeça	12 (35,3)	1 (2,9)
Hipocalcemia	12 (35,3)	2 (5,9)
Trombocitopenia	12 (35,3)	6 (17,6)
Aumento de peso	12 (35,3)	0 (0,0)
Hiperglicemia	11 (32,4)	2 (5,9)

Neutropenia	11 (32,4)	8 (23,5)
Hematúria	10 (29,4)	0 (0,0)
Edema periférico	10 (29,4)	2 (5,9)
Anorexia	9 (26,5)	1 (2,9)
Diarréia	9 (26,5)	0 (0,0)
Diminuição de peso	9 (26,5)	0 (0,0)
Fadiga	8 (23,5)	1 (2,9)
Proteinúria	8 (23,5)	0 (0,0)
Hipocalcemia	7 (20,6)	2 (5,9)
Anormalidade de enzima pancreática	7 (20,6)	0 (0,0)
Tosse	6 (17,6)	0 (0,0)
Dispnéia	6 (17,6)	0 (0,0)
Dor lombar	5 (14,7)	0 (0,0)
Dor no sítio do cateter	5 (14,7)	0 (0,0)
Hiperbilirrubinemia	5 (14,7)	2 (5,9)
Hipoalbuminemia	5 (14,7)	0 (0,0)
Hipogamaglobulinemia	5 (14,7)	1 (2,9)
Hipoproteinemia	5 (14,7)	0 (0,0)
Efusão pleural	5 (14,7)	1 (2,9)
Vômito	5 (14,7)	0 (0,0)
Astenia	4 (11,8)	1 (2,9)
Estado de confusão	4 (11,8)	0 (0,0)
Constipação	4 (11,8)	0 (0,0)
Tontura	4 (11,8)	0 (0,0)
Hipertensão	4 (11,8)	0 (0,0)
Hiponatremia	4 (11,8)	2 (5,9)
Secura na mucosa	4 (11,8)	0 (0,0)
Espasmos musculares	4 (11,8)	0 (0,0)
Náusea	4 (11,8)	0 (0,0)

Sudoreses	4 (11,8)	0 (0,0)
Dor abdominal	3 (8,8)	1 (2,9)
Ascites	3 (8,8)	0 (0,0)
Hipercoagulação	3 (8,8)	0 (0,0)
Hiperidrose	3 (8,8)	0 (0,0)
Hipoglobulinemia	3 (8,8)	0 (0,0)
Insônia	3 (8,8)	0 (0,0)
Transtorno no fígado	3 (8,8)	1 (2,9)
Nasofaringite	3 (8,8)	0 (0,0)
Prurido	3 (8,8)	0 (0,0)

As Abreviações usadas são: AE, evento adverso; AP, fosfatase alcalina; LDH, lactato desidrogenase; CRP, proteína reativa C; ALT, alanina transaminase; AST, aspartato transaminase; GGT, gama-glutamil transferase; dados AE do ciclo de tratamento adicional do paciente 34 ainda não incluído.

5 Conforme explicado acima, as moléculas de ligação de CD3 convencionais (por exemplo, reveladas no documento WO 99/54440) capazes de se ligarem a um epitopo contexto-dependente apesar de funcionais levam ao efeito indesejado de redistribuição de célula T em pacientes causando eventos adversos CNS. Em contraste, as moléculas de aglutinação da presente invenção, mediante a

10 aglutinação aos aminoácidos 1-27 Terminais N contexto-independentes da cadeia de épsilon de CD3 não levam a esses efeitos de redistribuição de célula T. Como uma consequência, as moléculas de aglutinação de CD3 da invenção estão associadas a um perfil de segurança mais satisfatório em comparação com as moléculas de ligação de CD3 convencionais.

15 **14. As moléculas de aglutinação de CD3 biespecíficas da invenção que induzem a lise de célula alvo mediada pela célula T mediante o reconhecimento de células in vivo positivas para o antígeno alvo de depleção do antígeno alvo de superfície.**

20 Uma molécula de aglutinação de CD3 biespecífica da invenção que reconhece CD33 como um antígeno alvo realiza a depleção de monócitos

de circulação CD33 positivos a partir do sangue periférico de macacos cinomolgos.

CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL (sequência de aminoácidos: SEQ ID N°.267) foi produzida com a expressão em células CHO com o uso da sequência de codificação de nucleotídeos SEQ ID N°. 268. Visto que as sequências de codificação de (i) um líder de cadeia pesada de imunoglobulina Terminal N que compreende um códon inicial incorporado em uma sequência consenso de Kozak e (ii) uma etiqueta de His₆ Terminal C seguida por um códon de parada foram ambas fixadas em quadro à sequência de nucleotídeos SEQ ID N° 268 antes da inserção do fragmento de DNA resultante conforme obtido pela síntese genética nos múltiplos sítios de clonagem do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150). A transfecção estável de células CHO deficientes de DHFR, a seleção dos transfectantes de DHFR positivos que secretam a molécula de aglutinação de CD3 CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL no sobrenadante de cultura e a amplificação de gene com metotrexato para o aumento dos níveis de expressão forem executados conforme descrito (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021 a 7025). O perfil de SEC analítico de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL para uso em macacos cinomolgos revelou que o material de teste quase exclusivamente consistiu de monômero. A potência do material de teste foi medida em um ensaio de citotoxicidade conforme descrito no exemplo 16.5 com o uso de células de CHO transfectadas com CD33 cinomolgo como as células alvo e a linhagem de célula T de macaco 4119LnPx como uma fonte de células efetoras (FIG. 25). A concentração de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL exigida para a lise de célula alvo de meia altura pelas células T efetoras (EC50) foi determinada para ser de 2,7 ng/ml.

Os macacos cinomolgos adultos (aproximadamente com 3 anos de vida) jovens (*Macaca fascicularis*) foram tratados por infusão intravenosa contínua da molécula de aglutinação de CD3 CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL em diferentes taxas de fluxo (isto é, níveis de dosagem) para estudar a depleção de monócitos de CD33 positivos de circulação do sangue periférico. Essa situação é equivalente

ao tratamento com a molécula de ligação de CD3 convencional CD19xCD3 (específica para CD19 em células B e CD3 em células T) daqueles pacientes B-NHL que têm células B alvo de CD19-positivo em circulação (consulte, por exemplo, WO99/54440). Verificou-se que a depleção das células B alvo de CD19 positivo em circulação a partir do sangue periférico foi um surrogado válido para a eficácia clínica em geral da molécula de ligação de CD3 convencional (CD19xCD3 conforme fornecido no documento WO99/54440) em pacientes com malignomas de célula B de CD19-positivo como B-NHL. Da mesma maneira, a depleção de monócitos de CD33 positivo em circulação a partir do sangue periférico é tida como um surrogado válido da eficácia clínica em geral de moléculas de aglutinação de CD3 biespecíficas direcionadas para CD33 da invenção como CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL em pacientes com malignomas de mielóide de CD33-positivo como AML (leucemia mielóide aguda).

A infusão contínua foi executada de acordo com o método Swivel da seguinte maneira: Os macacos são cateterizados por meio da veia femoral até a veia cava caudal com o uso de um cateter de veia. O cateter é colocado subcutaneamente formando um túnel na relação à região dorsal do ombro e exteriorizado na escápula caudal. Então, um tubo é passado através de um invólucro e uma mola de proteção. O invólucro é preso ao redor do animal e o cateter, através do tubo, é conectado a uma bomba de infusão.

A solução administrada (1,25 M de lisina, 0,1% de tween 80, pH 7) sem o material de teste foi submetida à infusão continuamente a 48 ml/24h durante 7 dias antes do início do tratamento para permitir a aclimatização dos animais para as condições de infusão. O tratamento foi iniciado mediante a adição do material de teste CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL para a solução de administração com a quantidade exigida para cada nível de dosagem individual a ser testada (isto é, taxa de fluxo de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL). O reservatório de infusão foi alterado todos os dias ao longo de toda a fase de aclimatização e tratamento. A duração planejada do tratamento foi de 7 dias exceto pelo nível de dosagem de 120µg/m²/24h em que os animais receberam 14 dias de tratamento.

Os cursos de tempo de contagens absolutas nas células T em circulação e monócitos de CD33-positivo foram determinados pela análise de FACS de 4 ou 3 cores, respectivamente:

Coleta de amostras de sangue e análise de rotina

5 As amostras de sangue (1 ml) foram obtidas antes e 0,75, 2, 6, 12, 24, 30, 48, 72 horas após o início de infusão contínua com MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL bem como após 7 e 14 dias (e após 9 dias com o nível de dosagem de 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$) de tratamento com o uso de tubos Vacutainer™ contendo EDTA (Becton Dickinson) que foram enviados para análise a 4°C. Em alguns casos, variações leves desses pontos de tempo ocorreram por razões operacionais. A análise de FACS das subpopulações de linfócito foi realizada em 24 a 48 h após a coleta da amostra de sangue. Números absolutos das subpopulações de leucócito nas amostras de sangue foram determinados através da análise de sangue diferencial em um laboratório veterinário de rotina.

15 Isolamento de PBMC das amostras de sangue

As PBMC (células nucleares de sangue periférico) foram isoladas em analogia ao protocolo descrito no exemplo 13, acima, com adaptações dos volumes usados.

20 Manchamento de PBMC com anticorpos etiquetados com fluorescência contra as moléculas de superfície da célula

Os anticorpos monoclonais reativos a antígenos cinomolgos foram obtidos a partir de Becton Dickinson (¹Cat. nº 345784, ²Cat. nº 556647, ³Cat. nº 552851, ⁶Cat. nº 557710), Beckman Coulter (⁴Cat. nº IM2470) e Miltenyi (⁵Cat. nº 130-091-732) e usados de acordo com as recomendações do fabricante. As células 5×10^5 – 1×10^6 foram manchadas com as combinações de anticorpos a seguir: anti-CD14¹ (FITC) x anti-CD56² (PE) x anti-CD3³ (PerCP) x anti-CD19⁴ (APC) e anti-CD14¹ (FITC) x anti-CD33⁵ (PE) x anti-CD16⁶ (Alexa Fluor 647™). As etapas adicionais foram realizadas conforme descrito no exemplo 13, acima.

30 Detecção por citometria de fluxo de linfócitos manchados por FACS

A coleta de dados foi realizada com um FACSCalibur™ 4 color BD (Becton Dickinson). Para cada medição, células 1×10^4 de subpopulações definidas de linfócito foram adquiridas. Foi realizada uma análise estatística com o programa CellQuest Pro™ (Becton Dickinson) para a obtenção das porcentagens de subpopulação de linfócitos e para classificar a intensidade de expressão molecular da superfície celular. Subsequentemente, as porcentagens de subconjuntos de linfócito únicos relacionadas aos linfócitos totais (isto é, células B mais T mais NK excluindo as células mielóides por meio do manchamento de CD14) conforme determinado por FACS foram correlacionadas com a conta de linfócito a partir da análise sanguínea diferencial para calcular números absolutos de célula das células T ($CD3^+$, $CD56^-$, $CD14^-$). Os números absolutos de monócitos de CD33-positivo foram calculados mediante a multiplicação das contagens de monócito a partir da análise de sangue diferencial com as razões correspondentes de monócitos de CD33-positivo ($CD33^+$, $CD14^+$) em relação a todos os monócitos ($CD14^+$) conforme determinado por FACS.

A porcentagem comparada com a linha de base (isto é, 100%) de contagens de monócito de CD33-positivo de circulação absoluta ao final do tratamento com CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL em 4 coortes de 2 macacos cinomolgos com um escalonamento de dose inter-coorte de 30 a mais de 60 e 240 a $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ conforme mostrado na figura 26 A.

Conforme mostrado na figura 26 A, a infusão intravenosa contínua de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL induz a depleção de monócitos de CD33 positivo de circulação de uma maneira dose dependente. Enquanto ainda não houve uma depleção de monócitos de CD33 positivo em circulação detectável a $30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, uma primeira tendência em direção a uma redução de contagens de monócito de CD33-positivo se tornou visível a $60 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ após 7 dias de tratamento. A $240 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, os monócitos de CD33 positivos de circulação foram quase completamente depletados do sangue periférico após 3 dias de tratamento. Isto foi alcançado ainda mais rápido a $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, em que a depleção dos monócitos de CD33 positivos de circulação do sangue periférico ficou completamente pronta

após 1 dia de tratamento.

Esta descoberta foi confirmada através dos resultados mostrados na figura 26 B demonstrando a depleção de monócitos de CD33 positivos de circulação por dois terços e 50% em comparação com a linha de base respectiva em dois macacos cinomolgos tratados por infusão contínua com CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL a 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ durante 14 dias.

Esse resultado é uma eficácia clínica de sinal claro das moléculas de aglutinação de CD3 da invenção em geral e de moléculas de aglutinação de CD3 direcionadas a CD33 biespecíficas da invenção para o tratamento de malignomas de CD33-positivo como AML em particular. Além disso, a redistribuição de célula T durante a fase inicial de tratamento com CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL na presença de células alvo em circulação (isto é, monócitos de CD33-positivo) parece ser menos pronunciada que a redistribuição de célula T durante a fase inicial de tratamento com constructos de CD19xCD3 convencionais, conforme descrito no documento WO99/54440 em pacientes com B-NHL com um número significativo de células alvo em circulação (isto é, células B de CD19-positivo) conforme mostrado na figura 22. Enquanto as células T desaparecem completamente de circulação mediante o início da infusão de CD19xCD3 e não reaparecem até que as células B alvo com CD19 positivo em circulação são depletadas do sangue periférico (figura 22), o desaparecimento inicial das células T em circulação é incompleto mediante o início da infusão com CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL e a recuperação das contagens de célula T ainda durante a presença de células alvo com CD33-positivo em circulação (figura 26 B). Isto confirma que as moléculas de aglutinação de CD3 da invenção (direcionadas contra e geradas contra um epítipo de ser humano e cadeia (épsilon) CD3 ϵ de primatas que não são chimpanzé e sendo uma parte ou fragmento ou o comprimento total da sequência de aminoácidos conforme fornecido na SEQ ID nº 2, 4, 6, ou 8) mediante o reconhecimento de um epítipo de CD3 contexto-independente mostra um perfil de redistribuição de célula T mais favorável que as moléculas de ligação de CD3 convencionais reconhecendo um epítipo de CD3 contexto dependente,

como as moléculas de aglutinação fornecidas em WO99/54440.

15. Moléculas de aglutinação de CD3 da invenção direcionadas em epitopos de CD3 essencialmente contexto-independentes mediante a indução de uma menor redistribuição de células T em circulação na ausência de células alvo em circulação reduzem o risco de eventos adversos relacionados ao início do tratamento

Redistribuição reduzida de célula T em macacos cinomolgos seguindo o início do tratamento com uma molécula de aglutinação de CD3 específica de espécies cruzadas representativa

A MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL (sequência de aminoácidos: SEQ ID N°. 193) foi produzida mediante a expressão nas células de CHO com o uso da codificação da sequência de nucleotídeos SEQ ID N°. 194. As sequências de codificação de (i) um líder de cadeia pesada de imunoglobulina Terminal N compreendendo um códon inicial incorporado em uma sequência consenso de Kozak e (ii) uma etiqueta His6 Terminal C – seguida por um códon de parada foram ambos fixados em quadro à sequência de nucleotídeos SEQ ID N°. 194 antes da inserção do fragmento de DNA resultante conforme obtido pela síntese genética nos múltiplos sítios de clonagem do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150). A transfecção estável das células de CHO deficientes em DHFR, seleção de transfectantes de DHFR-positivo que secretam a molécula de aglutinação de CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL no sobrenadante de cultura e a amplificação de gene com metotrexato para aumentar os níveis de expressão foram executados conforme descrito (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021 a 7025). O material de teste para o tratamento de macacos cinomolgos foi produzido em um fermentador de 200 litros. A purificação de proteína a partir da colheita teve como base a cromatografia de afinidade IMAC alvejando a etiqueta de His6 Terminal C de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL seguida pela cromatografia preparativa por exclusão de tamanho (SEC). O rendimento total do material de teste sem endotoxina final foi de 40 mg. O material de teste consistiu em 70% de monômero,

30% de dímero e em uma pequena contaminação de multímero superior. A potência do material de teste foi medida em um ensaio de citotoxicidade conforme descrito no exemplo 11 com o uso de células de CHO transfectadas com MCSP cinomolgo como células alvo e a linhagem de célula T de macaco 4119LnPx como
5 fonte de células efectoras (figura 27). A concentração de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL exigida para a lise de célula alvo de meia altura através das células efectoras T (EC50) foi determinada para ser de 1,9 ng/ml.

Os macacos cinomolgos adultos (aproximadamente 3 anos de idade) jovens (*Macaca fascicularis*) foram tratados por infusão intravenosa contínua de
10 CD3 aglutinando a molécula MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL com diferentes taxas de fluxo (isto é, níveis de dosagem) para estudar a redistribuição de células T em circulação seguindo a iniciação do tratamento na ausência de células alvo em circulação. Embora a molécula de aglutinação de CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL possa reconhecer ambos o MCSP cinomolgo quanto o CD3 cinomolgo, não há
15 células sanguíneas circulantes que expressam MCSP. Portanto, a única interação possível no sangue em circulação é a aglutinação do braço de CD3-específico de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL a CD3 nas células T. Essa situação é equivalente ao tratamento com a molécula de ligação de CD3 convencional (Molécula de ligação CD19xCD3 específica para CD19 em células B e CD3 em células T)
20 daqueles pacientes com B-NHL que não têm células B alvo com CD19 positivo em circulação conforme descrito no exemplo 13.

A infusão contínua foi executada de acordo com o método de Swivel da seguinte maneira: Os macacos são cateterizados através da veia femoral até a veia cava caudal com o uso de um cateter de veia. O cateter é colocado
25 subcutaneamente formando um túnel na região dorsal do ombro e exteriorizado na escápula caudal. Então, um tubo é passado através de um invólucro e uma mola de proteção. O invólucro é apertado em torno do animal e do cateter e, através do tubo, é conectado a uma bomba de infusão.

A solução de administração (1,25 M de lisina, 0,1% de tween 80, pH
30 7) sem o material de teste foi submetida à infusão continuamente a 48 ml/24h

durante 7 dias antes do início do tratamento para permitir a aclimatização dos animais para as condições de infusão. O tratamento foi iniciado mediante a adição do material de teste MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL à solução de administração com a quantidade exigida para cada nível de dose individual a ser testada (isto é, taxa de fluxo de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL). O reservatório de infusão foi alterado todos os dias durante toda a fase de aclimatização de tratamento. A duração do tratamento foi de 7 dias.

Os cursos de tempo de contagens de célula T absolutas no sangue periférico foram determinados mediante a análise de FACS de quatro cores da seguinte maneira:

Coleta de amostras de sangue e análise de rotina

As amostras de sangue (1 ml) foram obtidas antes e 0,75, 2, 6, 12, 24, 30, 48, 72 horas após o início da infusão contínua com MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL bem como após 7 dias de tratamento com o uso de tubos Vacutainer™ contendo EDTA (Becton Dickinson) que foram enviados para análise a 4°C. Em alguns casos as leves variações desses pontos de tempo ocorreram por razões operacionais. A análise de FACS de subpopulações de linfócito foi realizada no período de 24 a 48 h após a coleta da amostra de sangue. Os números absolutos de subpopulações de leucócito nas amostras de sangue foram determinados através da análise de sangue diferencial em um laboratório veterinário de rotina.

Isolamento de PBMC das amostras de sangue

O PBMC foi isolado em analogia ao protocolo descrito no exemplo 13, acima, com adaptações dos volumes usados.

Manchamento de PBMC com anticorpos etiquetados com fluorescência contra as moléculas da superfície da célula

Os anticorpos monoclonais reativos aos antígenos cinomolgos foram obtidos junto a Becton Dickinson (¹Cat. nº 345784, ²Cat. nº 556647, ³Cat. nº 552851) e Beckman Coulter (⁴Cat. nº IM2470) usados de acordo com as recomendações do fabricante. As células 5×10^5 – 1×10^6 foram manchadas com a combinação de anticorpo a seguir: anti-CD14¹ (FITC) x anti-CD56² (PE) x anti-

CD3³ (PerCP) x anti-CD19⁴ (APC). As etapas adicionais foram realizadas conforme descrito no exemplo 13 acima.

Deteção por citometria de fluxo de linfócitos manchados por FACS

5 A coleta de dados foi realizada com um FACSCalibur™ BD de 4 cores (Becton Dickinson). Para cada medição, as células 1×10^4 de subpopulações definidas de linfócito foram adquiridas. A análise estatística foi realizada com o programa CellQuest Pro™ (Becton Dickinson) para a obtenção de porcentagens de subpopulação de linfócitos e para classificar a intensidade de expressão molecular da superfície celular. Subsequentemente, as porcentagens de subconjuntos de linfócito únicos relacionadas aos linfócitos totais (isto é, células B mais T mais NK excluindo as células mielóides por meio do manchamento de CD14) conforme determinado por FACS foram correlacionadas com a contagem de linfócito a partir da análise de sangue diferencial para calcular os números absolutos de célula das células T (CD3⁺, CD56⁻, CD14⁻).

A redistribuição de célula T durante a fase inicial de tratamento com MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL em macacos cinomolgos com níveis de dosagem de 60, 240 e 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ é mostrada na figura 28. Esses animais não apresentaram sinais de nenhuma maneira de qualquer redistribuição de célula T durante a fase inicial do tratamento, isto é, as contagens de célula T em vez de aumentarem diminuíram mediante a iniciação de tratamento. Essa redistribuição de célula T dada é observada de maneira consistente em 100% dentre todos os pacientes sem células alvo circulantes, mediante a iniciação de tratamento com a molécula de ligação de CD3 convencional (por exemplo, constructo CD19xCD3 conforme descrito no documento WO 99/54440) contra um epitopo de CD3 contexto-dependente, demonstrou-se que substancialmente uma menor redistribuição de célula T na ausência de células alvo circulantes mediante iniciação de tratamento pode ser observada com uma molécula de aglutinação de CD3 da invenção direcionada e gerada contra um epitopo de se humano, uma cadeia de Épsilon de CD3 de primata não chimpanzé conforme definido pela

sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre as SEQ ID N^o: 2, 4, 6, ou 8 ou um fragmento das mesmas. Isto está em contraste claro em relação às moléculas de aglutinação de CD3 direcionadas contra um epitopo de CD3 contexto-dependente, como os constructos descritos no documento WO 99/54440. As

5 moléculas de aglutinação contra os epitopos de CD3 contexto-independentes, conforme (inter alia) fornecidas em qualquer uma dentre as SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6, ou 8 (ou fragmentos dessa sequências) fornecem a isso substancialmente uma menor (detrimental e não-desejada) redistribuição de célula T. Como a redistribuição de célula T durante a fase inicial do tratamento com moléculas de aglutinação de CD3

10 é um fator de risco principal para os eventos adversos de CNS, as moléculas de aglutinação de CD3 fornecidas no presente documento e capazes de reconhecerem um epitopo de CD3 contexto-independente têm uma vantagem substancial sobre as moléculas de aglutinação de CD3 conhecidas na técnica e são direcionadas contra os epitopos de CD3 contexto-dependentes. De fato,

15 nenhum dos macacos cinomolgos tratados com MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL apresentou quaisquer sinais de sintomas de CNS.

A independência de contexto do epitopo de CD3 é fornecida nessa invenção e corresponde aos primeiros 27 aminoácidos Terminais N de Épsilon de CD3) ou fragmentos dessa extensão de 27 aminoácidos. Esse epitopo contexto-

20 independente é retirado de seu ambiente nativo no complexo de CD3 e fundido às sequências de aminoácidos heterólogos sem perda em sua integridade estrutural. As moléculas de aglutinação anti-CD3 conforme fornecido no presente documento e gerado (e direcionado) contra um epitopo de CD3 contexto-independente proporcionam um aprimoramento clínico surpreendente que diz respeito à

25 redistribuição de célula T e, dessa forma, um perfil de segurança mais favorável. Sem se ater à teoria, visto que seu epitopo de CD3 é contexto-dependente, a formação de um subdomínio auto-suficiente autônomo sem muita influência sobre o resto do complexo de CD3, as moléculas de aglutinação de CD3 fornecidas na presente invenção induzem menores alterações alostéricas na conformação de

30 CD3 em comparação com as moléculas de ligação de CD3 convencionais (como

as moléculas fornecidas no documento WO 99/54440), as quais reconhecem os epitopos de CD3 dependentes de contexto como as moléculas fornecidas no documento WO 99/54440. Como uma consequência (novamente sem se ater à teoria), a indução do recrutamento de Nck2 intracelular pelas moléculas de aglutinação de CD3 fornecidas no presente documento também é reduzida resultando em uma alteração de isoforma menor de integrinas de célula T e uma menor adesão de células T em relação às células endoteliais. É preferencial que as preparações das moléculas de aglutinação de CD3 da invenção (direcionadas contra e geradas contra um epítipo contexto-dependente conforme definido no presente documento) consistam essencialmente de moléculas monoméricas. Essas moléculas monoméricas são ainda mais eficientes (do que moléculas diméricas ou multiméricas) na evitação da redistribuição de célula T e, dessa forma, do risco de eventos adversos de CNS durante a fase inicial do tratamento.

16. Geração e caracterização de moléculas de cadeia única

biespecíficas com especificidade de espécies cruzadas CD33 e CD3

16.1. Geração de células de CHO que expressam CD33 de ser humano

A sequência de codificação de ser humano CD33 conforme publicado no GenBank (número de acesso NM_001772) foi obtida mediante a síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi projetado de modo a conter primeiramente um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo, seguido por um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos, seguido em quadro pela sequência de codificação da proteína de CD33 de ser humano adulto, seguido em quadro pela sequência de codificação do peptídeo de glicina e serina, uma etiqueta de histidina₆ e um códon de parada (a sequência de aminoácidos e de cDNA do constructo está listada sob a SEQ ID N^{os} 305 e 306). O fragmento de síntese genética também foi projetado de modo a introduzir sítios de restrição ao início e ao final do fragmento. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na 5' extremidade e Sall na 3' extremidade foram utilizados nos procedimentos de clonagem a seguir. O fragmento de síntese genética foi

clonado por meio de EcoRI e Sall formando um plasmídeo chamado de pEF-DHFR (pEF-DHFR está descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo os protocolos padrão. Os procedimentos supracitados foram executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com uma sequência de nucleotídeos verificada por sequência foi transfectado em células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão da proteína eucariótica nas células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida mediante o aumento das concentrações de metotrexato (MTX) até uma concentração final de até 20 nM MTX.

16.2. Geração de células de CHO que expressam o domínio extracelular de símio CD33

A sequência de cDNA de símio CD33 foi obtida por um conjunto de 3 PCRs em cDNA da medula óssea de um macaco símio preparada de acordo com protocolos padrão. Condições de reação a seguir: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos seguido por 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos seguido de um ciclo terminal de 72°C durante 3 minutos e os seguintes iniciadores foram usados:

1. Iniciador direto: 5'-

gaggaattcaccatgccgctgctgctactgctgccctgctgtgggcaggggccctggctatgg-3' (SEQ ID nº 369)

iniciador reverso: 5'-gatttgtaactgtatttggtacttcc-3' (SEQ ID nº 370)

2. Iniciador direto: 5'-attccgcctccttggggatcc-3' (SEQ ID nº 371)

iniciador reverso: 5'-gcataggagacattgagctggatgg-3' (SEQ ID nº 372)

3. Iniciador direto: 5'-gcaccaacctgacctgtcagg-3' (SEQ ID nº 373)

iniciador reverso: 5'-agtgggtcgactcactgggtcctgacctctgagtattcg-3' (SEQ ID nº 374)

Esses PCRs geram três fragmentos sobrepostos, os quais foram

isolados e sequenciados de acordo com protocolos padrão com o uso de iniciadores de PCR, e dessa forma forneceram uma porção da sequência de cDNA do sítio CD33 a partir do segundo nucleotídeo de códon +2 até o terceiro nucleotídeo de códon +340 da proteína madura. Para gerar um constructo para a

5 expressão de sítio CD33, um fragmento de cDNA foi obtido mediante a síntese genética de acordo com protocolos padrão (o cDNA e a sequência de aminoácidos do constructo estão listados sob a SEQ ID N^{os} 307 e a 308). Nesse constructo, a sequência de codificação de sítio CD33 do aminoácido +3 a +340 da proteína de CD33 madura foi fundida à sequência de codificação de ser humano CD33

10 substituindo a sequência de codificação de ser humano dos aminoácidos +3 a +340. O fragmento de síntese genética também foi projetado de modo a conter um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo e dos sítios de restrição ao início e ao final do fragmento contendo a codificação de cDNA para essencialmente todo o domínio extracelular de sítio CD33, sendo que o domínio

15 de transmembrana de sítio CD33 e um domínio de CD33 intracelular quimérico de sítio-humano. Os sítios de restrição introduzidos XbaI na 5' extremidade e SalI na 3' extremidade foram utilizados nos procedimentos de clonagem a seguir. O fragmento de síntese genética foi, então, clonado por meio de XbaI e SalI em um plasmídeo chamado de pEF-DHFR (pEF-DHFR está descrito em Raum et al.

20 Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150). Um clone de sequência verificada desse plasmídeo foi usado para transfectar as células CHO/dhfr conforme descrito acima.

16.3. Geração de moléculas de anticorpo biespecífico específico para espécies cruzadas CD33 e CD3

25 **Clonagem de moléculas de aglutinação específicas para espécies cruzadas**

Em geral, cada uma das moléculas de anticorpo biespecífico que compreende um domínio com espécies cruzadas com especificidade de aglutinação específicas para Épsilon de CD3 de primata não chimpanzé e ser

30 humano bem como um domínio com espécies cruzadas com especificidade de

aglutinação específicas para CD33 de primata não chimpanzé e ser humano foi projetada conforme preparado na tabela 5 a seguir:

Tabela 5: Formatos de moléculas biespecíficas específicas para espécies cruzadas anti-CD3 e anti-CD33

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
276/275	AH11HLxH2CHL
258/257	AH3HLxH2CHL
270/269	AC8HLxH2CHL
264/263	AF5HLxH2CHL
288/287	F2HLxH2CHL
300/299	E11HLxH2CHL
282/281	B3HLxH2CHL
294/293	B10HLxH2CHL
278/277	AH11HLxF12QHL
260/259	AH3HLxF12QHL
272/271	AC8HLxF12QHL
266/265	AF5HLxF12QHL
290/289	F2HLxF12QHL
302/301	E11HLxF12QHL
284/283	B3HLxF12QHL
296/295	B10HLxF12QHL
280/279	AH11HLxI2CHL
262/261	AH3HLxI2CHL
274/273	AC8HLxI2CHL
268/267	AF5HLxI2CHL
292/291	F2HLxI2CHL
304/303	E11HLxI2CHL

286/285	B3HLxI2CHL
298/297	B10HLxI2CHL

Os constructos supracitados contendo espécies cruzadas de domínios de cadeia leve variável (L) e cadeia pesada variável (H) específicos para ser CD33 humana e símia e as espécies cruzadas de combinações VH e VL de CD3 específicas para CD3 humana e símia foram obtidas por meio de síntese genética. Os fragmentos de síntese genética foram projetados e a expressão de proteína eucariótica foi realizada de maneira similar conforme descrito no exemplo 9 sobre o MCSP e sobre as moléculas de cadeia única específicas para espécies cruzadas de CD3.

O mesmo é válido para a expressão e purificação das moléculas de cadeia única específicas para espécies cruzadas de CD33 e CD3.

No teste Western Blot, uma única banda foi detectada a 52 kD correspondendo ao anticorpo biespecífico purificado.

16.4. Análise de aglutinação de citometria de fluxo dos Anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de CD33 e CD3

A fim de testar a funcionalidade dos constructos de anticorpo biespecífico específico para espécies cruzadas com respeito à capacidade de se aglutinar ao CD33 e CD3 humano e símio, respectivamente, uma análise de FACS foi realizada de maneira similar à análise descrita com relação à análise dos anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de MCSP e CD3 no exemplo 10 com o uso de células de CHO que expressam os domínio extracelulares de CD33 humano ou símio (consulte o exemplo 16,1 e 16,2).

A aglutinação específica do CD3 primata não chimpanzé e ser humano das moléculas de aglutinação de CD3 da invenção foi claramente detectável conforme mostrado na figura 29. Nas análise de FACS, todos os constructos apresentaram uma aglutinação ao CD3 e CD33 em comparação com os controles negativos respectivos. A especificidade das espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos em relação aos antígenos de CD3 e CD33 humano e símio é demonstrada.

16.5. Bioatividade de Anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de CD33 e CD3

A bioatividade dos anticorpos biespecíficos gerados foi analisada por meio de ensaios de citotoxicidade in vitro de liberação de cromo 51 (^{51}Cr) com o uso das linhagens celulares de CD33 positivo descritas nos exemplos 16,1 e 16,2. Como as células efetoras estimularam o CD4/CD56 humano, o PBMC depletado ou a linhagem de célula T símia 4119LnPx foram usados conforme especificado nas respectivas figuras. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de maneira similar à configuração descrita em relação à análise de bioatividade dos anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de MCSP e CD3 no exemplo 11 com o uso de células de CHO que expressam os domínios extracelulares de CD33 humano ou símio (veja o exemplo 16.1 e 16.2) como células alvo.

Conforme mostrado na figura 30, todos os constructos biespecíficos específicos para espécies cruzadas gerados demonstram a atividade citotóxica contra as células alvo de CD33 positivo de humano obtidas por PBMC depletado de CD4/CD56 de ser humano estimulado e contra células alvo de CD33 positivo de símio obtidas através da linhagem de célula T de macaco 4119LnPx.

17. Purificação de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas através de um procedimento de afinidade com base no epítipo de épsilon de CD3 contexto-independente que corresponde aos aminoácidos 1-27 Terminais N

17.1 Geração de uma coluna de afinidade exibindo o epítipo de épsilon de CD3 humano contexto-independente isolado que corresponde aos aminoácidos 1-27 Terminais N

O plasmídeo para a expressão do CD3-Fc de constructo 1-27 que consiste dos aminoácidos Terminais N 1-27 da cadeia de épsilon de CD3 humano fundida à região de junta e Fc gama da imunoglobulina IgG1 de ser humano descrita acima (Exemplo 3; a sequência de cDNA e a sequência de aminoácidos da proteína de fusão recombinante estão listadas nas SEQ ID N^{os} 230 e 229) foi transfectado em células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica

do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida mediante o aumento das concentrações de metotrexato (MTX) até uma

5 concentração final de até 20 nM MTX. Após duas passagens de cultura estacionária, as células foram cultivadas em garrafas rotatórias com um meio de soja líquida HyQ PF CHO sem nucleosídeo (com 4,0 mM de L-Glutamina com 0,1% de Pluronic F – 68; HyClone) durante 7 dias antes da colheita. As células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante contendo a proteína expressa

10 foi armazenado a -20°C. Para o isolamento da proteína de fusão, uma coluna de afinidade de fc anti-humano de cabra foi preparada de acordo com os protocolos padrão com uso de um anticorpo específico comercialmente disponível para o fragmento fc de igG anti-humano de cabra purificado de afinidade com uma reação cruzada mínima em relação às proteínas de soro de boi, cavalo, e camundongo

15 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). Com o uso dessa coluna de afinidade, a proteína de fusão foi isolada para fora do sobrenadante de cultura de célula em um sistema Äkta Explorer System (GE Amersham) e eluída com ácido cítrico. O eluído foi neutralizado e concentrado. Após a diálise contra o tampão de acoplamento sem amina, a proteína de fusão purificada foi acoplada a uma coluna HiTrap de

20 1 ml ativada por N-Hidróxi-Succinimida NHS (GE Amersham).

Após o acoplamento, os grupos NHS restantes foram bloqueados e a coluna foi lavada e armazenada a 5°C em um tampão de armazenamento contendo 0,1% de azido de sódio.

25 17.2 Purificação de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas com o uso de uma coluna de afinidade de peptídeo de CD3 humano

200 ml do sobrenadante de cultura de célula de células que expressam moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas foram 0,2 µm estéreis filtrados e aplicados à Coluna de afinidade de

30 peptídeo CD3 com o uso de um sistema Äkta Explorer system (GE Amersham).

A coluna foi, então, lavada com uma solução salina tamponada de fosfato PBS com pH de 7,4 para lavar amostra não ligada. A eluição foi realizada com um tampão ácido com pH de 3,0 contendo 20 mM de ácido cítrico e 1 M de cloreto de sódio. A proteína eluída foi neutralizada imediatamente com 1 M de Trishidroximetilamina TRIS com pH de 8,3 contido nos tubos de coleta do coletor de frações.

A análise de proteína foi realizada por SDS PAGE e teste Western Blot.

Para o géis BisTris SDS PAGE, são usados de 4 a 12% (Invitrogen).

O tampão de corrida foi 1 x MES-SDS-Puffer (Invitrogen). Como um padrão de proteína, 15 µl de Sharp Protein Standard prémanchado (Invitrogen) foram aplicados. A eletroforese foi realizada durante 60 minutos com 120 mA max de 200 volts. Os géis foram lavados em água desmineralizada e manchada com Coomassie durante uma hora. Os géis são submetidos à remoção de mancha em água desmineralizada durante 3 anos. A fotos são tiradas com um sistema de documentação de gel da Syngene.

Para Teste Western Blot, um dobro do gel SDS PAGE foi gerado e as proteínas foram analisadas por sistema electroblotting sobre uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com 2% de albumina de soro bovino em PBS e incubada com um anticorpo Penta His de murino biotinilado (Qiagen). Como um reagente secundário, um conjugado de fosfatase alcalina-estreptavidina (DAKO) foi usado. As borrões foram desenvolvidos com uma solução de substrato de BCIP/NBT (Pierce).

Conforme demonstrado nas figuras 31, 32 e 33, o uso de uma coluna de afinidade de peptídeo de CD3 humano conforme descrito acima permite a purificação altamente eficiente das moléculas de cadeia única biespecíficas do sobrenadante de cultura de célula. Os anticorpos de cadeia única anti-CD3 específicos para espécies cruzadas contidas nas moléculas de cadeia única biespecíficas permitem, portanto, através de suas propriedades de aglutinação específicas, um método de purificação em uma etapa genérica eficiente para as

moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas, sem a necessidade de quaisquer etiquetas fixadas somente por razões de purificação.

18. Ensaio farmacocinético genérico para as moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas

5 18.1 Produção de 1-27 CD3-Fc para uso no ensaio farmacocinético

A sequência de codificação dos aminoácidos Terminais N 1-27 da cadeia de épsilon de CD3 humano fundida à região de junta e Fc gama de imunoglobulina de IgG1 de ser humano foi obtida mediante a síntese genética de acordo com os protocolos padrão (a sequência de cDNA e a sequência de aminoácidos da proteína de fusão recombinante estão listadas em SEQ ID N^{os} 309 e 310). O fragmento de síntese genética foi projetado de modo a conter primeiramente um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo, seguido por um peptídeo líder de imunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido em quadro pela sequência de codificação dos primeiros 27 aminoácidos da porção extracelular da cadeia de épsilon de CD3 de um ser humano maduro, seguido em quadro pela sequência de codificação da porção de Fc gama e da região de junta de IgG1 de ser humano e um códon de parada. O fragmento de síntese genética também foi projetado e clonado conforme descrito no exemplo 3.1, acima. Um clone com sequência de nucleotídeos verificado por sequência foi transfectado nas células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica nas células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito no exemplo 9, acima. Para o isolamento da proteína de fusão, uma coluna de afinidade de fc de cabra anti-humano foi preparada de acordo com os protocolos padrão com o uso de um anticorpo específico comercialmente disponível para o fragmento fc de igG anti-humano de cabra purificado de afinidade com a reação cruzada mínima em relação às proteína de soro bovino, de cavalo, e camundongo (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). Com o uso dessa coluna de afinidade, a proteína de fusão foi isolada para fora do sobrenadante de cultura de célula em um sistema Äkta Explorer System (GE Amersham) e foi eluída com ácido cítrico. O eluado foi neutralizado e concentrado.

18.2 Ensaio farmacocinético de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas

O ensaio tem como base a tecnologia ECL-ELISA com o uso da detecção etiquetada por rutênio em placas de carbono medidas em um dispositivo

5 Sektor Imager (MSD). Em uma primeira etapa, as placas de carbono (MSD Placa de Alta Aglutinação com 96 cavidades Cat: L15xB-3) foram revestidas com 5 µl/cavidade a 50 ng/ml do 1-27 CD3-Fc purificado descrito no exemplo 18.1. A placa foi, então, seca de um dia para o outro a 25°C. Subsequentemente, as placas foram bloqueadas com 5% de BSA (Paesel&Lorei #100568) em PBS a 150

10 µl/cavidade durante 1h a 25°C em um incubador enquanto eram agitadas (700 rpm). Na próxima etapa, as placas foram lavadas por três vezes com 0,05% de Tween em PBS. Uma curva padrão em 50% de soro de símio em PBS foi gerada com uma diluição de 1:4 serial começando com 100 ng/ml da molécula de cadeia única biespecífica específica para as espécies cruzadas respectiva a ser detectada

15 no ensaio. As amostras de controle de qualidade (QC) foram preparadas em 50% de soro de símio em PBS na faixa de 1 ng/ml a 50 ng/ml da molécula de cadeia única biespecífica específica para as espécies cruzadas respectiva que depende das concentrações esperadas de soro da amostra. As amostras padrão, QC ou desconhecidas foram transferidas para as placas de carbono a 10 µl/cavidade e

20 foram incubadas durante 90 minutos a 25°C no incubador enquanto eram agitadas (700 rpm). Subsequentemente, as placas foram lavadas três vezes com 0,05% de Tween em PBS. Para a detecção, 25 µl/cavidade do anticorpo penta-His-Biotina (Qiagen, 200 µg/ml em 0,05% de Tween em PBS) foram adicionadas e incubadas durante 1 hora a 25°C em um incubador enquanto eram agitadas (700 rpm). Em

25 uma segunda etapa de detecção, 25 µl/cavidade de uma solução de Streptavidin-SulfoTag (MSD; Cat: R32AD-1; Lot: W0010903) foram adicionados e incubados durante 1 hora a 25°C em um incubador enquanto eram agitados (700 rpm). Subsequentemente, as placas foram lavadas três vezes com 0,05% de Tween em PBS. Finalmente, 150 µl/cavidade de um tampão de leitura Reading Buffer da MSD

30 (MSD, Cat: R9ZC-1) foram adicionados e as placas foram lidas no dispositivo

Sektor Imager.

As figuras 34 e 35 demonstram a possibilidade de detecção de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas em amostras de soro de macacos símios para moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas. Os anticorpos de cadeia única anti-CD3 específicos para espécies cruzadas contidos nas moléculas de cadeia única biespecíficas permitem, portanto, por meio de suas propriedades de aglutinação específicas um ensaio genérico altamente sensível para a detecção das moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas. O ensaio mencionado acima pode ser usado no contexto dos estudos toxicológicos formais que são necessários para o desenvolvimento da droga e pode ser facilmente adaptado para a medição de amostras de paciente em conexão com a aplicação clínica de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas.

19. Geração de proteínas de fusão transmembrana recombinantes dos aminoácidos 1-27 Terminais N de Épsilon de CD3 a partir de diferentes primatas não chimpanzé fundidas a EpCAM a partir de um macaco cinomolgo (1-27 CD3-EpCAM).

19.1 Clonagem e expressão de 1-27 CD3-EpCAM

Épsilon de CD3 foi isolado de diferentes primatas não chimpanzé (marmoset, sagui, macaco de cheiro) e suíno. As sequências de codificação dos aminoácidos Terminais N 1-27 da cadeia de Épsilon de CD3 do ser humano maduro, marmoset comum (*Callithrix jacchus*), Mico de cabeça branca (*Saguinus oedipus*), macaco de cheiro comum (*Saimiri sciureus*) e suíno doméstico (*Sus scrofa*; usado como controle negativo) fundidas ao Terminal N de EpCAM cinomolgo marcado por flag tag foram obtidas mediante a síntese genética de acordo com os protocolos padrão (a sequência de cDNA e as sequências de aminoácidos das proteínas de fusão recombinantes estão listadas em SEQ ID N^{os} 231 a 240). Os fragmentos de síntese genética foram projetados de modo a conterem primeiramente um sítio de BsrGI para permitir a fusão em um quadro de

leitura correto com a sequência de codificação de um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos já presentes no vetor de expressão alvo, o qual foi seguido em quadro pela sequência de codificação dos aminoácidos Terminais N 1-27 da porção extracelular das cadeias de épsilon de CD3 maduro, 5 que foi seguida em quadro pela sequência de codificação de um flag tag e seguida em quadro pela sequência de codificação da proteína transmembrana de EpCAM cinomolgo maduro. Os fragmentos de síntese genética também foram projetados para introduzirem um sítio de restrição ao final da codificação de cDNA para a proteína de fusão. A BsrGI dos sítios de restrição introduzidos na extremidade 5' e 10 Sall na extremidade 3' foram utilizados nos procedimentos de clonagem a seguir. Os fragmentos de síntese genética foram, então, clonados por meio de BsrGI e de Sall em um derivado do plasmídeo projetado pEF-DHFR (pEF-DHFR está descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150), que já contém 15 a sequência de codificação do peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos seguindo os protocolos padrão. Os plasmídeos verificados por sequência foram usados para transfectar células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica nas células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene 20 do constructo foi induzida mediante o aumento das concentrações de metotrexato (MTX) até uma concentração final de até 20 nM MTX.

Os transfectantes foram testados quanto à expressão de superfície de célula da proteína transmembrana recombinante por meio de um ensaio FACS de acordo com protocolos padrão. Para este propósito, inúmeras células $2,5 \times 10^5$ 25 foram incubadas com 50 μ l do anticorpo anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha) a 5 μ g/ml em PBS com 2% de FCS. O anticorpo de ligação foi detectado com um fragmento F(ab')₂ purificado de afinidade conjugada de R-Ficoeritrina, IgG de cabra anti-camundongo, fragmento Fc-gama específico 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., 30 Newmarket, Suffolk, UK). A citometria de fluxo foi realizada em um aparelho FACS-

Calibur, o software CellQuest foi usado na aquisição e análise dos dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). O manchaento de FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram realizados conforme descrito no documento Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e
5 Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A expressão das proteínas de fusão transmembrana recombinantes marcadas por flag tag consiste em EpCAM cinomolgo e nos aminoácidos Terminais N 1-27 de ser humano, marmoset, sagui, macaco de cheiro e a cadeia de épsilon de CD3 de suíno respectivamente em células transfectadas é
10 claramente detectável (figura 36).

19.2 Clonagem e expressão do anticorpo de cadeia única anti-CD3 específico para espécies cruzadas I2C HL sob a forma de um anticorpo IgG1

A fim de fornecer meios aprimorados de detecção de aglutinação do anticorpo anti-CD3 de cadeia única específico para espécies cruzadas, a
15 especificidade de I2C VHVL é convertida em um anticorpo IgG1 com regiões constantes kappa de murino e IgG1 de murino. As sequências cDNA codificam a cadeia pesada do anticorpo IgG foram obtidas mediante a síntese genética de acordo com protocolos padrão. Os fragmentos de síntese genética foram projetados de modo a conterem primeiramente um sítio de Kozak para permitir a
20 expressão eucariótica do constructo, que é seguida por um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos, que é seguida em quadro pela sequência de codificação da região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia leve, seguida em quadro pela sequência de codificação da região constante de cadeia pesada de IgG1 de murino conforme publicado no GenBank (Número de acesso
25 AB097849) ou a sequência de codificação da região constante de cadeia leve de kappa de murino conforme publicado no GenBank (Número de acesso D14630), respectivamente.

Os sítios de restrição foram introduzidos ao início e ao final do cDNA codificar a proteína de fusão. Os sítios de restrição EcoRI na extremidade 5' e Sall
30 na extremidade 3' foram usados nos procedimentos de clonagem a seguir. Os

fragmentos de síntese genética foram clonados por meio de EcoRI e Sall em um plasmídeo chamado de pEF-DHFR (pEF-DHFR está descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) para o constructo de cadeia pesada e pEFADA (pEFADA está descrito em Raum et al. loc cit.) para o

5 constructo de cadeia leve de acordo com protocolos padrão. Os plasmídeos verificados por sequência foram usados na co-transfecção de constructos de cadeia pesada e leve respectivamente em células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por

10 Kaufmann R.J. (1990) loc cit. A amplificação de gene dos constructos foi induzida mediante o aumento das concentrações de metotrexato (MTX) até uma concentração final de até 20 nM MTX e deoxicoformicina (dCF) até uma concentração final de até 300 nM dCF. Após duas passagens da célula de cultura estacionária, o sobrenadante de cultura foi coletado e usado no experimento

15 subsequente.

19.3 Aglutinação do anticorpo de cadeia única anti-CD3 específico para espécies cruzadas I2C HL sob a forma de um anticorpo IgG1 para CD3-EpCAM 1-27

A aglutinação do constructo de I2C IgG1 gerado aos aminoácidos

20 Terminais N 1-27 de ser humano, marmoset, sagui e cadeias de épsilon de CD3 de macaco de cheiro fundidas respectivamente a Ep-CAM cinomolgo conforme descrito no exemplo 19.1 foi testada em um ensaio de FACS de acordo com protocolos padrão. Com esse propósito, inúmeras células $2,5 \times 10^5$ foram incubadas com 50 µl de sobrenadante de cultura de célula contendo o constructo de I2C IgG1

25 conforme descrito no exemplo 19,2. A aglutinação do anticorpo foi detectada com um fragmento de F(ab')₂ purificado com afinidade à R-Ficoeritrina-conjugada, IgG de cabra anti-camundongo, fragmento de Fc-gama específico diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK). A citometria de fluxo foi realizada com um aparelho de FACS-Calibur, o

30 software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson

biosciences, Heidelberg). O mancharmento de FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram realizados conforme descrito no documento Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

- 5 Conforme mostrado na figura 37, a aglutinação do constructo de I2C IgG1 ao transfectantes que expressam as proteínas de fusão transmembrana recombinantes consiste em aminoácidos Terminais N 1-27 de épsilon de CD3 de ser humano, marmoset, sagui ou macaco de cheiro fundidos a EpCAM de cinomolgo em comparação com o controle negativo consiste em aminoácidos
- 10 Terminais N 1-27 de épsilon de CD3 de suíno fundidos a EpCAM de cinomolgo foi observada. Dessa forma, a especificidade de espécies cruzadas multi-primata de I2C foi demonstrada. Os sinais obtidos com o anticorpo anti Flag M2 e com o constructo de I2C IgG1 foram comparáveis, indicando uma forte atividade de aglutinação de I2C de especificidade específica para espécies cruzadas aos
- 15 aminoácidos 1-27 Terminais N de Épsilon de CD3.

20. Aglutinação da molécula I2C de aglutinação anti-CD3 específica para espécies cruzadas à cadeia de épsilon de CD3 de ser humano com e sem etiqueta de His6 Terminal N

- Um anticorpo IgG1 quimérico com a especificidade de aglutinação
- 20 I2C conforme descrito no exemplo 19.2 específico para épsilon de CD3 foi testado quanto à aglutinação ao épsilon de CD3 de ser humano com e sem a etiqueta His6 Terminal N. A aglutinação do anticorpo às linhagens de célula de EL4 transfectadas com Épsilon de CD3 de His6-humano conforme descrito no Exemplo 6.1 e com épsilon de CD3 de ser humano do tipo selvagem conforme descrito no
- 25 exemplo 5.1 respectivamente foi testada por meio de um ensaio FACS de acordo com protocolos padrão. As células $2,5 \times 10^5$ dos transfectantes foram incubadas com 50 µl de sobrenadante de cultura de célula contendo o constructo de I2C IgG1 ou 50 µl dos anticorpos de controle respectivos a 5µg/ml em PBS com 2% de FCS. Como controle negativo, um controle de isotipo adequado e, como controle positivo
- 30 para a expressão dos constructos, o anticorpo com especificidade a CD3 UCHT-1

foram usados respectivamente. A detecção da etiqueta de His6 foi realizada com o anticorpo penta His (Qiagen). A aglutinação dos anticorpos foi detectada com um fragmento de F(ab')₂ purificado com afinidade a R-Ficoeritrina conjugada, IgG de cabra anti-camundongo, fragmento de Fc-gama específico, diluídos 1:100 em PBS com 2% de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK). A citometria de fluxo foi realizada com um aparelho FACS-Calibur, o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). O manchamento de FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram realizados conforme descrito no documento Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A aglutinação do anticorpo de CD3 anti-humano UCHT-1 comparável a ambos os transfectantes demonstra aproximadamente níveis iguais de expressão dos constructos. A aglutinação do anticorpo penta His confirmou a presença da etiqueta His6 no constructo de CD3 His6 humano, mas não no constructo do tipo selvagem.

Em comparação com a linhagem de célula de EL4 transfectada com épsilon de CD3 de ser humano do tipo selvagem, uma clara perda de aglutinação do constructo de I2C IgG1 ao Épsilon de CD3 de ser humano com uma etiqueta His6 Terminal N foi detectada. Esses resultados mostram que um Terminal N livre de épsilon de CD3 é essencial para a aglutinação da especificidade de aglutinação I2C anti-CD3 específica para espécies cruzadas à cadeia de épsilon de CD3 de ser humano (figura 28).

21. Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas de CD33 e CD3

21.1 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas de CD33 e CD3

Em geral, as moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, cada uma compreendendo um domínio com espécies cruzadas com especificidade de aglutinação específica para CD3épsilon de humano e símio bem como um

domínio com espécies cruzadas com especificidade de aglutinação específicas para humano e símio CD33 foram projetados conforme delineado na Tabela 6 a seguir:

Tabela 6: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única

5 biespecíficas específicas para espécies cruzadas anti-CD3 e anti-CD33

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
316/315	I2CHLxAF5HL
314/313	F12QHLxAF5HL
312/311	H2CHLxAF5HL

Os constructos supracitados contendo as espécies cruzadas de domínios de cadeia leve variável (L) e cadeia pesada variável (H) específicas para ser humano e símio CD33 e as espécies cruzadas de combinações VH e VL de CD3 específico específicas para CD3 de ser humano e símio foram obtidos mediante a síntese genética. Os fragmentos de síntese genética foram projetados em analogia ao procedimento descrito no exemplo 9 para as moléculas de cadeia única específicas para espécies cruzadas de MCSP e CD3. Um clone com sequência de nucleotídeos verificada por sequência foi transfectado em células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células de CHO deficientes de DHFR foi realizada como descrito também no exemplo 9 para as moléculas de cadeia única específicas para espécies cruzadas de MCSP e CD3 e usada nos experimentos subsequentes.

21.2 Análise de aglutinação por citometria de fluxo dos anticorpos

20 biespecíficos específicos para espécies cruzadas de CD33 e CD3

A fim de testar a funcionalidade dos constructos de anticorpo biespecífico específico para espécies cruzadas dizendo respeito à capacidade de aglutinação ao CD33 e CD3 humano e símio, respectivamente, uma análise de FACS é realizada de maneira similar à análise descrita para a análise dos

anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de MCSP e CD3 no exemplo 10 com o uso de células de CHO que expressam os domínios extracelulares de CD33 humano ou símio (consulte os exemplos 16.1 e 16.2).

5 A aglutinação biespecífica das moléculas de cadeia única listadas acima, que foram espécies cruzadas específicas para CD33 e espécies cruzadas específicas para primata não chimpanzé e ser humano CD3 foi claramente detectável conforme mostrado na figura 41. Na análise de FACS, todos os constructos apresentaram uma aglutinação a CD3 e CD33 em comparação com os controles negativos respectivos. A especificidade das espécies cruzadas dos
10 anticorpos biespecíficos em relação aos antígenos CD3 e CD33 de ser humano foi demonstrada.

21.3. Bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos específicos para espécies cruzadas de CD33 e CD3

A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados
15 foi analisada por meio dos ensaios de citotoxicidade de liberação in vitro de cromo 51 (^{51}Cr) com o uso das linhagens celulares de CD33 positivo descritas nos exemplos 16.1 e 16.2. As células efetoras estimuladas, o PBMC depletado de CD4/CD56 humano ou a linhagem de célula T de macaco 4119LnPx foi usado conforme especificado nas respectivas figuras. Os ensaios de citotoxicidade foram
20 realizados de maneira similar ao procedimento descrito para a análise de bioatividade dos anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de MCSP e CD3 no exemplo 11 com o uso de células de CHO que expressam os domínios extracelulares de CD33 humano ou símio (consulte os exemplos 16.1 e 16.2) como células alvo.

25 Conforme mostrado na figura 42, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos para espécies cruzadas gerados demonstram a atividade citotóxica contra as células alvo de CD33 positivo de ser humano obtidas por meio de PBMC depletado de CD4/CD56 de ser humano estimulado e contra células alvo de CD33 positivo de símio obtidas por meio da
30 linhagem de célula T de macaco 4119LnPx.

22. Redistribuição de células T de chimpanzé circulantes mediante a exposição a uma molécula de aglutinação de CD3 biespecífica convencional direcionada em uma molécula alvo que está ausente das células sanguíneas circulantes

5 Um único chimpanzé macho foi submetido ao escalonamento de dose com um constructo de anticorpo biespecífico de EpCAM/CD3 de cadeia única intravenoso (Schlereth (2005) Cancer Res 65: 2882). Como no constructo de anticorpo biespecífico de CD19/CD3 de cadeia única convencional (Loffler (2000, Blood, Volume 95, Número 6) ou WO 99/54440), o braço de CD3 do dito

10 Constructo de EpCAM/CD3 também é direcionado contra um epitopo convencional contexto-dependente de CD3 de humano e chimpanzé. No dia 0, o animal recebeu 50ml de PBS/5% de HSA sem o material de teste, seguido por 50ml de PBS/5% de HSA mais o constructo de anticorpo biespecífico para EpCAM/CD3 de cadeia única com 1,6, 2,0, 3,0 e 4,5 µg/kg nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. O período

15 de infusão foi de 2 horas por administração. Para cada infusão semanal, o chimpanzé foi sedado com 2-3 mg/kg de Telazol de maneira intramuscular, entubado e colocado em anestesia com isoflurano/O₂ com pressões sanguíneas médias estáveis. Um segundo cateter intravenoso foi colocado em um limbo oposto para coletar (heparinizadas) amostras de sangue completas nos pontos de tempo

20 indicados na figura 43 para a análise de FACS das células sanguíneas circulantes. Após a lise de eritrócito padrão, as células T foram manchadas com um anticorpo rotulado de FITC que reage com CD2 de chimpanzé (Becton Dickinson) e a porcentagem de células T por linfócitos totais foi determinada pela citometria de fluxo. Conforme mostrado na figura 43, cada administração do constructo de

25 anticorpo biespecífico para EpCAM/CD3 de cadeia única induziu uma queda rápida das células T em circulação conforme observado com o constructo de anticorpo biespecífico para CD19/CD3 de cadeia única em pacientes com B-NHL, os quais tiveram essencialmente células de alvo B (linfoma) circundantes. Como não há células alvo de EpCAM-positivo no sangue circulante de humanos e chimpanzés, a

30 queda das células T em circulação mediante a exposição ao constructo de

anticorpo biespecífico para EpCAM/CD3 de cadeia única pode ser atribuída apenas a um sinal que as células T recebem por meio da interação pura do braço de CD3 do constructo com um epítipo de CD3 contexto-dependente convencional na ausência de qualquer reticulação mediada por célula alvo. Como a

5 redistribuição de células T induzida através de sua exposição ao constructo de anticorpo biespecífico para CD19/CD3 de cadeia única em pacientes com B-NHL que não tinham essencialmente células (linfoma) alvo B circulantes, a redistribuição de célula T no chimpanzé mediante a exposição ao constructo de anticorpo biespecífico para EpCAM/CD3 de cadeia única pode ser explicada por

10 uma alteração conformacional de CD3 seguindo o evento de aglutinação a um epítipo de CD3 contexto-dependente resultando adicionalmente no aumento transiente do poder de adesão da célula T ao endotélio de vaso sanguíneo (consulte o exemplo 13). Esta descoberta confirma que as moléculas de ligação de CD3 convencionais direcionadas aos epítipos de CD3 dependentes de contexto –

15 apenas através dessa interação – podem levar a um padrão de redistribuição de células T sanguíneas periféricas, que está associado ao risco de eventos adversos de CNS em humanos conforme descrito no exemplo 13.

23. Aglutinação específica de clones de scFv ao Terminal N de épsilon de CD3N humano

20 23.1 Expressão bacteriana de constructos de scFv em E. coli XL1 Blue

Conforme mencionado anteriormente, *E. coli* XL1 Blue transformado com pComb3H5Bhis/Flag contendo um segmento de VL e VH produz scFv solúvel em quantidades suficientes após a excisão do fragmento de gene III e a indução

25 com 1 mM de IPTG. A cadeia de scFv é exportada no periplasma onde ela se dobra em uma conformação funcional.

Os clones de scFv a seguir foram escolhidos para este experimento:

i) ScFvs 4-10, 3-106, 3-114, 3-148, 4-48, 3-190 e 3-271 conforme descrito no documento WO 2004/106380.

30 ii) Os ScFvs dos clones de aglutinação anti-CD3épsilon humano H2C,

F12Q e I2C conforme descrito no presente documento.

Para preparações periplásmicas, as células bacterianas transformadas com os plasmídeos contendo scFv respectivos permitindo a expressão periplásmica foram cultivadas em um meio de SB suplementado com 20 mM de $MgCl_2$ e 50 $\mu g/ml$ de carbenicilina, e foram redissolvidas em PBS após a colheita. Com quatro rodadas de congelamento a $-70^\circ C$ e degelo a $37^\circ C$, a membrana externa da bactéria foi destruída mediante choque osmótico e as proteína periplásticas solúveis incluindo as scFvs foram liberadas no sobrenadante. Após a eliminação de células intactas e detritos celulares por centrifugação, o sobrenadante contendo os scFvs de CD3 humano anti-humano foi coletado e usado para um exame adicional. Esses sobrenadantes crus contendo scFv serão chamados adicionalmente de preparações periplásmicas (PPP).

23.2 Aglutinação de scFvs em uma proteína de fusão de (aa 1-27)-Fc de Épsilon de CD3 humano

Os experimentos ELISA foram executados mediante o revestimento da proteína de fusão (aa 1-27)- Fc de épsilon de CD3 humano às cavidades de 96 placas plásticas com cavidade (Nunc, maxisorb) tipicamente a $4^\circ C$ de um dia para o outro. A solução de revestimento de antígeno foi, então, removida, os orifícios foram lavados uma vez com Tween 20 PBS/0,05% e foi bloqueada subsequentemente com BSA PBS/3 % durante pelo menos uma hora. Após a remoção da solução bloqueadora, as PPPs e as soluções de controle foram adicionadas às cavidades e incubadas durante tipicamente uma hora à temperatura ambiente. As cavidades foram, então, lavadas três vezes com Tween 20 PBS/0,05 %. A detecção das scFvs ligadas ao antígeno imobilizado foi executada com o uso de um anticorpo anti FLAG-tag identificado por biotina (M2 anti Flag-Bio, Sigma, tipicamente com uma concentração final de $1\mu g/ml$ PBS) e detectado com Estreptavidina identificada por peroxidase (Dianova, $1\mu g/ml$ PBS). O sinal foi desenvolvido mediante a adição de uma solução de substrato ABTS e medido com um comprimento de onda de 405 nm. A aglutinação não-específica das amostras de teste ao agente de bloqueio e/ou à porção de IgG1 humano da

proteína de fusão (aa 1-27)- Fc de épsilon de CD3 humano foi examinada mediante a execução do ensaio idêntico com os reagentes idênticos e temporização idêntica em placas de ELISA que foram revestidas com IgG1 humano (Sigma). O PBS foi usado como um controle negativo.

5 Conforme mostrado na figura 44, as scFvs H2C, F12Q e I2C apresentam fortes sinais de aglutinação na proteína de fusão (aa 1-27)- Fc de épsilon de CD3 humano. As scFvs humanas 3-106, 3-114, 3-148, 3-190, 3-271, 4-10 e 4-48 (conforme descrito no documento WO 2004/106380) não apresentam qualquer aglutinação significativa acima do nível de controle negativo.

10 Para excluir a possibilidade de a aglutinação positiva de scFvs H2C, F12Q e I2C às cavidades revestidas com proteína de fusão (aa 1-27)- Fc de épsilon de CD3 humano possa ocorrer em razão da aglutinação à BSA (usado como um agente de bloqueio) e/ou à porção de IgG1 Fc-gama humano da proteína de fusão (aa 1-27)- Fc de épsilon de CD3 humano, um segundo experimento
15 ELISA foi realizado em paralelo. Nesse segundo experimento ELISA, todos os parâmetros foram idênticos àqueles no primeiro experimento ELISA, exceto pelo fato de que, no segundo experimento ELISA, o IgG1 humano (Sigma) foi revestido em vez da proteína de fusão (aa 1-27)- Fc de épsilon de CD3 humano. Conforme
20 mostrado na figura 45, nenhuma das scFvs testadas apresentou qualquer aglutinação significativa a BSA e/ou IgG1 humano acima do nível de fundo.

Tomados juntos, esses resultados permitem a conclusão de que as moléculas de ligação de CD3 convencionais que reconhecem um epitopo contexto-dependente de épsilon de CD3 (por exemplo, conforme descrito no documento WO 2004/106380) não se aglutinam especificamente à região (aa 1-27) de épsilon de
25 CD3 humano, enquanto as scFvs H2C, F12Q e I2C que se aglutinam a um epitopo contexto-dependente de épsilon de CD3 apresentam claramente uma aglutinação específica aos 27 aminoácidos Terminais N de épsilon de CD3 humano.

**24. Geração e caracterização de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas de PSCA e
30 CD3**

24.1 Geração de células de CHO que expressam PSCA humano

A sequência de codificação de PSCA humano conforme publicado no GenBank (Número de acesso NM_005672) foi obtida por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi projetado de modo a conter primeiramente um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo, seguido por um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos, seguido em quadro pela sequência de codificação de uma flag tag, seguido em quadro pela sequência de codificação da proteína PSCA de humano maduro e um códon de parada (as sequências correspondentes do constructo estão listadas em SEQ ID N^{os}. 443 e 444). O fragmento de síntese genética também foi projetado de modo a introduzir sítios de restrição ao início e ao final do tratamento. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na extremidade 5' e Sall na extremidade 3' foram utilizados nos procedimentos de clonagem a seguir. O fragmento de síntese genética foi clonado por meio de EcoRI e Sall em um plasmídeo chamado de pEF-DHFR (pEF-DHFR está descrito no documento de Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo protocolos padrão. Os procedimentos supracitados foram executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3^a edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com sequências de nucleotídeo verificadas por sequência foi transfectado em células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida mediante o aumento das concentrações de metotrexato (MTX) até uma concentração final de até 20 nM MTX.

24.2 Geração de células de CHO que expressam PSCA símio

A sequência de cDNA de PSCA símio foi obtida mediante PCR em cDNA a partir da próstata de um macaco símio (cinomolgo) preparada de acordo com os protocolos padrão. As condições de reação a seguir: 1 ciclo a 94°C durante

2 minutos seguido por 40 ciclos com 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto seguido por um ciclo terminal de 72°C durante 3 minutos e os iniciadores a seguir foram usados:

iniciador direto: 5'- CACCACAGCCCACCAGTGACC -3' (SEQ ID Nº.

5 447)

iniciador reverso: 5'- GAGGCCTGGGGCACCACACCC -3' (SEQ ID Nº. 448)

As reações de PCR foram realizadas mediante a adição de betaina de grau de PCR até uma concentração final de 1M. Esse PCR gerou um fragmento de DNA, que foi isolado e sequenciado de acordo com protocolos padrão com o uso dos iniciadores de PCR, e através disso forneceu o PSCA símio para codificação da sequência de cDNA. Para gerar um constructo para a expressão de PSCA símio, um fragmento de cDNA foi obtido mediante a síntese genética de acordo com protocolos padrão (as sequências correspondentes estão listadas em SEQ ID Nºs: 445 e 446). O fragmento de síntese genética foi projetado de modo a conter primeiramente um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo, seguido por um peptídeo líder de imunoglobulina com 19 aminoácidos, seguido em quadro pela sequência de codificação de uma etiqueta flag tag, seguido em quadro pela sequência de codificação da proteína PSCA de símio maduro e um códon de parada. O fragmento de síntese genética também foi projetado de modo a introduzir sítios de restrição ao início e ao final do tratamento. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na extremidade 5' e Sall na extremidade 3' foram utilizados nos procedimentos de clonagem a seguir. O fragmento de síntese genética foi clonado por meio de EcoRI e Sall em um plasmídeo chamado de pEF-DHFR (pEF-DHFR está descrito no documento de Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo os protocolos padrão. Os procedimentos supracitados foram executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com uma sequência de nucleotídeos verificado por sequência foi transfectado em

células de CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células de CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida mediante o aumento das concentrações de metotrexato (MTX) até uma concentração final de até 20 nM MTX.

24.3 Geração de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas de PSCA e CD3

Clonagem de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas de PSCAxCD3 específicas para espécies cruzadas

Em geral, as moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, cada uma compreende um domínio com espécies cruzadas com especificidade de aglutinação específicas para épsilon de CD3 primata não chimpanzé e humano bem como um domínio com espécies cruzadas com especificidade de aglutinação específicas para PSCA primata não chimpanzé e humano foram projetados conforme apresentando na Tabela 7 a seguir:

Tabela 7: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas anti-CD3 e anti-PSCA

SEQ ID Nº. (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
390/389	PSCA1HLxI2CHL
422/421	PSCA3HLxI2CHL
440/439	PSCA4HLxI2CHL
392/391	PSCA1LHxI2CHL
406/405	PSCA2LHxI2CHL
424/423	PSCA3LHxI2CHL
442/441	PSCA4LHxI2CHL
1227/1226	PC16E12HLxI2CHL
1199/1198	PC32D5HLxI2CHL

1185/1184	PC32B8HLxI2CHL
1241/1240	PC08F4HLxI2CHL
1213/1212	PC17D10HLxI2CHL
1269/1268	PC17H10HLxI2CHL
1255/1254	PC16F5HLxI2CHL

Os constructos supracitados contendo as espécies cruzadas de domínios de cadeia leve variável (L) e cadeia pesada variável (H) específicos para PSCA humano e símio e as espécies cruzadas de combinações VH e VL de CD3 específico específicas para CD3 humano e símio foram obtidos mediante a síntese genética. Os fragmentos de síntese genética foram projetados e a expressão de proteína eucariótica foi realizada em analogia ao procedimento descrito no exemplo 9 para as moléculas de cadeia única específicas para espécies cruzadas de MCSP e CD3.

24.4 Expressão e purificação das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas para PSCAxCD3

As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas foram expressas em células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células HEK293 conforme descrito no presente documento acima para os anticorpos de cadeia única biespecífica de MCSPxCD3.

O isolamento e a análise dos anticorpos de cadeia única biespecífica expressos também foram descritos acima no presente documento no exemplo 9.

24.5 Análise de aglutinação por citometria de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos para espécies cruzadas de PSCA e CD3

A fim de testar a funcionalidade dos constructos de anticorpo biespecífico específicos para espécies cruzadas dizendo respeito à capacidade de se aglutinar a PSCA e CD3 humano e símio, respectivamente, uma análise de FACS foi realizada. Para este propósito, as células de CHO transfectadas com PSCA humano conforme descrito no exemplo 24.1 e a linhagem celular de leucemia da célula T positiva de CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) foram usadas para testar a aglutinação a antígenos humanos. A

reatividade de aglutinação a antígenos de símio foi testada mediante o uso do transfectante de PSCA símio gerado descrito no exemplo 24.2 e uma linhagem de célula T de macaco 4119LnPx (gentilmente fornecido pelo Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado em Knappe A, et al., e Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256 a 3261). 200,000 células das linhagens celulares respectivas foram incubadas durante 30 minutos em gelo com 50 µl de sobrenadante de cultura de células transfectadas que expressam os constructos de anticorpo biespecífico específicos para espécies cruzadas. As células foram lavadas duas vezes em PBS com 2% de FCS e uma aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo de murino penta His (Qiagen; diluído 1:20 em 50 µl PBS com 2% de FCS). Após a lavagem, os anticorpos anti His ligados foram detectados com um anticorpo Fc gama-específico (Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS. O sobrenadante das células não-transfectadas foi usado como um controle negativo.

A citometria de fluxo foi realizada com um aparelho FACS-Calibur, o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). O manchamento de FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram realizados conforme descrito no documento Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A aglutinação biespecífica das moléculas de cadeia única listadas acima, que são espécies cruzadas específicas para PSCA e CD3 foi claramente detectável conforme mostrado na figura 46 e 48. Na análise de FACS, todos os constructos apresentaram uma aglutinação a CD3 e PSCA em comparação com o controle negativo. A especificidade das espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos em relação aos antígenos de CD3 e PSCA humano e símio, respectivamente, foi demonstrada.

24.6 Bioatividade de Anticorpos de cadeia única biespecíficos específicos para células cruzadas de CD3 e PSCA

A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados

foi analisada por meio de ensaios de citotoxicidade in vitro de liberação de cromo 51 (^{51}Cr) com o uso das células de CHO transfectadas com PSCA humano descrito no exemplo 24.1 e das células de CHO transfectadas com PSCA símio descrito no exemplo 24.2. Como as células efetoras estimularam o CD4/CD56 humano, o

5 PBMC depletado ou a linhagem de célula T de macaco 4119LnPx foi usado, respectivamente.

A geração de PBMC humano estimulado foi descrita no presente documento acima, no exemplo 11.

10 As células alvo foram preparadas e o ensaio foi realizado em analogia ao procedimento descrito para os anticorpos de cadeia única biespecíficos de MCSPxCD3 no exemplo 11.

Conforme mostrado nas figuras 47 e 49, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos para espécies cruzadas gerados demonstraram uma atividade citotóxica contra células alvo positivas de

15 PSCA humano extraídas por células alvo positivas de PSCA símio e PBMC depletado de CD4/CD56 humano extraídas através da linhagem de célula T de macaco 4119LnPx.

24.7 Os Constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos direcionados contra CD3 e PSCA de primata não chimpanzé e ser humano

20 A sequência VH VH1 1-f da linhagem germinativa de anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como um contexto de trabalho para CDRH1 (SEQ ID N°. 414), CDRH2 (SEQ ID N°. 415) e CDRH3 (SEQ ID N°. 416). Igualmente, a mesma sequência VH de linhagem germinativa de anticorpo humano é escolhida como um contexto de trabalho para CDRH1 (SEQ ID

25 N°. 400), CDRH2 (SEQ ID N°. 401) e CDRH3 (SEQ ID N°. 402). Para cada VH humano, muitos oligonucleotídeos degenerados têm de ser sintetizados de modo que se sobreponham em uma coluna terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Para este fim, cada segundo iniciador é um iniciador antisenso. Para VH1 1-f, o conjunto de oligonucleotídeos a seguir é usado:

30 5' P3-VH-A-XhoI

CCT GAT CTC GAG AGC GGC SCA GAS STG RAA AAG CCA GGC GCC ACG
GTG AAG ATT (SEQ ID Nº. 449)

5' P3-VH-B

GGC GCC ACG GTG AAG ATT TCC TGC AAG SYC AGC GGC WAC ACG TTC

5 ACC GGC TAC TAC ATC CAC TGG GTG (SEQ ID Nº. 450)

3' P3-VH-C

GTA GGA GGT GAA GCC GTT GTT GGG GTC CAC TCT GCC SAT CCA TTC
CAG GCY CTT CCC GKG GGM CTG TTK CAC CCA GTG GAT GTA GTA (SEQ
ID Nº. 451)

10 5' P3-VH-D

AAC GGC TTC ACC TCC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC ARG GYC AYA
MTK ACC GYG GAC AMG AGC ACC RRC ACC GCC TAC ATG GAA CTG (SEQ
ID Nº. 452)

3' P3-VH-E

15 GCT GTC GAA GAA GTT GCC CRC GCA ATA GTA CAC GGC GGT GTC CTC
GCT GSK CAG GCT KCT CAG TTC CAT GTA GGC GGT (SEQ ID Nº. 453)

3' P3-VH-F-BstEII

CAC GTC GGT GAC CGT GGT TCC CTG GCC CCA GCT GTC GAA GAA GTT
GCC (SEQ ID Nº. 454)

20 Como outro conjunto de oligonucleotídeos para VH1 1-f, os iniciadores a seguir são
usados:

5'-PSCA2VH-A-XHO1

CAG GTG CTCGAG YCA GGC GCC GAA STG RWG AAG CCT GGC GCC MCA
GTG AAG MTA TCC TGC AAG GYC AGC GGC TAC ACC TTC ACC AAC (SEQ
25 ID Nº. 455)

3'-PSCA2VH-B

GCT GTC GCT GGG GTC GAT CCT GCC YAT CCA TTC CAG GCC CYT GCC
GGG CSY CTG TTK CAC CCA GTT CAG CCA GTA GTT GGT GAA GGT GTA
GCC (SEQ ID Nº. 456)

30 5'-PSCA2VH-C

AGG ATC GAC CCC AGC GAC AGC GAG ATC CAC TAC GAC CAG AAG TTC
AAG GAC ARA GYC ACC MTA ACC GYG GAC AMG AGC ACC RRC ACC GCC
TAC (SEQ ID Nº. 457)

3'-PSCA2VH-D

5 GGC CAG GGC GCA ATA GTA CAC GGC GGT GTC CTC GCT TST CAG GCT
GGA CAG CTS SAT GTA GGC GGT GYY GGT GCT C (SEQ ID Nº. 458)

3'-PSCA2VH-E-BSTE2

AGA CAC GGT GAC CGT GGT GCC CTG GCC CCA GTA GGC CAT GGC GTA
GAT GCC GGT CAG GGC GCA ATA GTA CAC (SEQ ID Nº. 459)

10 Cada um desses conjuntos de iniciador abrange toda a sequência de
VH correspondente.

Dentro de cada conjunto, os iniciadores são misturados em
quantidades iguais (por exemplo, 1 µl de cada iniciador (estoques de iniciador de
20 a 100 µM) até uma reação de PCR de 20 µl) e são adicionados a uma mistura
15 de PCR que consiste em um tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase.
Essa mistura é incubada a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62°C
durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1
minuto, 50 °C durante 1 minuto e a 72°C durante 10 minutos em um cicladador de
PCR. Subsequentemente, o produto é executado em eletroforese de gel de
20 agarose e o produto com um tamanho de 200 a 400 é isolado do gel de acordo
com métodos padrão.

Cada produto PCR de VH é, então, usado como um modelo para uma
reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam os sítios de
restrição de clonagem adequados Terminais N e C-terminais. O fragmento de DNA
25 do tamanho correto (para um VH, aproximadamente 350 nucleotídeos) é isolado
por eletroforese de gel de agarose de acordo com métodos padrão. Dessa
maneira, o fragmento de DNA de VH suficiente é amplificado.

A sequência VI da linhagem germinativa de anticorpo humano VkII A1
(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de trabalho para
30 CDRL1 (SEQ ID Nº. 409), CDRL2 (SEQ ID Nº. 410) e CDRL3 (SEQ ID Nº. 411).

Igualmente, a sequência VL de linhagem germinativa de anticorpo humano VklI A19 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de trabalho para CDRL1 (SEQ ID Nº. 395), CDRL2 (SEQ ID Nº. 396) e CDRL3 (SEQ ID Nº. 397). Para cada VL humano, muitos oligonucleotídeos degenerados têm de ser

5 sintetizados de modo que se sobreponham em um trecho terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Para esta finalidade, cada segundo iniciador é um iniciador antisenso. Os sítios de restrição necessários para a clonagem posterior nos oligonucleotídeos são deletados. Para VklI A1, os oligonucleotídeos a seguir são usados:

10 5' P3-VL-A-SacI

CCT GTA GAG CTC GTC ATG ACC CAG TCC CCC CTG TCC CTG MSC GTG
ACC MTC GGC CAG CCA GCC AGC ATC (SEQ ID Nº. 460)

3' P3-VL-B

CCA GTT CAG GTA GGT CTT GCC GTC GCT GTC CAG CAG GGA CTG GCT
15 GGA CTT GCA AGA GAT GCT GGC TGG CTG GCC (SEQ ID Nº. 461)

5' P3-VL-C

AAG ACC TAC CTG AAC TGG YTS CWG CAG AGG CCA GGC CAG AGC CCC
ARG AGG CTG ATC TAC CTG GTG TCC ACC CTG (SEQ ID Nº. 462)

3' P3-VL-D

20 GGT GAA GTC GGT GCC GGA GCC GCT GCC GGA GAA TCT GTC TGG CAC
GCC GCT GTC CAG GGT GGA CAC CAG GTA (SEQ ID Nº. 463)

5' P3-VL-E

TCC GGC ACC GAC TTC ACC CTG AAG ATC AGC AGG GTG GAG GCC GAG
GAC STG GGC GTG TAC TAC TGC TGG CAG GGC ACC (SEQ ID Nº. 464)

25 3' P3-VL-F-BsiWI/SpeI

CCA GAC ACT AGT CGT ACG CTT GAT TTC CAG CTT GGT CCC TCC GCC
GAA GGT CCT TGG GAA GTG GGT GCC CTG CCA GCA GTA (SEQ ID Nº. 465)

Para VklI A19, os oligonucleotídeos são da seguinte maneira:

5'-PSCA2VL-a-SAC1

30 CAG ACA GAG CTC GTG ATG ACC CAG KCA SCT CYA AGC STG CCA GTG

ACC CCA GGC GAG YCA GYG TCC ATC AGC TGC AGG TCC AGC (SEQ ID N°. 466)

3'-PSCA2VL-b

CTG GGG GCT CTG GCC TGG CYT CTG CAG AWA CCA GTA CAG GTA GGT
5 GTT GCC GTT GCT GTG CAG CAG GCT CTT GCT GGA CCT GCA GCT GAT G
(SEQ ID N°. 467)

5'-PSCA2VL-c

CCA GGC CAG AGC CCC CAG CTG CTG ATC TAC AGG ATG AGC AAC CTG
GCT AGC GGC GTG CCA GAC AGA TTC AGC GGC AGC GGC TCT GGA ACC
10 (SEQ ID N°. 468)

3'-PSCA2VL-d

CAG GCA GTA GTA CAC GCC CAC GTC CTC GGC CTC CAC CCT GCT GAT
CYT CAG GGT GAA GKC GGT TCC AGA GCC GCT GCC (SEQ ID N°. 469)

3'-PSCA2VL-e-BsiW1-Spe1

15 GTG CTG ACT AGT CGT ACG CTT GAT TTC CAG CTT GGT CCC TTG GCC
GAA GGT GTA GGG GTA TTC CAG GTG CTG CAG GCA GTA GTA CAC GCC
(SEQ ID N°. 470)

Cada um desses conjuntos de iniciador abrange toda a sequência VL correspondente.

20 Dentro de cada conjunto, os iniciadores são misturados em quantidades iguais (por exemplo, 1 µl de cada iniciador (estoques de iniciador de 20 a 100 µM) até uma reação de PCR de 20 µl) e são adicionados a uma mistura de PCR que consiste em um tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase. Essa mistura é incubada a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62°C
25 durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto e a 72°C durante 10 minutos em um cicladador de PCR. Subsequentemente, o produto é executado em uma eletroforese em gel de agarose e o produto com um tamanho de 200 a 400 é isolado do gel de acordo com métodos padrão.

30 Cada produto VL PCR é, então, usado como um modelo para uma

reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam os Sítios de restrição de clonagem adequados Terminais N e C-terminais. O fragmento de DNA com o tamanho correto (para uma VL, de aproximadamente 330 nucleotídeos) é isolado por eletroforese em gel de agarose de acordo com métodos padrão. Dessa maneira, um fragmento de DNA com VL suficiente é amplificado.

O produto de VH PCR à base de VH1 1-f (P3) final (isto é, o repertório de VH humano/humanizado) é então combinado com o produto de VL PCR à base de VkII A1 final (isto é, o repertório de VL humano/humanizado) e o produto de VH PCR à base de VH1 1-f (PSCA2) final (isto é, o repertório de VH humano/humanizado) com o produto de VL PCR à base de VkII A19 final (isto é, o repertório de VL humano/humanizado) no vetor de exibição de fago pComb3H5Bhis para formar duas bibliotecas diferentes de scFvs funcionais a partir das quais – após a exibição em fago filamentosos – os aglutinantes anti-PSCA são selecionados, triados, identificados e confirmados conforme descrito da seguinte maneira:

450 ng dos fragmentos de cadeia leve (SacI-SpeI digerido) são ligados com 1400 ng do fagemídeo pComb3H5Bhis (SacI-SpeI digerido; fragmento grande). A biblioteca de anticorpo combinatorial resultante é, então, transformada em 300 µl de células *Escherichia coli* XL1 Blue eletrocompetente por eletroporação (2,5 kV, cubeta com intervalo de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm, gene-pulser da Biorad) resultando em um tamanho de biblioteca maior que 10^7 clones independentes. Após uma hora de expressão de fenótipo, os transformantes positivos são selecionados quanto à resistência à carbenicilina codificados pelo vetor pComb3H5Bhis em 100 ml de caldo de cultura super-líquido (SB) submetido à cultura de um dia para o outro. As células são, então, colhidas por centrifugação e a preparação de plasmídeo é executada com o uso de um kit para a preparação de plasmídeo disponível comercialmente (Qiagen).

2800 ng dessa biblioteca de VL contendo DNA de plasmídeo (XhoI-BstEII digerido; fragmento grande) são ligados com 900 ng dos fragmentos de V de cadeia pesada (XhoI-BstEII digerido) e transformados novamente em duas

alíquotas de 300 µl de células E. coli XL1 Blue eletrocompetentes por electroporação (2,5 kV, cubeta com intervalo de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm) resultando em um tamanho de biblioteca (fragmento variável de cadeia única) de VH-VL scFv total de mais de 10^7 clones independentes.

5 Após a expressão de fenótipo e a adaptação lenta à carbenicilina, as células de E. coli contendo a biblioteca de anticorpo são transferidas em um meio de seleção (50 µg/mL) de SB-Carbenicilina. As células de E. coli contendo a biblioteca de anticorpo são, então, infectadas com uma dose infecciosa de 10^{12} partículas de fago ajudante VCSM13 resultando na produção de secreção de fago
10 de M13 filamentoso, em que a partícula de fago contém um DNA pComb3H5BHis de filamento único que codifica um fragmento de scFv exibiu a proteína de scFv correspondente como uma fusão translacional à proteína de revestimento de fago III. Esse grupo de fagos que exibe a biblioteca de anticorpo é usado na seleção de entidades de aglutinação de antígeno.

15 Para este propósito, a biblioteca de fago que transporta o repertório de scFv clonado é colhida do sobrenadante de cultura respectivo por meio de precipitação e centrifugação de PEG8000/NaCl. Aproximadamente de 10^{11} a 10^{12} partículas de fago de scFv são ressuspensas em 0,4 ml de PBS/0,1% de BSA e incubadas com 10^5 a 10^7 de células de CHO transfectadas de PSCA (consulte o
20 exemplo 24.1) durante 1 hora em gele sob agitação lenta. Essas células de CHO transfectadas por PSCA são colhidas de antemão por centrifugação, lavadas em PBS e ressuspensas em PBS/1 % de FCS (contendo Azida de Na). O fago de scFv que não se aglutina especificamente às células de CHO transfectadas de PSCA é eliminado através de até cinco etapas de lavagem com PBS/1% de FCS
25 (contendo Azida de Na). Após a lavagem, as entidades de aglutinação são eluídas das células mediante a ressuspensão das células em HCl-glicina com pH de 2,2 (10 minutos de incubação com vortexação subsequente) e após a neutralização com 2 M de Tris com pH de 12, o eluado é usado para a infecção de uma cultura de E. coli XL1 Blue não infectada recente ($OD_{600} > 0,5$). A cultura de E. coli
30 contendo células de E. coli transduzidas com sucesso com uma cópia de

fagemídeo e a codificação de um fragmento de scFv humano/humanizado são novamente selecionadas quanto à resistência à carbenicilina e subsequentemente infectadas com um fago ajudante de VCMS 13 para iniciar a segunda rodada de exibição do anticorpo e da seleção *in vitro*. Um total de 4 a 5 rodadas de seleções é executado normalmente.

A fim de triar aglutinadores específicos de PSCA, o DNA de plasmídeo que corresponde a 4 e 5 rodadas de *panning* é isolado das culturas de *E. coli* após a seleção. Para a produção da proteína de scFv solúvel, os fragmentos de DNA VH-VL são excisados dos plasmídeos (XhoI-SpeI). Esses fragmentos são clonados por meio dos mesmos sítios de restrição no plasmídeo pComb3H5BFlag/His diferindo do pComb3H5BHis original de modo que o constructo de expressão (por exemplo, scFv) inclui um Flag-tag (DYKDDDDK) entre o scFv e o His6-tag e as proteínas de fago adicionais são deletadas. Após a ligação, cada grupo (diferentes rodadas de *panning*) de DNA de plasmídeo é transformado em 100 µl de TG1 de *E. coli* competente de choque térmico ou XLI blue e plaqueado sobre LB-agar de carbenicilina. Colônias unitárias são selecionadas em 100 µl de LB carb (50 µg/ml).

A *E. coli* transformada com pComb3H5BHis contendo um segmento VL e VHs produz scFv solúvel em quantidades suficientes após a excisão do fragmento de gene III e após a indução com 1 mM de IPTG. Em razão de uma sequência de sinal adequada, a cadeia de scFv é exportada para o periplasma onde ela se dobra em uma conformação funcional.

As colônias bacterianas TG1 de *E. coli* unitárias das placas de transformação são selecionadas para preparações periplásmicas em pequena escala e são cultivadas em um meio SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20 mM de MgCl₂ e 50 µg/ml de carbenicilina (e re-dissolvido em PBS (por exemplo, 1 ml) após a colheita. Com quatro rodadas de congelamento a -70°C e degelo a 37°C, a membrana externa da bactéria é destruída por choque térmico e as proteínas periplásmicas solúveis incluindo as scFvs são liberadas no sobrenadante. Após a eliminação das células intactas e dos detritos celulares por meio de

centrifugação, o sobrenadante contendo a scFvs anti-PSCA é coletado e usado na identificação de aglutinantes específicos de PSCA da seguinte maneira:

A aglutinação das scFvs a PSCA é testada por citometria de fluxo em células de CHO transfectadas por PSCA (veja o exemplo 24.1); a célula de CHO não-transfectada é usada como controle negativo.

Para a citometria de fluxo, as células $2,5 \times 10^5$ são incubadas com 50 μ l de uma preparação periplásmica de scFv ou com 5 μ g/ml de scFv purificada em 50 μ l de PBS com 2% de FCS. A aglutinação de scFv é detectada com um anticorpo anti-His (anticorpo Penta-His, sem BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 μ g/ml em 50 μ l de PBS com 2% de FCS. Como um reagente da segunda etapa, um fragmento de F(ab')₂ purificado com afinidade a R-Ficoeritrina conjugada, IgG de cabra anti-camundongo (fragmento específico de Fc-gama), diluído 1:100 em 50 μ l de PBS com 2% de FCS (Dianova, Hamburg, FRG) é usado. As amostras são medidas em um FACSScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

Clones únicos são, então, analisados quanto às propriedades favoráveis e sequência de aminoácidos. As scFvs específicas para PSCA são convertidas em anticorpos de cadeia única biespecíficos recombinantes mediante a união dos mesmos por meio de um ligante de Gli₄Ser₁ com scFv I2C de CD3 específico (SEQ ID N°. 185) ou qualquer outro scFv de CD3 específico da invenção para resultar, for exemplo, em constructos com a disposição de domínio VHPSCA - (Gli₄Ser₁)₃ - VL_{PSCA} - Gli₄Ser₁-VH_{CD3} - (Gli₄Ser₁)₃ - VL_{CD3} ou VL_{PSCA} - (Gli₄Ser₁)₃ - VHPSCA - Gli₄Ser₁-VH_{CD3} - (Gli₄Ser₁)₃ - VL_{CD3} ou disposições de domínio alternativas. Para a expressão em células de CHO, as sequências de codificação de (i) um líder de cadeia pesada Terminal N de imunoglobulina compreendendo um códon inicial incorporado em uma sequência consenso de Kozak e (ii) uma etiqueta de His6 Terminal C seguida por um códon de parada são ambos fixados em quadro à sequência de nucleotídeos que codifica os anticorpos de cadeia única biespecíficos antes da inserção do fragmento de DNA resultante conforme obtido pela síntese genética nos múltiplos sítios de clonagem do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150). A transfecção

estável de células de CHO deficientes em DHFR, seleção de transfectantes em DHFR-positivo que secretam os anticorpos de cadeia única biespecíficos no sobrenadante de cultura e a amplificação de gene com metotrexato para aumentar os níveis de expressão são executadas conforme descrito (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021 a 7025). Todos os outros estados dos procedimentos da técnica são executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)).

A identificação de constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos funcionais é executada pela análise de citometria de fluxo do sobrenadante de cultura a partir das células de CHO transfectadas. Para esse propósito, a aglutinação de CD3 é testada na linhagem de células de leucemia de célula T de CD3 positivo HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) e na linhagem de célula T de macaco 4119LnPx. A aglutinação aos epitopos de PSCA de tumor específicos é testada em células de CHO transfectadas por PSCA (consulte o exemplo 24.1). 200,000 células da linhagem celular respectiva são incubadas durante 30 minutos em gelo com 50 µl do sobrenadante de cultura de célula. As células são lavadas duas vezes em PBS com 2% de FCS e o constructo de anticorpo de cadeia única biespecífico de ligação é detectado com um anticorpo anti-His murino (Anticorpo penta His; Qiagen; diluído 1:20 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). Após a lavagem, os anticorpos anti-His ligados são detectados com um anticorpo gama-específico Fc (Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluída 1:100 em PBS com 2% de FCS. O sobrenadante de células de CHO não transfectadas é usado como controle negativo.

A citometria de fluxo é realizada em um aparelho FACS-Calibur; o software CellQuest é usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). O manchamento de FACS e a medição da intensidade de fluorescência são realizados conforme descrito no documento Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

Apenas aqueles constructos que apresentam uma aglutinação biespecífica a CD3 humano e símio bem como a PSCA humano e símio são selecionados para uso adicional.

Para as células de CHO de produção de proteína que expressam um anticorpo de cadeia única biespecífico completamente funcional e adaptadas ao meio de soja líquida de HyQ PF CHO sem nucleosídeo (com 4,0 mM de L-Glutamina com 0,1% de Pluronic F – 68; HyClone) são cultivadas em garrafas rotatórias com um meio de soja líquida de HyQ PF CHO sem nucleosídeo (com 4,0 mM de L-Glutamina com 0,1% de Pluronic F – 68; HyClone) durante 7 dias. O sobrenadante de cultura é clareado a partir das células por centrifugação e armazenado a –20°C até a purificação. Como o equipamento de cromatografia para a purificação de anticorpo de cadeia única biespecífico do sobrenadante de cultura, o sistema Äkta® Explorer System (GE Health Systems) e o software Unicorn® são usados. A cromatografia de afinidade metálica imobilizada (“IMAC”) é executada com o uso de um Fractogel EMD chelate® (Merck) que é carregado com ZnCl₂ de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A coluna é equilibrada com um tampão A (20 mM de tampão fosfato de sódio com pH de 7,2, 0,1 M de NaCl) e o sobrenadante de cultura de célula (500 ml) é aplicado à coluna (10 ml) com uma taxa de fluxo de 3 ml/min. A coluna é lavada com tampão A para remover a amostra não ligada. A proteína ligada é eluída com o uso de um gradiente em duas etapas de tampão B (20 mM de tampão fosfato de sódio com pH de 7,2, 0,1 M de NaCl, 0,5 M de Imidazol) de acordo com o seguinte:

Etapa 1: 20% de tampão B em 6 volumes de coluna

Etapa 2: 100% de tampão B em 6 volumes de coluna

As frações de proteína eluída da etapa 2 são acumuladas por purificação adicional. Todos os produtos químicos alcançam um nível de pesquisa e adquiridos junto à Sigma (Deisenhofen) ou Merck (Darmstadt).

A cromatografia por infiltração de gel é realizada em uma coluna de grau HiLoad 16/60 Superdex 200 prep (GE/Amersham) equilibrada com tampão de Equi (25 mM de Citrato, 200 mM de Lisina, 5% de Glicerol, pH 7,2). As amostras

de proteína eluída (taxa de fluxo de 1 ml/min) são submetidas a SDS-PAGE e Teste Western Blot padrão para a detecção. Antes da purificação, a coluna é calibrada para a determinação de peso molecular (kit de marcador de peso molecular, Sigma MW GF-200). As concentrações de proteína são determinadas com o uso de OD280 nm.

A proteína do anticorpo de cadeia única biespecífico purificada é analisada em SDS PAGE sob condições de redução realizadas com pré-fusão de 4 a 12% de géis Bis Tris (Invitrogen). A preparação e aplicação da amostra são realizadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O peso molecular é determinado com um padrão de proteína MultiMark (Invitrogen). O gel é manchado com Coomassie coloidal (protocolo da invitrogen). A pureza da proteína isolada é >95% conforme determinado pela análise SDS-PAGE.

O anticorpo de cadeia única biespecífico tem um peso molecular de cerca de 52 kDa sob condições nativas conforme determinado pela infiltração de gel em PBS. Todos os constructos são purificados de acordo com esse método.

O teste Western Blot é realizado com o uso de uma membrana BA-S83 Optitran® e do Blot Module da invitrogen de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a detecção dos anticorpos com proteína de anticorpo de cadeia única biespecíficos, um anticorpo de etiqueta anti-His é usado (Penta His, Qiagen). Um anticorpo Ig de cabra-anti-camundongo rotulado com fosfatase alcalina (AP) (Sigma) é usado como um anticorpo secundário e BCIP/NBT (Sigma) como um substrato. Uma faixa única é detectada a 52 kD correspondendo ao anticorpo de cadeia única biespecífico purificado.

A potência no sistema de anticorpos de cadeia única biespecíficos em humano e primata não-chimpanzé de interação com CD3 humano e símio e com PSCA humano e símio é determinada por meio de um ensaio de citotoxicidade com base na liberação de cromo 51 (⁵¹Cr) com o uso de células de CHO transfectadas com PSCA como células alvo (veja o exemplo 24.1) e PBMC depletado de CD4/CD56 humano estimulado ou a linhagem de célula T de macaco 4119LnPx como células efectoras.

A geração de PBMC humana simulada é realizada da seguinte maneira:

Uma placa de Petri (85 mm diâmetro, Nunc) é revestida com um anticorpo específico anti-CD3 comercialmente disponível (por exemplo, OKT3, Orthoclone) em uma concentração final de 1 µg/ml por 1 hora a 37°C. A proteína separada é removida por uma etapa de lavagem PBS. As novas PBMC são isoladas do sangue periférico (30 a 50 ml de sangue humano) por centrifugação de gradiente de Ficoll de acordo com os protocolos padrão. 3 a 5 x 10⁷ PBMC são adicionadas à placa de petri pré-revestida em 50 ml de RPMI 1640 com glutamina estabilizada / 10% FCS / IL-2 20 U/ml (Proleukin, Chiron) e estimuladas por 2 dias. No terceiro dia as células são coletadas e lavadas uma vez RPMI 1640. IL-2 é adicionado a uma concentração final de 20 U/ml e as células são cultivadas novamente por um dia no mesmo meio de cultura de célula que o anterior.

As células alvo são lavadas duas vezes com PBS e marcadas com 11.1 MBq ⁵¹Cr em um volume final de 100 µl RPMI com 50% FCS por 45 minutos a 37°C. Subsequentemente as células alvo marcadas são lavadas 3 vezes com 5 ml RPMI e então usadas no ensaio de citotoxicidade. O ensaio é realizado em uma placa de 96 poços em um volume total de 250µl RPMI suplementado (conforme anterior) com uma razão E:T de 10:1. 1 µg/ml das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífico específico de espécie cruzada e 20 diluições por três vezes são então aplicadas. O tempo de ensaio é de 18 horas e a citotoxicidade é medida como valores relativos de cromo liberado no sobrenadante relacionado à diferença de lise máxima (adição de Triton-X) e lise espontânea (sem células efetoras). Todas as medições são feitas em quádruplos. A medição de atividade de cromo nos sobrenadantes é realizada com um contador de gama Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Köln, Alemanha). A análise dos dados experimentais é realizada com Prism 4 por Windows (versão 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). As curvas de resposta de dose sigmoide tipicamente têm valores de R² >0.90 conforme determinado pelo software. Os valores EC₅₀ como medida de potencia são calculados pelo programa de análise.

25. Geração e caracterização de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífico específico de espécies cruzadas CD19 e CD3

25.1. Clonagem e expressão de antígeno CD19 humano em células de CHO

5 A sequência do antígeno CD19 humano (NM_001770 Homo sapiens CD19 molécula (CD19), mRNA, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) foi usada para obter uma molécula sintética por síntese genética de acordo com os protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi também atribuído com o para conter um sítio Kozak para expressão

10 eucariótica do constructo e sítios de restrição ao início e ao final do DNA. Os sítios de restrição introduzidos EcoRI a terminação 5 e Sall a terminação 3 foram utilizados durante a etapa de clonagem no plasmídeo de expressão designado pEFDHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Depois da verificação de sequência o plasmídeo foi usado para transfectar as células

15 CHO/dhfr- da seguinte maneira. Um plasmídeo de sequência verificada foi usado para transfectar células CHO/dhfr- (ATCC nº CRL 9096; cultivadas em RPMI 1640 com glutamina estabilizada obtida a partir de Biochrom AG Berlin, Alemanha, suplementada com 10% FCS, 1% penicilina/estreptomicina todas obtidas a partir de AG Berlin, Alemanha e nucleosídeos a partir de uma solução mãe de reagentes

20 de grau de cultura de célula obtida a partir de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha, a uma concentração final de 10 µg/ml Adenosina, 10 µg/ml Deoxiadenosina e 10 µg/ml Timidina, em um incubador a 37 C, 95% de humidade e 7% de CO₂). A transfecção foi realizada com uso de Reagente de Transfecção PolyFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e 5 µg de DNA plasmídeo de acordo

25 com o protocolo do fabricante. Após o período de cultura de 24 horas as células foram lavadas uma vez com PBS e novamente cultivadas no anteriormente mencionado meio de cultura de célula exceto que o meio não foi suplementado com nucleosídeos e FCS dialisado (obtido a partir de Biochrom AG Berlin, Alemanha) foi usado. Assim o meio de cultura de célula não contém nucleosídeos

30 e através desta seleção foi aplicado nas células transfeccionadas.

Aproximadamente 14 dias após a transfecção a germinação de células resistentes foi observada. Após um adicional de 7 a 14 dias os transfectados foram testados positivos para expressão do constructo por meio de FACS. A expressão de proteína eucariótica em células de CHO deficientes de DHFR é realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. A amplificação de gene de constructo é induzida aumentando-se as concentrações de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM MTX.

25.2. Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas para espécies cruzadas CD19 e CD3

Geralmente, moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica, cada uma compreendendo um domínio com uma especificidade vinculada para o antígeno humano e o sítio CD3 assim como um domínio com uma especificidade vinculada para o antígeno CD19 humano, foram atribuídos como estabelecido na seguinte Tabela 8:

Tabela 8: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica de espécies cruzadas anti-CD3 e anti-CD19

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
482/481	HD37 LH x I2C HL
486/485	HD37 LH x F12Q HL
484/483	HD37 LH x H2C HL
534/533	hCD19 47-A3 LH x I2C HL
522/521	hCD19 46-B11LH x I2C HL
510/509	hCD19 45-A10 LH x I2C HL
498/497	hCD19 26-D6 LH x I2C HL
546/545	HD37-DT LH x I2C HL
558/557	HD37-A LH x I2C HL
570/569	HD37-G LH x I2C HL
582/581	HD37-S LH x I2C HL
594/593	HD37-T LH x I2C HL

606/605	HD37-I LH x I2C HL
618/617	HD37-L LH x I2C HL
630/629	HD37-V LH x I2C HL
642/641	HD37-E LH x I2C HL
654/653	HD37-Q LH x I2C HL
666/665	HD37-N LH x I2C HL
678/677	HD37-K LH x I2C HL
690/689	HD37-R LH x I2C HL
702/701	HD37-H LH x I2C HL
714/713	HD37-Y LH x I2C HL
726/725	HD37-P LH x I2C HL
738/737	HD37-F LH x I2C HL
750/749	HD37-W LH x I2C HL
762/761	HD37-M LH x I2C HL
1283/1282	hCD19 5-A9 LH x I2C HL
1297/1296	hCD19 2-C6 LH x I2C HL
1311/1310	hCD19 4-C7 LH x I2C HL
1325/1324	hCD19 2-D7 LH x I2C HL
1339/1338	hCD19 2-D4 LH x I2C HL
1353/1352	hCD19 5-G3 LH x I2C HL
1367/1366	hCD19 4-E10 LH x I2C HL
1381/1380	hCD19 4-E3 LH x I2C HL
1395/1394	hCD19 3-H7 LH x I2C HL

Os constructos supracitados que contém os domínios específicos de cadeia leve variável (L) e cadeia pesada variável (H) para CD19 humano e o CD3 específico VH e espécie cruzadas de combinações VL específicas para CD3 humano e símio foram obtidas por síntese genética. Os

5 fragmentos de síntese genética foram atribuídos e a expressão de proteína eucariótica foi realizada em analogia ao procedimento descrito no exemplo 9 para

as moléculas de cadeia única específicas de espécie cruzada MCSPxCD3.

25.3. Expressão e purificação das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecífica

As moléculas de anticorpo de cadeia biespecífica foram expressas em células de ovário de um hamster chinês (CHO) ou células HEK 293 conforme descrito anteriormente no presente para os anticorpos de cadeia única biespecífica MCSPxCD3.

O isolamento e análise dos anticorpos de cadeia única biespecífica expressados foi também descrito anteriormente no presente no Exemplo 9.

25.4. Análise de aglutinação citométrica de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos de espécie cruzada

Com objetivo de testar a funcionalidade dos e constructos de anticorpo biespecífico específico para espécies cruzadas com respeito a capacidade de aglutinação ao CD19 humano assim como ao CD3 humano e símio, uma análise FACS foi realizada. Para esse propósito as células de CHO transfectadas com CD19 humano conforme descrito no exemplo 25.1 e CD3 humano positivo para linhagem de célula de leucemia de célula T HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) foram usados para verificar a aglutinação a antígenos humanos. A reatividade de aglutinação a CD3 símio foi testada pelo uso de uma linhagem de célula T de macaco 4119LnPx (gentilmente fornecida pelo Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; Knappe A, et al., e Fickenscher H: Herpesvírus saimiríneo transformado em células T síbias foram tolerados e não causaram linfoma após reinfusão antóloga. Blood 2000;95:3256-61.) 200,000 células da respectiva população de célula foram incubadas por 30 min em gelo com 50 µl da proteína purificada dos constructos de anticorpo biespecífico específico para espécies cruzadas (e. g. 2 µg/ml) Alternativamente o sobrenadante de cultura de célula de proteína produzida brevemente foi usado. As células foram lavadas duas vezes em PBS e a aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo Penta His murino não marcado (Qiagen; diluído 1:20 in 50 µl de PBS com 2% de FCS). Após a lavagem,

anticorpos anti His vinculados foram detectados com um anticorpo específico por gama Fc (Dianova) conjugado com ficoeritrina, diluída 1:100 in 50 µl de PBS com 2% de FCS. O meio de cultura novo foi usado como um controle negativo.

A citometria de fluxo foi realizada em um aparelho FACSCalibur, o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). A marcação e medição de FACS da intensidade de fluorescência foram realizadas conforme descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

Na análise de FACS mostrada na figura 50 todos os constructos testados mostraram aglutinação ao CD3 humano e símio e ao CD19 humano.

25.5. Bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecífica específicos de espécie cruzada CD19 e CD3

A bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecífica foi analisada por cromo 51 liberado em ensaio in vitro de citotoxicidades com uso de linhagem de célula positiva de CD19 descrito no exemplo 25.1. As células efetoras estimuladas células T positivas de CD8 humano ou a linhagem de célula T de macaco 4119LnPx foram usadas.

A geração de PBMC humana simulada conforme descrito anteriormente no presente no Exemplo 11.

Células alvo preparadas e o ensaio foi realizado em analogia ao procedimento descrito para os anticorpos de cadeia única biespecífica MCSPxCD3 no exemplo 11.

No ensaio de citotoxicidade de células T mostrado na figura 51 todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecífica testados revelaram atividade citotóxica contra as células alvo positivas de CD19 humano extraídas por células CD8+ humanas e contra as células alvo positivas de CD19 humano extraídas pela linhagem de célula T de macaco 4119LnPx. Como um controle negativo, um anticorpo de cadeia única biespecífica irrelevante foi usado.

25.6. Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas

específicas para espécies cruzadas CD19 e CD3 adicionais

A sequência VH1 1-46 de linha genética VH de anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para CDRH1 (SEQ ID NO 473), CDRH2 (SEQ ID NO 474) e CDRH3 (SEQ ID NO 475).

- 5 Para o VH humano, vários oligonucleotídeos degenerados tiveram que ser sintetizados que sobrepueram em um terminal alongado de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Para esse fim cada segundo iniciador é um iniciador anti-senso. Para VH1 1-46 os seguintes oligonucleotídeos são usados (5' a 3'):

5'-37VH-aXho1

- 10 CAG CTG CTC GAG TCT GGG GCT GAG STG RWG ARG CCT GGG KCC TCA
GTG AAG RTT TCC TGC AAG GCT TCT GGC (SEQ ID N° 763)

3'-37VH-b

cca ctc aag acc ctg tcc agg GSS ctg cYt cac cca gtt cat cca gta gct aGw gaa tgY
ata gcc aga agc ctt gca gga (SEQ ID N° 764)

- 15 5'-37VH-c

GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATK GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT GGT
GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG (SEQ ID N° 765)

3'-37VH-d

- cag gct gct gag ttS cat gta gRc tgt gct ggt gga tKY gtc ASS agt caK agt gRc tYt acc
20 ctt gaa ctt tcc att gta g (SEQ ID N° 766)

5'-37VH-e

C ATG SAA CTC AGC AGC CTG SSA TCT GAG GAC ACT GCG GTC TAT TWC
TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG G (SEQ ID N° 767)

3'-37VH-fBstE2

- 25 gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gcc cca gta gtc cat agc ata gta ata acg gcc tac cgt
cgt agt ctc ccg tct tgc (SEQ ID N° 768)

O conjunto de iniciador se transpõe sobre toda a sequência VH correspondente.

- 30 Dentro do conjunto, iniciadores são misturados em quantidades iguais
(por exemplo, 1 µl de cada iniciador (estoque de iniciador de 20 a 100 µM) para

uma reação de 20 µl de PCR) e adicionado a uma mistura de PCR que consiste em tampão de PCR, nucleotídeos e polimerase Taq. Essa mistura é incubada a 94 °C por 3 minutos, a 65 °C por 1 minuto, a 62°C por 1 minuto, a 59 °C por 1 minuto, a 56 °C por 1 minuto, a 52 °C por 1 minuto, a 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um ciclador PCR. Subsequentemente, o produto passa por uma eletroforese em gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 é isolado do gel de acordo com métodos padrões.

O produto PCR de VH é então usado como um modelo para uma reação de PCR padrão com uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem adequados N-terminal e C-terminal. O fragmento de DNA do tamanho correto (para um VH de aproximadamente 350 nucleotídeos) é isolado por eletroforese em gel de agarose gel de acordo com métodos padrão. Desta forma fragmento de DNA de VH suficiente é amplificado.

A sequência Vkl O12 de linha genética VL de anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para CDRL1 (SEQ ID NO 478), CDRL2 (SEQ ID NO 479) e CDRL3 (SEQ ID NO 480). Para o VL humano, diversos oligonucleotídeos degenerados tiveram que ser sintetizados que sobrepuseram em um terminal alongado de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Para esse fim, cada segundo iniciador é um iniciador anti-senso. Sítios de restrição necessários para posterior clonagem dentro dos oligonucleotídeos foram apagados. Para Vkl O12 os seguintes oligonucleotídeos são usado (5'a 3'):

5'-37VL-A-SacI

CAG CTG GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA KCT TCT TTG KCT GYG
TCT STA GGG SAS AGA GYC ACC ATC WCC TGC AAG GCC AGC (SEQ ID N° 769)

3'-37VL-B

ctg ttg gta cca gtt caa ata aSt SNN acc atc ata atc aac act ttg gct ggc ctt gca ggt gat
ggt (SEQ ID N° 770)

5'-37VL-C

TTG AAC TGG TAC CAA CAG AWA CCA GGA MAG SCA CCC AAA CTC CTC
ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT (SEQ ID N° 771)

3'-37VL-D

gag ggt gaa gtc tgt ccc aga ccc act gcc act aaa cct ggR tgg gaY ccc aga aac tag att

5 gga tgc (SEQ ID N° 772)

5'-37VL-E

GGG ACA GAC TTC ACC CTC AMC ATC MRT YCT STG SAG MMG GWG GAT
KYC GCA ACC TAT YAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG (SEQ ID N° 773)

3'-37VL-F-BsiW1Spe1

10 ACT CAG ACT AGT CGT ACG ttg gat ctc cac ctt ggt ccc ttg acc gaa cgt cca cgg atc
ctc agt act ttg ctg aca g (SEQ ID N° 774)

Esse conjunto de iniciador se transpõe sobre toda a sequência VL correspondente.

Dentro do conjunto, iniciadores são misturados em quantidades (por
15 exemplo, 1 µl de cada iniciador (estoque de iniciador de 20 a 100 µM) para uma
reação de 20 µl de PCR) e adicionado a um mistura de PCR que consiste em um
tampão de PCR, nucleotídeos e polimerase Taq. Essa mistura é incubada a 94 °C
por 3 minutos, a 65 °C por 1 minuto, a 62°C por 1 minuto, a 59 °C por 1 minuto, a
56 °C por 1 minuto, a 52 °C por 1 minuto, a 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10
20 minutos em um ciclador PCR. Subsequentemente, o produto passa por uma
eletroforese em gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 é isolado
do gel de acordo com métodos padrão.

O produto PCR de VL é então usado como um modelo para uma
reação de PCR padrão com uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição
25 de clonagem adequados N-terminal e C-terminal. O fragmento de DNA do tamanho
correto (para um VL de aproximadamente 330 nucleotídeos) é isolado por
eletroforese em gel de agarose de acordo com métodos padrões. Desta forma
fragmento de DNA VL suficiente é amplificado.

O VH1 1-46 final baseado no produto PCR de VH (isto é, o repertório
30 de VH humano/humanizado) é então combinado com o Vkl O12 final baseado no

produto PCR de VL (isto é, o repertório de VL humano/humanizado) no vetor de exibição de fago pComb3H5Bhis para formar uma biblioteca de scFvs funcionais a partir dos quais – após exibição em fago filamentosos – aglutinadores de anti-CD19 são selecionados, classificados, identificados e confirmados conforme descrito no seguinte:

450 ng nos fragmentos de cadeia leve (SacI-SpeI digeridos) são ligados com 1400 ng do fagomídeo pComb3H5Bhis (SacI-SpeI digerido; fragmento grande). A biblioteca de anticorpo combinatório resultante é então transformada em 300 µl de células eletrocompetentes *Escherichia coli* XL1 Blue por eletroporação (2,5 kV, cubeta de intervalo de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm, Biorad gene-pulser) resultando em um tamanho de biblioteca de mais de 10⁷ clones independentes. Após uma hora de expressão de fenótipo, transformantes positivos são selecionados para resistência de carbenicilina codificada pelo vetor pComb3H5Bhis em 100 ml de cultura por super caldo (SB) líquido durante a noite. As células são então colhidas por centrifugação e a preparação de plasmídeo é executada com uso de um kit de preparação de plasmídeo comercialmente disponível (Qiagen).

2800 ng deste DNA plasmídeo contendo a biblioteca VL (XhoI-BstEII digerido; fragmento grande) são ligados com 900 ng dos fragmentos V de cadeia pesada (XhoI-BstEII digerido) e novamente transformado em duas alíquotas de 300 µl de células de eletrocompetente *E. coli* XL1 Blue por eletroporação (2,5 kV, cubeta de intervalo de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm) resultando em uma biblioteca de scFv com um tamanho de mais de 10⁷ clones independentes.

Após a expressão de fenótipo e adaptação lenta a carbenicilina, as células *E. coli* contendo a biblioteca de anticorpo são transferidas em meio de seleção de carbenicilina por SB (SB com 50 µg/mL de carbenicilina). As células *E. coli* contendo a biblioteca de anticorpo são infectadas com uma dose infecciosa de 10¹² partículas de fago auxiliar VCSM13 resultando na produção e secreção de fago M13 filamentosos, em que cada partícula de fago contém DNA de pComb3H5Bhis torcido único codificando um fragmento de scFv e exibe a proteína

scFv correspondente como uma fusão translacional para a proteína de revestimento de fago III. Este grupo de fagos que exibem a biblioteca de anticorpo é usado para a seleção de entidades de aglutinação de antígeno.

Para esse propósito, a biblioteca de fago que carrega o repertório
5 scFv clonado é colhida a partir do respectivo sobrenadante de cultura por precipitação e centrifugação de PEG8000/NaCl. Aproximadamente, de 1011 a 1012 partículas de fago de scFv são novamente suspensas em 0,4 ml de PBS/0,1% BSA e incubadas com 105 a 107 de células de CHO transfectadas de CD19 (vide exemplo 1) por 1 hora em gelo sob agitação lenta. Essas células de
10 CHO transfectadas de CD19 são colhidas de antemão por centrifugação, lavadas em PBS e novamente suspensas em PBS/1 % FCS (contendo Azido de Na). Os fagos de scFv o qual não especificamente se aglutina às células de CHO transfectadas de CD19 são eliminados por até 5 etapas de lavagem com PBS/1 % FCS (contendo Azido de Na). Após a lavagem, entidades de aglutinação são
15 eluídas a partir das células por nova suspensão das células em glicina HCl pH 2,2 (10 min de incubação com subsequente vortexação) e após a neutralização com 2 M Tris pH 12, o eluído é usado para infecção de uma nova cultura de *E. coli* XL1 Blue não infectada ($OD_{600} > 0,5$). A cultura de *E. coli* contendo células *E. coli* transduzido com sucesso com uma cópia de fagomídeo, que codifica um fragmento
20 scFv humano/humanizado, são novamente selecionadas por resistência de carbenicilina e subsequentemente infectadas com fago auxiliar VCMS 13 para iniciar a segunda rodada de exibição de anticorpo e seleção in vitro. Um total de 4 a 5 rodadas de seleções são executadas, normalmente.

Para triar DNA de plasmídeo de aglutinadores específicos CD19, o
25 correspondente a 4 e 5 ciclos de panning são isolados de culturas de *E. coli* após a seleção. Para a produção de proteína-scFv solúvel, os fragmentos de DNA de scFv são excisados dos plasmídeos (XhoI-SpeI). Estes fragmentos são clonados através dos mesmos sítios de restrição no plasmídeo pComb3H5BFlag/His diferenciado do original pComb3H5BHis no que o constructo de expressão (isto é, o scFv) inclui
30 uma FLAG tag (DYKDDDDK, SEQ ID Nº 775) em seu Terminal C antes da etiqueta

His6 e no que aquele domínio de proteína de fago III/N2 e o domínio da proteína III/CT foram excluídos. Após a ligação, cada grupo (ciclos diferentes de panning) de DNA de plasmídeo é transformado em 100 µl de TG1 de *E. coli* competente por choque térmico ou XLI blue e é plaqueado em LB-agar contendo carbenicilina.

- 5 Colônias únicas são selecionadas em 100 µl de LB carb (LB com 50 µg/ml de carbenicilina).

A *E. coli* transformada com pComb3H5BFlag/His contendo um fragmento de DNA de scFv produz a proteína-scFv solúvel em quantidades suficientes após a indução com 1 mM de IPTG. Graças a uma sequência de sinal
10 adequada, o scFv é exportado para o periplasma onde ele passa a ter uma conformação funcional.

Colônias bacterianas TG1 de *E. coli* únicas das placas de transformação são selecionadas para preparações de pequena escala periplásmicas e cultivadas em meio SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20
15 mM de MgCl₂ e carbenicilina em 50µg/ml (e re-dissolvido em PBS (por exemplo, 1 ml) após a colheita. Um choque de temperatura é aplicado por quatro ciclos de congelamento a -70°C e degelo a 37°C através dos quais a membrana externa da bactéria é destruída e as proteínas periplásmicas solúveis, incluindo os scFvs, são liberadas no sobrenadante. Após a eliminação de células intactas e fragmentos
20 celulares por centrifugação, o sobrenadante contendo os scFvs de anti-CD19 é coletado e usado para a identificação de aglutinador específico de CD19 conforme segue:

A aglutinação de scFvs a CD19 é testada por citometria de fluxo em células CHO transfectadas com CD19 (ver, por exemplo, 25.1); sendo que as
25 células CHO não transfectadas são usadas como um controle negativo.

Para a citometria de fluxo, 2,5x10⁵ células são incubadas com 50 µl de preparação periplásmica de scFv ou com 5 µg/ml de scFv purificado em 50 µl de PBS com 2% de FCS. A aglutinação de scFv é detectada com um anticorpo anti-His (Anticorpo Penta-His, isento de BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) em 2
30 µg/ml em 50 µl de PBS com 2% de FCS. Como um reagente de segunda etapa,

um fragmento F(ab')₂ purificado de afinidade conjugado a R-Ficoeritrina, IgG anti-camundongo de cabra (específico de fragmento de Fc-gama), diluído em 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS (Dianova, Hamburg, FRG) é usado. As amostras são medidas em um FACSscan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

5 Clones únicos são, então, analisados por propriedades favoráveis e sequência de aminoácido. scFvs específicos de CD19 são convertidos em anticorpos de cadeia única biespecíficos recombinantes ao uni-los através de um aglutinador Gly4Ser1 com o I2C scFv específico de CD3 (sequência de aminoácido SEQ ID Nº 185, sequência de ácido nucléico SEQ ID Nº 186) ou qualquer outro
10 scFv específico de CD3 da invenção para resultar em constructos com a disposição de domínio VLCD19 - (Gly4Ser1)₃ -VHCD19- Gly4Ser1-VHCD3 - (Gly4Ser1)₃ - VLCD3. Para a expressão em células CHO, as sequências de codificação de (i) um líder de cadeia pesada de imunoglobulina de Terminal N que compreende um códon iniciador embutido em uma sequência de consenso Kozak
15 e (ii) um His6-tag em Terminal C seguido de um códon de parada são, ambos, fixados em estrutura à sequência de nucleotídeo que encodifica os anticorpos de cadeia única biespecífica anteriormente à inserção do fragmento de DNA resultante, conforme obtido pela síntese gênica no sítio de clonagem múltipla do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50
20 (2001) 141 a 150). A transfecção dos plasmídeos de expressão gerados, de expressão de proteína e de purificação de constructos de anticorpo biespecífico específico de espécies cruzadas é realizada conforme descrito nos exemplos 25.2 e 25.3. Todos os outros estados dos procedimentos da técnica são executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory
25 Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)).

A identificação de constructos de anticorpo de cadeia única biespecífico funcional é executada por análise de aglutinação por citometria de fluxo de sobrenadante cultura de células transfectadas que expressão os
30 constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. A análise

é realizada conforme descrito no Exemplo 25.4.

Apenas aqueles constructos que mostram a aglutinação biespecífica ao CD3 humano e símio CD3 assim como a CD19 são selecionados para uso posterior.

5 A atividade citotóxica de constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas contra células alvo positivas para CD19 obtidas pelas células T efetoras é analisada conforme descrito no Exemplo 25.5. As células CHO transfectadas com CD19 humano são usadas como células alvo e as PBMCs humanas depletadas de CD4/CD56 estimuladas ou a linhagem
10 de células T símia 4119LnPx como células T efetoras. Apenas aqueles constructos que mostram citotoxicidade de célula T redirecionada potente contra células alvo positivas para CD19 são selecionados para uso posterior.

26. Geração e caracterização de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de C-MET e CD3

15 26.1 Geração de células CHO que expressam C-MET humano

A sequência de codificação do C-MET humano, conforme publicado no GenBank (Número de Acesso NM_000245), foi obtida por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi designado para conter primeiro um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo
20 seguido da sequência de codificação da proteína de C-MET humano e um códon de parada (o cDNA e a sequência de aminoácido do constructo estão listados sob SEQ ID N^{os} 776 e 777). O fragmento de síntese genética também foi designado para introduzir sítios de restrição no início e no fim do fragmento. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram
25 utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. Os sítios de restrição interna foram removidos por mutação silenciosa da sequência de codificação no fragmento de síntese genética (Sall: nucleotídeo 366 de C a G; EcoRI e XbaI: nucleotídeos 2059 a 2061 de TCT a AGC; EcoRI: nucleotídeo 2304 de T a C). o fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado
30 pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50

(2001) 141 a 150) seguindo protocolos padrão. Os procedimentos supramencionados foram executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com
 5 uma sequência de nucleotídeo verificada por sequência foi transfectado em células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida pelo aumento de
 10 concentrações de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

26.2 Geração de células CHO que expressam C-MET símio

A sequência de cDNA de C-MET símio (cinomolgo) foi obtida por um conjunto de 5 PCRs em cDNA de fígado de macaco símio preparado de acordo
 15 com protocolos padrão. As seguintes condições de reação: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos seguido de 40 ciclos com 94°C por 1 minutos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos seguido de um ciclo terminal de 72°C por 3 minutos e os seguintes iniciadores foram usados:

4. iniciador direto: 5'-aggaattcaccatgaaggcccccgcgtgtgcttgccacc-3'
 20 (SEQ ID N°: 778)
 iniciador reverso: 5'-ctccagaggcatttccatgtagg-3' (SEQ ID N°: 779)

5. iniciador direto: 5'-gtccaaagggaaactctagatgc-3' (SEQ ID N°: 780)
 iniciador reverso: 5'-ggagacactggatgggagtgccagg-3' (SEQ ID N°: 781)

25 6. iniciador direto: 5'-catcagagggtcgcttcatgcagg-3' (SEQ ID N°: 782)
 iniciador reverso: 5'-gctttggtttcagggggagttgc-3' (SEQ ID N°: 783)

7. iniciador direto: 5'-atccaaccaaattctttattagtggtgg-3' (SEQ ID N°: 784)
 30 iniciador reverso: 5'-gacttcattgaaatgcacaatcagg-3' (SEQ ID N°: 785)

8. iniciador direto: 5'-tgctctaaatccagagctgtgtcc-3' (SEQ ID N°: 786)
 iniciador reverso: 5'-gtcagataagaaattccttagaatcc-3' (SEQ ID N°: 787)

Estes PCRs geraram cinco fragmentos sobrepostos, que foram isolados e seqüenciados de acordo com protocolos padrão com o uso dos
 5 iniciadores de PCR, e, por meio disso, forneceram uma porção da sequência de cDNA que codifica C-MET símio do códon 10 do peptídeo líder ao último códon da proteína madura. Para gerar um constructo para a expressão de C-MET símio, um
 10 fragmento de cDNA foi obtido por síntese genética de acordo com protocolos padrão (o cDNA e a sequência de aminoácido do constructo são listados sob SEQ ID N°s 788 e 789). Neste constructo, a sequência de codificação de C-MET símio do aminoácido 10 do peptídeo líder ao último aminoácido da proteína C-MET madura seguida de um códon de parada foi fundida em estrutura à sequência de codificação dos aminoácidos 1 a 9 do peptídeo líder da proteína C-MET humana. O
 15 fragmento de síntese genética também foi designado para conter um sítio Kozak para a expressão eucariótica do constructo e sítios de restrição no início e no fim do fragmento contendo o cDNA. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. Sítios de restrição interna foram removidos por mutação silenciosa da sequência de codificação no fragmento de síntese genética
 20 (Sall: nucleotídeo 366 de C a G; EcoRI: nucleotídeo 2055 de G a C). O fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo os protocolos padrão. Os procedimentos supramencionados foram executados de acordo com os protocolos
 25 padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com sequência de nucleotídeo verificada por sequência foi transfectado em células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR foi
 30 realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537

a 566. A amplificação genética do constructo foi induzida ao aumentar as concentrações de metotrexato (MTX) para uma concentração final de até 20 nM de MTX.

26.3 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas

5 de espécies cruzadas de C-MET e CD3

Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas

Em geral, moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, cada uma compreendendo um domínio com uma espécie cruzadas de especificidade de aglutinação específicas para épsilon de CD3 humano e de primata, salvo chimpanzé, assim como um domínio com uma especificidade de aglutinação para C-MET, foram designadas conforme está apresentado na tabela 9 a seguir:

Tabela 9: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas anti-C-MET e anti-CD3

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
830/829	MET1HLxI2CHL
854/853	MET4HLxI2CHL
872/871	MET5HLxI2CHL
890/889	MET6HLxI2CHL
832/831	MET1LHxI2CHL
856/855	MET4LHxI2CHL
874/873	MET5LHxI2CHL
892/891	MET6LHxI2CHL
906/905	MET7LHxI2CHL

15 Os constructos supramencionados contendo os domínios de cadeia leve variável (L) e a cadeia pesada variável (H) específicos para C-MET e as espécies cruzadas de combinações de VH e VL específicos de CD3 específicas para CD3 humano e símio foram obtidos por síntese genética. Os fragmentos de síntese genética foram designados e a expressão de proteína eucariótica foi

realizada em analogia ao procedimento descrito no exemplo 9 para as moléculas de cadeia única específicas de espécies cruzadas MCSPxCD3. As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas foram expressas nas células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células HEK 293, conforme descrito aqui acima para os anticorpos de cadeia única biespecíficos de MCSPxCD3.

O isolamento e a análise dos anticorpos de cadeia única biespecíficos expressos também foram descritos aqui, acima, no Exemplo 9.

Conforme mostrado na Figura 55, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados demonstraram uma atividade citotóxica contra células alvo positivas para cMET símio elicitada pela linhagem de célula T símia 4119LnPx.

26.5 Análise de aglutinação por citometria em fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos de espécies cruzadas de C-MET e CD3

Para testar a funcionalidade de constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas em relação à capacidade de aglutinação a C-MET e a CD3 humano e símio, respectivamente, uma análise FACS foi realizada. Para este fim, a linhagem de célula de câncer de mama positiva de C-MET humano MDA-MB-231 (ATCC No. HTB-26) e a linhagem de célula de leucemia de célula T positiva CD3 humana HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) foram usadas para testar a aglutinação aos antígenos humanos. A reatividade de aglutinação ao CD3 símio foi testada ao usar a linhagem de célula T símia 4119LnPx (fornecida gentilmente pelo Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado em Knappe A, et al., e Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256 a 61). 200.000 células das respectivas linhagens de células foram incubadas por 30 minutos em gelo com 50 µl de sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. As células foram lavadas duas vezes em PBS com 2% de FCS e a aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo Penta His murino (Qiagen; diluído em 1:20 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). Após a lavagem, anticorpos anti His ligados foram detectados com um anticorpo

gama-específico Fc (Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluído em 1:100 em PBS com 2% de FCS. O sobrenadante de células não transfectadas foi usado como um controle negativo.

A citometria de fluxo foi executada em um aparelho de FACS-Calibur, o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). O mancha-mento FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram executados conforme descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A aglutinação biespecífica das moléculas de cadeia única listadas acima, que são específicas para C-MET e específicas de espécies cruzadas para CD3 humano e de primata, salvo chimpanzé, foi claramente detectável, conforme mostrado na Figura 52. Na análise FACS, todos os constructos mostraram aglutinação a CD3 e C-MET se comparado ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos para CD3 humano e símio foi demonstrada.

26.6 Bioatividade de Anticorpos de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas de C-MET e CD3

A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados foi analisada pelos ensaios de citotoxicidade in vitro de liberação de crômio 51 (⁵¹Cr) com o uso da linhagem de células MDA-MB-231. Já que células efetoras estimularam CD4/CD56 humano, PBMC depletadas foram usadas.

A geração de PBMC humanas estimuladas foi descrita acima no Exemplo 11. As células alvo preparadas e o ensaio foi realizado em analogia ao procedimento descrito para os anticorpos de cadeia única biespecíficos MCSPxCD3 no Exemplo 11.

Conforme mostrado na Figura 53, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados demonstraram atividade citotóxica contra as células alvo positivas C-MET elicitadas por PBMC depletadas de CD4/CD56 humanos estimulados.

26.7 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de C-MET e CD3 adicionais

A sequência VH1 1-03 da linhagem germinativa de anticorpo humano VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhido como contexto de estrutura para

5 CDRH1 (SEQ ID Nº 821), CDRH2 (SEQ ID Nº 822) e CDRH3 (SEQ ID Nº 823). Da mesma forma, a sequência VH1 1-46 da linha germinativa de anticorpo humano VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para CDRH1 (SEQ ID Nº 836), CDRH2 (SEQ ID Nº 837) e CDRH3 (SEQ ID Nº 838). Para cada VH humana, diversos oligonucleotídeos degenerados têm que ser

10 sintetizados que sobrepõem em um trecho de terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. para este fim, a cada dois iniciadores, um é um iniciador antisenso. Para VH1 1-03, os seguintes oligonucleotídeos são usados:

5'CM1-VH-A-XhoI (SEQ ID Nº: 790)
 CCA TGT CTC GAG TCT GGG SCT GAA STG RWG ARG CCT GGG GCT TCA
 15 GTG AAA RTG TCC TGC ARG GCT TCG GGC TAT ACC TTC

3'CM1-VH-B (SEQ ID Nº: 791)
 AT CCA CTC AAG CCY TTG TCC AGG CSY CTG TYT AAC CCA GTG CAA CCA
 GTA GCT GGT GAA GGT ATA GCC CGA AGC

5'CM1-VH-C (SEQ ID Nº: 792)
 20 GG CTT GAG TGG ATK GGC ATG ATT GAT CCT TCC AAT AGT GAC ACT AGG
 TTT AAT CCG AAC TTC AAG GAC

3'CM1-VH-D (SEQ ID Nº: 793)
 GCT GCT GAG CWS CAT GTA GGC TGT GYT GGM AGA TST GTC TMY AKT
 SAW TGT GRC CYT GTC CTT GAA GTT CGG ATT

25 5'CM1-VH-E (SEQ ID Nº: 794)
 GCC TAC ATG SWA CTC AGC AGC CTG ASA TCT GMG GAC ACT GCA GTC
 TAT TAC TGT GCC ASA TAT GGT AGC TAC GTT

3'CM1-VH-F-BstEII (SEQ ID Nº: 795)
 CAT GTA GGT GAC CGA GGT TCC TTG ACC CCA GTA GTC CAG AGG GGA
 30 AAC GTA GCT ACC ATA

Para VH1 1-46, os oligonucleotídeos são conforme segue:

5' CM3-VH-A-XhoI (SEQ ID Nº: 796)

CCA TGT CTC GAG TCT GGG RCT GAA STG RWG AAG CCT GGG GCT TCA
GTG AAG STG TCC TGC AAG GCT TCT

5 3' CM3-VH-B (SEQ ID Nº: 797)

CTC AAG GCC TTG TCC AGG CSY CTG CYT CAC CCA GTG TAT CCA GTA
ACT GGT GAA GGT GTA GCC AGA AGC CTT GCA GGA

5' CM3-VH-C (SEQ ID Nº: 798)

10 CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATK GGA GAG ATT AAT CCT AGC AGC
GGT CGT ACTA AC TAC AAC GAG AAA TTC

3' CM3-VH-D (SEQ ID Nº: 799)

C TGT GGA GGT AGA TKT GTC TMY AGT CAY TGT GAC CYT GTT CTT GAA
TTT CTC GTT GTA GTT

5' CM3-VH-E (SEQ ID Nº: 800)

15 A TCT ACC TCC ACA GYC TAC ATG SAA CTC AGC ARC CTG ASA TCT GAG
GAC ACT GCG GTC TAT TAC TGT GCA

3' CM3-VH-F-BstEII (SEQ ID Nº: 801)

CAT GTA GGT GAC CGT GGT GCC TTG GCC CCA GTA GCC CCT WCT TGC
ACA GTA ATA GAC CGC

20 Cada um desses conjuntos de iniciadores transpõe toda a sequência
de VH correspondente.

Em cada conjunto, os iniciadores estão misturados em quantidades
iguais (por exemplo, reação de PCR de 1 µl de cada iniciador (grupos de
iniciadores 20 a 100 µM) a 20 µl) e adicionados a uma mistura de PCR que
25 consiste em tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase. Esta mistura é
incubada a 94 °C por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por
1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por
10 minutos em um cicladador de PCR. Subsequentemente, o produto é processado
em uma eletroforese de gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 é
30 isolado do gel de acordo com os to métodos padrão.

Cada produto de PCR de VH é, então, usado como um modelo para uma reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem adequados de Terminal N e Terminal C. O fragmento de DNA do tamanho correto (para uma VH aproximadamente 350 nucleotídeos) é isolado por eletroforese de gel de agarose de acordo com métodos padrão. Desta maneira, fragmento de DNA de VH o suficiente é amplificado.

A sequência VkII O11 da linhagem germinativa VL de anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida para contexto de estrutura para CDRL1 (SEQ ID Nº 816), CDRL2 (SEQ ID Nº 817) e CDRL3 (SEQ ID Nº 818). Da mesma forma, a sequência VkII A1 da linhagem germinativa VL de anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de contexto de estrutura para CDRL1 (SEQ ID Nº 833), CDRL2 (SEQ ID Nº 834) e CDRL3 (SEQ ID Nº 835). Para cada VL humana, alguns oligonucleotídeos degenerados têm que ser sintetizados que sobrepõem em um trecho de terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. para este fim, a cada dois iniciadores, um é um iniciador antisenso. Os sítios de restrição necessários para a clonagem posterior nos oligonucleotídeos são excluídos. Para VkII O11, os seguintes oligonucleotídeos são usados:

5' CM1-VL-A-SacI (SEQ ID Nº: 802)

CCT GTA GAG CTC GTG ATG ACC CAG ACT CCA YYC TCC CTA MCT GTG
ACA SYT GGA GAG MMG GYT TCT RTC AGC TGC AAG TCC AGT

3' CM1-VL-B (SEQ ID Nº: 803)

GTA CCA GGC CAA GTA GTT CTT CTG ACT GCT AGT ATA TAA AAG GGA
CTG ACT GGA CTT GCA GCT GA

5' CM1-VL-C (SEQ ID Nº: 804)

TAC TTG GCC TGG TAC CWG CAG AAA CCA GGT CAG TCT CCT MAA CTG
CTG ATT TAC TGG GCA TCC ACT AGG

3' CM1-VL-D (SEQ ID Nº: 805)

GAG AGT GAA ATC TGT CCC AGA TCC ACT GCC TGA GAA GCG ATC AGG
GAC CCC AGA TTC CC TAGT GGA TGC CCA GTA

5' CM1-VL-E (SEQ ID Nº: 806)

ACA GAT TTC ACT CTC AMA ATC TCC AGW GTG RAG GCT GAS GAC STG
GSA GTT TAT TAC TGT CAG CAA TAT

3' CM1-VL-F-BsiWI/SpeI (SEQ ID Nº: 807)

5 CCT CAG ACT AGT CGT ACG TTT GAT CTC CAA CTT TGT GCC TCC ACC
GAA CGT CCA CGG ATA GGC ATA ATA TTG CTG ACA GTA ATA

Para VklI A1, os oligonucleotídeos são os seguintes:

5' CM3-VL-A-SacI (SEQ ID Nº: 808)

CCT GTA GAG CTC GTG ATG ACC CAA TCT CCA SYT TCT TTG SCT GTG ACT
10 CTA GGG CAG CSG GCC TCC ATC TCC TGC

3' CM3-VL-Ba (SEQ ID Nº: 809)

GAA CCA ACT CAT ATA ACT ACC ACC ATC ATA ATC AAC ACT TTG GCT GGC
CTT GCA GGA GAT GGA GGC

3' CM3-VL-Bb (SEQ ID Nº: 810)

15 GAA CCA ACT CAT ATA ACT ACC ACC ATC ATA ATC AAC ACT AGA TTG GCT
GGC CTT GCA GGA GAT GGA GGC

5' CM3-VL-C (SEQ ID Nº: 811)

AGT TAT ATG AGT TGG TTC CAA CAG AGA CCA GGA CAG YCA CCC ARA
CKC CTC ATC TMT GCT GCA TCC AAT CTA

20 3' CM3-VL-D (SEQ ID Nº: 812)

GGT GAA GTC TGT CCC AGA GCC ACT GCC ACT AAA CCT GKC TGG GAY
CCC AGA TTC TAG ATT GGA TGC AGC

5' CM3-VL-E (SEQ ID Nº: 813)

TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAK ATC YMT CST GTG GAG GMG GAG
25 GAT GTT GSA RYC TAT TACT GT CAG CAA AGT

3' CM3-VL-F-BsiWI/SpeI (SEQ ID Nº: 814)

CCT CAG ACT AGT CGT ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC CTG ACC
GAA CGT GAG CGG ATC CTC ATA ACT TTG CTG ACA GTA ATA

Cada um desses conjuntos de iniciador atravessa toda a sequência

30 VL correspondente.

Em cada conjunto, iniciadores estão misturados em quantidades iguais (por exemplo, 1 µl de cada iniciador (quantidades de iniciador de 20 a 100 µM) para uma reação de 20 µl de PCR) e adicionados a uma mistura de PCR que consiste em tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase. Esta mistura é incubada a 94 °C por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um ciclador de PCR. Subsequentemente, o produto é processado em uma eletroforese de gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 isolado do gel, de acordo com métodos padrão.

Cada produto de PCR VL é, então, usado como um modelo para uma reação de PCR padrão como uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem adequados de Terminal N e Terminal C. o fragmento de DNA do tamanho correto (para uma VL aproximadamente 330 nucleotídeos) é isolado por eletroforese de gel de agarose, de acordo com métodos padrão. Desta forma, fragmento de DNA de VL o suficiente é amplificado.

O produto de PCR VH baseado em VH1 1-03 final (isto é, o repertório de VH humana/humanizada) é, então, combinado ao produto de PCR VL baseado em VkII O11 final (isto é, o repertório de VL humana/humanizada) e o produto de PCR VH baseado em VH1 1-46 final (isto é, o repertório de VH humana/humanizada) com o produto de PCR VL baseado em VkII A1 final (isto é, o repertório de VL humana/humanizada) no vetor de exibição em fago pComb3H5Bhis para formar duas bibliotecas diferentes de scFvs funcionais a partir das quais— após a exibição em fago filamentosos aglutinadores anti-C-MET são selecionados, triados, identificados e confirmados conforme descrito a seguir:

450 ng dos fragmentos de cadeia leve (digeridos por SacI-SpeI) são ligados com 1400 ng do fagemídeo pComb3H5Bhis (digerido por SacI-SpeI; fragmento grande). A biblioteca de anticorpo combinatória resultante é, então, transformada em 300 µl de células de XL1 Blue de *Escherichia coli* eletrocompetentes por eletroporação (2,5 kV, cubeta com abertura de 0,2 cm, 25 µ de FD, 200 Ohm, Biorad gene-pulser) resultando em um tamanho de biblioteca de

mais de 10^7 clones independentes. Após uma hora de expressão de fenótipo, transformadores positivos são selecionados a partir da resistência à carbenicilina encodificada pelo vetor pComb3H5BHis em 100 ml de caldo de cultura super líquido (SB) durante a noite. As células são, então, colhidas por centrifugação e a
5 preparação de plasmídeo é executada com o uso de um kit de preparação de plasmídeo disponível comercialmente (Qiagen).

2800 ng deste DNA de plasmídeo que contém a biblioteca VL (digerido por XhoI-BstEII; fragmento grande) são ligados com 900 ng dos fragmentos de V de cadeia pesada (digerido por XhoI-BstEII) e novamente
10 transformado em duas alíquotas de 300 µl de eletrocomponente de células *E. coli* XL1 Blue por eletroporação (2,5 kV, 0,2 cm de cubeta com abertura de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm) resultando em um tamanho de biblioteca de scFv de VH-VL total (fragmento variável de cadeia única) de mais que 10^7 clones independentes.

Depois da expressão fenotípica e da lenta adaptação para
15 carbenicilina, as células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo são transferidas para o meio de seleção SB-carbenicilina (SB com 50 µg/mL de carbenicilina). As células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo são, então, infectadas com uma dose infecciosa de 10^{12} partículas de fago auxiliar VCSM13 resultando na produção e secreção de fago M13 filamentoso, em que
20 cada partícula de fago contém DNA de pComb3H5BHis de filamento único encodificando um fragmento de scFv e exibe a proteína de scFv correspondente como uma fusão translacional para a proteína de revestimento de fago III. Este conjunto de fagos que exibe a biblioteca de anticorpos é usado para a seleção de entidade de aglutinação de antígeno.

25 Para este fim, a biblioteca de fago que porta o repertório de scFv clonado é colhida do respectivo sobrenadante de cultura por precipitação e centrifugação de PEG8000/NaCl. Aproximadamente 10^{11} a 10^{12} partículas de fago de scFv são ressuspensas em 0,4 ml de PBS/0,1% de BSA e incubadas com 10^5 a 10^7 células CHO transfectadas com C-MET (ver exemplo 26.1) por 1 hora em gelo
30 sob agitação lenta. Estas células CHO transfectadas com C-MET são colhidas

antecipadamente por centrifugação, lavadas em PBS e ressuspensas em PBS/1 % de FCS (contendo Azida de Na). O fago de scFv que não se liga especificamente às células CHO transfectadas com C-MET é eliminado por até cinco etapas de lavagem com PBS/1% de FCS (contendo Azida de Na). Depois da lavagem, as entidades de aglutinação são aluídas das células pela ressuspensão das células em Glicina pH 2,2 (10 minutos de incubação com vortexação subsequente) e depois da neutralização com 2 M Tris pH 12, o eluato é usado para infecção de uma cultura de *E. coli* XL1 Blue fresca não infectada (OD600>0,5). A cultura de *E. coli* contendo células de *E. coli* que foram transduzidas com uma cópia de fagemida, que encodifica um fragmento de scFv humano/humanizado, é novamente selecionada pela resistência à carbenicilina e subsequentemente infectada com fago auxiliar VCMS 13 para iniciar o segundo ciclo de exibição de anticorpo e seleção *in vitro*. Um total de 4 a 5 ciclos de seleções são executados, normalmente.

Para triar por aglutinadores específicos de cMET, o plasmídeo de DNA correspondente a 4 e 5 ciclos de panning é isolado de culturas de *E. coli* após a seleção. Para a produção de uma proteína-scFv solúvel, fragmentos de DNA de VH-VL são excisados dos plasmídeos (XhoI-SpeI). Estes fragmentos são clonados através dos mesmos sítios de restrição no plasmídeo pComb3H5BFlag/His diferindo do pComb3H5BHis original no que diz respeito ao constructo de expressão (por exemplo, scFv) que inclui uma FLAG tag (DYKDDDDK) entre o scFv e His6-tag e as proteínas de fagos adicionais são excluídas. Após a ligação, cada grupo (ciclos diferentes de panning) de DNA de plasmídeo PE transformado em 100 µl de *E. coli* TG1 competente por choque térmico ou XLI blue e plaqueado em LB-agar contendo carbenicilina. Colônias únicas são selecionadas em 100 µl de LB carb (LB com 50 µg/ml de carbenicilina).

A *E. coli* transformada com pComb3H5BHis contendo um segmento de VL e VH produz scFv solúvel em quantidades o suficiente após a excisão do fragmento de gene III e a indução com 1 mM de IPTG. Devido a uma sequência de sinal adequada, o scFv é exportado para o periplasma onde se transforma em uma

conformação funcional.

Colônias bacterianas únicas de *E. coli* TG1 das placas de transformação são selecionadas para preparações periplásmicas em pequena escala e cultivadas em meio SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20 mM de MgCl₂ e 50 µg/ml de carbenicilina (e re-dissolvidas em PBS (por exemplo, 1 ml) após a colheita. Um choque de temperatura é aplicado por quatro ciclos de congelamento a -70°C e degelo a 37°C em que a membrana externa da bactéria é destruída e as proteínas periplásmicas solúveis, incluindo os scFvs, são liberadas no sobrenadante. Após a eliminação de células intactas e fragmentos celulares por centrifugação, o sobrenadante contendo os scFvs anti-C-MET é coletado e usado para a identificação do aglutinador específico de C-MET, conforme segue:

A aglutinação de scFvs a C-MET é testada por citometria de fluxo em células CHO transfectadas com C-MET (ver o exemplo 247.1); as células CHO não transfectadas são usadas como controle negativo.

Para a citometria de fluxo, $2,5 \times 10^5$ células são incubadas com 50 µl de preparação periplásmica de scFv ou com 5 µg/ml de scFv purificado em 50 µl de PBS com 2% de FCS. A aglutinação de scFv é detectada com um anticorpo anti-His (Anticorpo Penta-His, isento de BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 µg/ml em 50 µl de PBS com 2% de FCS. Como um reagente de segunda etapa, um fragmento F(ab')₂ purificado de afinidade conjugado a R-Ficoeritrina, IgG anti-camundongo de cabra (Específico de fragmento de Fc-gama), diluído 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS (Dianova, Hamburg, FRG) é usado. as amostras são medidas em um FACSscan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

Clones únicos são, então, analisados para propriedades favoráveis e sequência de aminoácido. scFvs específicos de C-MET são convertidos em anticorpos de cadeia única biespecíficos recombinantes ao uni-los através de ligante-Gly₄Ser₁ com o I2C scFv específico de CD3 (SEQ ID: 185) ou qualquer outro scFv específico de CD3 da invenção para resultar em constructos com a disposição de domínio VH_{C-MET} - (Gli₄Ser₁)₃ - VL_{C-MET} - Ser₁Gli₄Ser₁-VH_{CD3} - (Gli₄Ser₁)₃ - VL_{CD3} ou disposições de domínio alternativas. Para a expressão em

células CHO, as sequências de codificação de (i) uma cadeia pesada líder de imunoglobulina de Terminal N que compreende um códon de início embutido em uma sequência de consenso Kozak e (ii) um His₆-tag de terminal C seguido por um códon de parada são ambas fixadas em uma estrutura na sequência de nucleotídeo que encodifica os anticorpos de cadeia única biespecíficos anteriores à inserção do fragmento de DNA resultante conforme obtido pela síntese genética no sítio de clonagem múltipla do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). A transfecção dos plasmídeos de expressão gerados, da expressão de proteína e da purificação de constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas é realizada conforme descrito nos Exemplos 26.3 e 26.4. todos os outros estados dos procedimentos da técnica são executados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)).

A identificação de constructos de anticorpo de cadeia única biespecífico funcional é realizada por análise de aglutinação de citometria de fluxo do sobrenadante da cultura de células transfectadas que expressam os constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. A análise é realizada conforme o descrito no Exemplo 26.5, exceto que, além disso, as células CHO transfectadas com C-MET conforme descrito nos exemplos 26.1 e 26.2 são usadas.

Apenas aqueles constructos que mostram a aglutinação biespecífica a CD3 humano e símio assim como a C-MET são selecionados para uso adicional.

A atividade citotóxica dos constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados contra células alvo positivas para C-MET produzida pelas células efetoras é analisada conforme descrita no exemplo 26.6, exceto pela adição de células CHO transfectadas com C-MET, conforme descrito nos exemplos 26.1 e 26.2, que são usadas como células alvo e a linhagem de célula 4119LnPx T símia é usada como células efetoras. Apenas aqueles constructos mostrando recrutamento potente de

atividade citotóxica das células efetoras contra células positivas para C-MET são selecionados para uso adicional.

27. Geração e caracterização de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de cMET e CD3 adicionais

5 27.1 Geração de células CHO com expressão aprimorada de cMET humano e células CHO com expressão aprimorada de domínios extracelulares de cMET símio

As sequências de codificação modificadas do cMET humano e cMET símio, conforme descrito acima, foram usadas para a construção de sequências de

10 DNA artificiais que encodificam proteínas de fusão dos domínios extracelulares de cMET humano e cMET símio, respectivamente, com uma variante truncada de EpCAM humano. Para gerar um constructo para a expressão dessas proteínas de fusão de cMET, os fragmentos de cDNA foram obtidos por síntese genética de acordo com protocolos padrão (o cDNA e a sequência de aminoácido dos

15 constructos estão listados sob SEQ ID N^{os} 767 e 777 para cMET humano e SEQ ID N^{os} 788 e 789 para cMET símio). Os fragmentos de síntese genética foram projetados para conter primeiramente um sítio Kozak para a expressão eucariótica do constructo, seguido pela sequência de codificação de um peptídeo líder de imunoglobulina de aminoácido 19, seguido em estrutura pela sequência de

20 codificação da proteína do cMET humano ou cMET símio do aminoácido 1 a 908 da proteína madura correspondente aos domínios extracelulares do cMET humano e cMET símio, respectivamente, seguido em estrutura pela sequência de codificação de um ligante artificial Ser₁-Gli₄-Ser₁-Gli₁, seguido, em estrutura, pela sequência de codificação do domínio de transmembrana e domínio intracelular de

25 EpCAM humano (conforme publicado em GenBank; Número de Acesso NM_002354; aminoácidos 266 a 314 [conforme contado a partir do códon de início] exceto por um ponto de mutação na posição 279 com isoleucina em vez de valina) e um códon de parada. Os fragmentos de síntese genética também foram designados para introduzir os sítios de restrição no início e no fim do fragmento. Os

30 sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3',

foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. Os fragmentos de síntese genética foram clonados através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) seguindo protocolos padrão. Os clones com
 5 sequência de nucleotídeo verificada por sequência foram transfectados em células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica dos constructos. A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene dos constructos foi induzida pelo aumento de
 10 concentrações de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

27.2 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de cMET e CD3

15 Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas

As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, com uma especificidade de aglutinação de espécies cruzadas específica para épsilon de CD3 humano e de primatas que não sejam do gênero Chimpanzee assim como uma especificidade de aglutinação de espécies cruzadas específica para cMET
 20 humano e de primatas que não sejam do gênero Chimpanzee, foram designadas conforme está apresentado na seguinte Tabela 10:

Tabela 10: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas anti-CD3 e anti-cMET

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
1413/1412/	ME86H11HLxI2CHL
1427/1426/	ME62A12HLxI2CHL
1441/1440	ME63F2HLxI2CHL
1455/1454	ME62D11HLxI2CHL

1469/1468	ME62C10HLxI2CHL
1483/1482	ME62A4HLxI2CHL

A geração, expressão e purificação dessas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas foram realizadas conforme descrito acima.

A análise de aglutinação por citometria de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos de espécies cruzadas de cMET e CD3 foi realizada conforme descrito acima. A aglutinação biespecífica das moléculas de cadeia única listadas acima, que são espécies cruzadas específicas para cMET e espécies cruzadas específicas para CD3 humano e de primatas que não seja do gênero Chimpanzee foi claramente detectável conforme mostrado na Figura 54. Na análise FACS todos os constructos mostrados estando aglutinados a CD3 e cMET comparados ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos para antígenos de CD3 e cMET humanos e símios foi demonstrada. A análise de bioatividade por ensaios de citotoxicidade por liberação de cromo 51 (^{51}Cr) *in vitro* é realizada conforme descrito acima. Com base na aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas demonstrada e na citotoxicidade recrutada, as moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas são selecionadas para uso adicional.

27.3 Geração e análise de aglutinação por citometria de fluxo de fragmentos de anticorpo de cadeia única específicos de espécies cruzadas (scFv) aglutinados a cMET

As espécies cruzadas de scFv específicas para cMET foram geradas conforme descrito acima e designadas conforme apresentado na seguinte Tabela 11:

Tabela 11: designação de fragmentos de anticorpo de cadeia única específicos de espécies cruzadas

SEQ ID (nucl/prot)	Designação
1649/1648	ME06F2HL
1635/1634	ME06E10HL
1621/1620	ME06D2HL
1607/1606	ME06D1HL
1579/1578	ME06C7HL
1565/1564	ME06C6HL
1593/1592	ME06B7HL
1551/1550	ME05F6HL
1523/1522	ME05D7HL
1537/1536	ME05B7HL
1509/1508	ME99B1HL
1495/1494	ME75H6HL

A análise de aglutinação de citometria de fluxo de preparações periplásmicas contendo espécies cruzadas de scFv específicas para cMET com o uso de células CHO que expressam cMET humano, conforme descrito no Exemplo 27.1 e células CHO que expressam cMET símio, conforme descrito no Exemplo 27.1 foi realizada conforme descrito acima. A aglutinação dos scFvs listados acima, que são específicos de espécies cruzadas para cMET foi claramente detectável conforme mostrado na Figura 56. Na análise FACS todos os constructos mostraram aglutinação a cMET se comparados ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos de scFv para antígenos de cMET humano e símio foi demonstrada.

A clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas com base nos scFvs e na expressão e purificação dessas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas é realizada conforme descrito acima. A análise de citometria de fluxo da aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas e a análise de bioatividade por ensaios de

citotoxicidade por liberação de crômio 51 (^{51}Cr) *in vitro* são realizadas conforme descrito acima. Com base na aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas demonstrada e na citotoxicidade recrutada, as moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas são selecionadas para uso adicional.

5 Equivalentes humanos/humanizados de espécies cruzadas de scFvs não humanos específicas para cMET contidos nas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas selecionadas são gerados conforme descrito aqui. A clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas baseada nesses scFvs humanos/humanizados e a expressão e
10 purificação dessas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas são realizadas conforme descrito acima. A análise de citometria de fluxo da aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas e a análise de bioatividade por ensaios de citotoxicidade por liberação de crômio 51 (^{51}Cr) *in vitro* é realizada conforme descrito acima. Com base na aglutinação biespecífica
15 específica de espécies cruzadas demonstrada e na citotoxicidade recrutada, as moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas são selecionadas para uso adicional.

28. Geração e caracterização de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de Endosialin e CD3

20 28.1 Geração de células CHO que expressão Endosialin humano

A sequência de codificação da Endosialin humano, conforme publicado no GenBank (Número de Acesso NM_020404) foi obtida por sínteses genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi projetado de forma a conter primeiro um sítio Kozak para a expressão eucariótica
25 do constructo, seguida da sequência de codificação de Endosialin humano, seguido, em estrutura, pela sequência de codificação de um FLAG tag e um códon de parada (o cDNA e a sequência de aminoácido do constructo são listados sob SEQ ID N^{os} 913 e 914). O fragmento de síntese genética também foi projetado para introduzir os sítios de restrição no início e no fim do fragmento. Os sítios de
30 restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e XbaI na terminação 3', foram

utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e XbaI em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo os protocolos padrões. Os procedimentos supramencionados foram realizados de acordo com os protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com sequência de nucleotídeo verificada por sequência foi transfectado para células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica nas células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação genética do constructo foi induzida por concentrações cada vez maiores de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

28.2 Geração de células CHO que expressam Endosialin símio

A sequência de cDNA de Endosialin símio foi obtida por um conjunto de 2 PCRs em cDNA de cólon de macaco símio (cinomolgo) preparado de acordo com os protocolos padrão. As seguintes condições de reação: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos seguidos de um ciclo terminal de 72°C por 5 minutos e os seguintes iniciadores foram usados para o primeiro PCR:

iniciador direto: 5'-atatgaattcgccaccatgctgctgcgcctgttgctggcc-3' SEQ ID N° 917

iniciador reverso: 5'-gtcttcatcttctcatcctcccc-3' SEQ ID N° 918

As seguintes condições de reação: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos seguidos de um ciclo terminal de 72°C por 5 minutos e os seguintes iniciadores foram usados para a segunda PCR:

iniciador direto: 5'-gtcaactacgttggtggcttcgagtg-3' SEQ ID N° 919

iniciador

reverso:

5'-

ggctagatcacttatcgatcatctttgtagtccacgctggttctgcaggctctgc-3' SEQ ID N° 920

As reações de PCR foram realizadas sob a adição de betaina de grau de PCR a uma concentração final de 1M. Aqueles PCRs geraram dois fragmentos sobrepostos, que foram isolados e seqüenciados de acordo com protocolos padrão com o uso de iniciadores de PCR, e, por meio disso, forneceram uma porção da

5 sequência de cDNA que codifica o Endosialin símio do códon 9 do peptídeo líder ao códon 733 da proteína madura. Para gerar um constructo para a expressão de Endosialin símio, um fragmento de cDNA foi obtido pela síntese genética de acordo com protocolos padrão (o cDNA e a sequência de aminoácido do constructo estão listados sob SEQ ID N^{os} 915 e 916). Neste constructo, a sequência de codificação

10 do Endosialin símio a partir do aminoácido 9 do peptídeo líder ao aminoácido 733 da proteína Endosialin madura, seguida em estrutura pela sequência de codificação do aminoácido 734 ao último aminoácido da proteína Endosialin madura humana, seguido em estrutura pela sequência de codificação de um FLAG tag e um códon de parada foram fundidos em estrutura à sequência de codificação

15 dos aminoácidos 1 a 8 do peptídeo líder da proteína Endosialin humana. O fragmento de síntese genética também foi designado para conter um sítio Kozak para a expressão eucariótica do constructo e sítios de restrição no início e no final do fragmento que contém o cDNA. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e XbaI na terminação 3', foram utilizados nos seguintes

20 procedimentos de clonagem. O fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e XbaI em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo protocolos padrão. Os procedimentos supramencionados foram realizados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory

25 Manual, 3^a edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com sequência de nucleotídeo de sequência verificada foi transfectado em células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica nas células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990)

30 Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação genética do constructo foi

induzida pelo aumento das concentrações de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

28.3 aglutinação específica de espécies cruzadas a Endosialin de um fragmento de anticorpo de scFv

5 O cDNA de um fragmento de anticorpo de scFv foi obtido por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de cDNA foi clonado através de sítios de restrição adequados no plasmídeo pComb3H5BFlag/His se diferenciando do pComb3H5BHis original (descrito abaixo) pelo fato de que o

10 constructo de expressão (por exemplo, scFv) inclui um Flag-tag (DYKDDDDK SEQ ID N° 933) entre o fragmento de scFv e o His6-tag e a proteína de fagos adicional é excluída. Após a ligação, um clone de sequência verificada do DNA de plasmídeo foi transformado em 100 µl de *E. coli* TG1 competente por choque térmico ou XLI blue e plaqueado em LB-agar contendo carbenicilina. Colônias únicas foram selecionadas em 100 µl de LB carb (LB com 50 µg/ml de carbenicilina).

15 Após a indução com 1 mM de IPTG, a *E. coli* transformada com pComb3H5BFlag/His contendo a sequência de codificação do anticorpo de cadeia única específico de espécies cruzadas produziu scFv solúvel em quantidades suficientes. Devido a uma sequência de sinalização adequada, a cadeia de scFv é exportada para o periplasma onde ela se transforma em uma conformação

20 funcional.

As colônias bacterianas de *E. coli* únicas das placas de transformação foram selecionadas para preparações periplásmicas de pequena escala e cultivadas no meio SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20 mM de MgCl₂ e carbenicilina 50µg/ml (e re-dissolvido em PBS (por exemplo, 1 ml) após a

25 colheita. Um choque de temperatura foi aplicado por quatro ciclos de congelamento a -70°C e degelo a 37°C através dos quais a membrana externa da bactéria é destruída e as proteínas periplásmicas solúveis, incluindo as moléculas scFv, são liberadas no sobrenadante. Após a eliminação de células intactas e fragmentos celulares por centrifugação, o sobrenadante contendo o fragmento de anticorpo de

30 scFv foi coletado e usado na análise de aglutinação de citometria de fluxo

subsequente com as células CHO transfectadas com Endosialin humano, conforme descrito no Exemplo 28.1 e o Endosialin símio transfectante descrito no Exemplo 28.2.

Com este fim, 200.000 células das respectivas linhagens celulares foram incubadas por 30 minutos em gelo com 50 µl da preparação periplásmica contendo o anticorpo de cadeia única específico de espécies cruzadas. As células foram lavadas duas vezes em PBS com 2% de FCS e a aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo Penta His murina (Qiagen; diluído 1:20 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). Após a lavagem, anticorpos anti His ligados foram detectados com um anticorpo gama-específico Fc (Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS. Células CHO transfectadas foram usadas como um controle negativo.

A citometria de fluxo foi realizada em um aparelho de FACS-Calibur, o software CellQuest foi usado para se adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). Manchamento e medição FACS da intensidade de fluorescência foram executados conforme o descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002).

Conforme mostrado na Figura 46, a aglutinação específica do fragmento de anticorpo de scFv a ambos Endosialin humano e símio poderia ser demonstrada comparada ao controle negativo.

28.4 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de Endosialin e CD3

A sequência VH1 1-03 da linhagem germinativa VH de anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para CDRH1 (SEQ ID 910), CDRH2 (SEQ ID 911) e CDRH3 (SEQ ID 912). Para a VH humana, diversos oligonucleotídeos degenerados têm que ser sintetizados que sobrepõem em um trecho terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Até esta terminação, um a cada dois iniciadores é um iniciador antisense. Para VH1 1-03, o seguinte conjunto de oligonucleotídeos é usado:

5'ED-VH-A-XhoI

CCA GCT CTC GAG TCA GGA SCT GAG STG RWG AAG CCT GGG GCT TCA
GTG AAG RTG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT SEQ ID Nº
921

5 3'ED-VH-B

AAT ATA TCC MAT CCA CTC AAG GCK CTK TCC AKK TSY CTG CYT CAY CCA
GTG TAT AAC ATA GTC AGT GAA TGT GTA TCC AGA SEQ ID Nº 922

5'ED-VH-C

10 CTT GAG TGG ATK GGA TAT ATT AAT CCT TAT GAT GAT GAT ACTA CC TAC
AAC CAG AAG TTC AAG GGC SEQ ID Nº 923

3'ED-VH-D

T GAG CTS CAT GTA GGC TGT GYT GGM GGA TKT GWC TMS AGT MAW TGT
GRC CYG GCC CTT GAA CTT CTG GTT SEQ ID Nº 924

5'ED-VH-E

15 C ACA GCC TAC ATG SAA CTC ARC AGC CTG ASA TCT GAG GAC ACT GCA
GTC TAT TAC TGT GCA AGA AGG GGG SEQ ID Nº 925

3'ED-VH-F-BstEII

20 CCT GAT GGT GAC CAA GGT TCC TTG ACC CCA GTA GTC CAT AGA ATA
GTC GAA GTA ACC ATC ATA GGA GTT CCC CCT TCT TGC ACA GTA SEQ ID
Nº 926

Esse conjunto de iniciadores atravessa toda a sequência de VH correspondente.

No conjunto, os iniciadores estão misturados em quantidades iguais (por exemplo, reação de PCR de 1 µl de cada iniciador (estoques de iniciador 20 a 100 µM) a de 20 µl) e são adicionados a uma mistura de PCR que consiste em tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase. Esta mistura é incubada a 94 °C por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um cicladador de PCR. Subsequentemente, o produto é processado em uma eletroforese de gel de agarose e o produto do tamanho de 200 a 400 é isolado do

gel de acordo com métodos padrão.

O produto de PCR VH é, então, usado como um modelo para uma reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem adequados de Terminal N e Terminal C. O fragmento de DNA do tamanho correto (para uma VH, aproximadamente 350 nucleotídeos) é isolado por eletroforese de gel de agarose de acordo com métodos padrão. Dessa forma, fragmento de DNA de VH o suficiente é amplificado.

A sequência Vkl L8 da linhagem germinativa VL do anticorpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para CDRL1 (SEQ ID 907), CDRL2 (SEQ ID 908) e CDRL3 (SEQ ID 909). Para a VL humana, diversos oligonucleotídeos degenerados têm que ser sintetizados que sobreponham em um treco terminal de cerca de 15 a 20 nucleotídeos. Para esta terminação, a cada dois iniciadores, um é um iniciador antisenso. Os sítios de restrição necessários para a clonagem posterior nos oligonucleotídeos são excluídos. Para Vkl L8, os seguintes oligonucleotídeos são usados:

5'ED-VL-A-SacI

CCA GTC GAG CTC CAG CTG ACC CAG TCT CMA ARM TTC MTG TCC RCA
TCA GTA GGA GAC AGA GTC NNS ATC ACC TGC AGG GCC AG (SEQ ID Nº 927)

3'ED-VL-B

TCC TGG TTT CTG TTG ATA CCA GGC TAC AGC AGT ACC CAC ATT CTG
ACT GGC CCT GCA GGT GAT (SEQ ID Nº 928)

5'ED-VL-C

TAT CAA CAG AAA CCA GGA MAA KCC CCT AAA TTA CTG ATT TACT CG
GCA TCG AAT CGG TAC ACT GGA GTC CCT (SEQ ID Nº 929)

3'ED-VL-D

GCT GAT GGT GAG AGT GAA MTC TGT CCC AGA TCC ACT GCC TGA GAA
GCG AYY AGG GAC TCC AGT GTA CCG (SEQ ID Nº 930)

5'ED-VL-E

TTC ACT CTC ACC ATC AGC ART MTG **CAG** YCT GAA GAC YTS GCA RMT

TAT TWC TGC CAG CAA TAT ACC AAC (SEQ ID N° 931)

3'ED-VL-F-BsiWI/SpeI

CCT GAT ACT AGT CGT ACG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC CTG TCC AAA
CGT ATA CAT GGG ATA GTT GGT ATA TTG CTG GCA (SEQ ID N° 932)

5 Este conjunto de iniciador atravessa toda a sequência de VL correspondente.

No conjunto, os iniciadores estão misturados em quantidades iguais (por exemplo, 1 µl de cada iniciador (estoques de iniciador de 20 a 100 µM) a uma reação PCT de 20 µl) e adicionados a uma mistura de PCR que consiste Mem
10 tampão de PCR, nucleotídeos E Taq polimerase. Esta mistura é incubada a 94 °C por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um ciclador de PCR. Subsequentemente, o produto é processado em uma eletroforese em gel de agarose e o produto de um tamanho entre 200 a 400 é
15 isolado do gel de acordo com métodos padrão.

O produto de PCR VL é, então, usado como modelo para uma reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem adequados de terminal N e terminal C. O fragmento de DNA do tamanho correto (para uma VL aproximadamente 330 nucleotídeos) é isolado por
20 eletroforese de gel de agarose de acordo com métodos padrão. Desta forma, fragmento de DNA de VL o suficiente é amplificado.

O produto de PCR de VH baseado em VH1 1-03 final (isto é, o repertório de VH humano/humanizado) é, então, combinado ao produto de PCR de VL baseado em Vkl L8 final (isto é, o repertório de VL humana/humanizada) no
25 vetor de exibição de fago pComb3H5Bhis para formar uma biblioteca de scFvs funcionais a partir da qual— após a exibição em fago filamentoso — o aglutinador de anti- Endosialin é selecionado, triado, identificado e confirmado conforme descrito a seguir:

450 ng dos fragmentos de cadeia leve (digerido por SacI-SpeI) são
30 ligados com 1400 ng do fagemídeo pComb3H5Bhis (digerido por SacI-SpeI;

fragmento grande). A biblioteca de anticorpo combinatorial resultante é, então, transformada em 300 µl de células de *Escherichia coli* XL1 Blue eletrocompetentes por electroporação (2,5 kV, cubeta com abertura de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm, Biorad gene-pulser) resultando em um tamanho de biblioteca maior que 10⁷ clones independentes. Após uma hora de expressão fenotípica, transformantes positivos são selecionados para a resistência a carbenicilina encodificada pelo vetor pComb3H5BHis em 100 ml de caldo de cultura super líquido (SB) durante a noite. As células são, então, colhidas por centrifugação e a preparação de plasmídeo é realizada com o uso de um kit de preparação de plasmídeo comercialmente disponível (Qiagen).

2800 ng deste DNA de plasmídeo contendo a biblioteca de VL (digerida por XhoI-BstEII; fragmento grande) são ligados a 900 ng dos fragmentos de V de cadeia pesada (digeridos por XhoI-BstEII) e novamente transformados em duas partes alíquotas de 300 µl de células de *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes por eletroporação (2,5 kV, cubeta com abertura de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm) resultando em um tamanho de biblioteca de scFv de VH-VL total (fragmento de cadeia única variável) de mais que 10⁷ clones independentes.

Depois da expressão fenotípica e da lenta adaptação à carbenicilina, as células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo são transferidas para um meio de seleção de SB-carbenicilina (SB com 50 µg/mL de carbenicilina). As células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo são, então, infectadas com uma dose infecciosa de 10¹² partículas de fago auxiliar VCSM13 resultando na produção e secreção de fago M13 filamentoso, em que cada partícula de fago contém DNA de pComb3H5BHis de filamento único que encodifica um fragmento de scFv e exibe a proteína-scFv correspondente como uma fusão translacional para a proteína de revestimento de fago III. Este conjunto de fagos exibindo a biblioteca de anticorpo é usado para a seleção de entidades de aglutinação de antígeno.

Para este fim, a biblioteca de fago que carrega o repertório de scFv clonado é colhida do respectivo sobrenadante de cultura por precipitação de

PEG8000/NaCl e centrifugação. Aproximadamente 10^{11} a 10^{12} partículas de fago de scFv são ressuspensas em 0,4 ml de PBS/0,1% de BSA e incubadas com 10^5 a 10^7 células CHO transfectadas com Endosialin (ver o exemplo 28.1) por 1 hora em gelo sob agitação lenta. Essas células CHO transfectadas com Endosialin são
5 colhidas antecipadamente por centrifugação, lavadas em PBS e ressuspensas em PBS/1 % de FCS (contendo Azida de Na). O fago de scFv que não se aglutina especificamente às células CHO transfectadas com endosialin são eliminadas por até cinco etapas de lavagem com PBS/1 % de FCS (contendo Azida de Na). Após a lavagem, as entidades de aglutinação são eluídas das células ao ressuspender
10 as células em HCl-glicina com pH 2,2 (10 minutos de incubação com vortexação subsequente) e após a neutralização com 2 M Tris pH 12, o eluato é usado para a infecção de uma cultura de *E. coli* XL1 Blue fresca não infectada ($OD_{600} > 0,5$). A cultura de *E. coli* que contém células de *E. coli* transduzidas com sucesso com uma cópia de fagemídeo, encodificando um fragmento de scFv
15 humano/humanizado, é novamente selecionada para resistência à carbenicilina e, subsequentemente, infectada com fago auxiliar VCMS 13 para iniciar o segundo ciclo de exibição de anticorpo e seleção *in vitro*. Um total de 4 a 5 ciclos de seleções são realizados, normalmente.

Para triar por aglutinador específico de Endosialin, DNA de plasmídeo
20 correspondente a 4 e 5 ciclos de panning é isolado de culturas de *E. coli* após a seleção. Para a produção de proteína-scFv solúvel, fragmentos de DNA de VH-VL são excisados dos plasmídeos (XhoI-SpeI). Esses fragmentos são clonados através dos mesmos sítios de restrição para o plasmídeo pComb3H5BFlag/His diferenciando do pComb3H5BHis original no que se refere ao fato de que o
25 constructo de expressão (por exemplo, scFv) inclui uma Flag-tag (DYKDDDDK) entre o scFv e o His6-tag e as proteínas de fago adicionais são excluídas. Após a ligação, cada conjunto de DNA de plasmídeo (ciclos diferentes de panning) é transformado em 100 µl de *E. coli* TG1 ou XLI blue competente por choque térmico e plaqueado em LB-agar contendo carbenicilina. Colônias únicas são selecionadas
30 em 100 µl de LB carb (50 µg/ml).

Após a indução com 1 mM de IPTG *E. coli* transformada com pComb3H5BFlag/His contendo um segmento de VL e VH produz scFv solúvel em quantidades suficientes. Devido a uma sequência de sinalização adequada, a cadeia de scFv é exportada para o periplasma onde se transforma em uma
5 conformação funcional.

Colônias bacterianas únicas de *E. coli* TG1 das placas de transformação são selecionadas para preparações periplásmicas de pequena escala e cultivadas em meio SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20 mM de MgCl₂ e carbenicilina 50 µg/ml (e re-dissolvido em PBS (por exemplo, 1 ml) depois
10 da colheita. Um choque de temperatura é aplicado por quatro ciclos de congelamento a -70°C e degelo a 37°C através dos quais a membrana externa da bactéria é destruída e as proteínas periplásmicas solúveis, incluindo os scFvs, são liberados no sobrenadante. Após a eliminação de células intactas e fragmentos de células por centrifugação, o sobrenadante contendo o scFv anti-Endosialin é
15 coletado e usado para a identificação de aglutinador específico de Endosialin, conforme segue:

A aglutinação de scFvs ao Endosialin é testada por citometria de fluxo em células CHO transfectadas com endosialin (ver o exemplo 28.1); sendo que células CHO não transfectadas são usadas como controle negativo.

20 Para a citometria de fluxo, $2,5 \times 10^5$ células são incubadas com 50 µl de preparação periplásmica de scFv ou com 5 µg/ml de scFv purificado em 50 µl de PBS com 2% de FCS. A aglutinação de scFv é detectada com um anticorpo anti-His (Anticorpo Penta-His, isento de BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) um 2 µg/ml em 50 µl de PBS com 2% de FCS. como um reagente de segunda etapa, um
25 fragmento F(ab')₂ purificado de afinidade conjugado a R-Ficoeritrina, IgG anti-camundongo de cabra (Específico de fragmento de Fc-gama), diluído em 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS (Dianova, Hamburg, FRG) é usado. As amostras são medidas em um FACSScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

Clones únicos são, então, analisados por propriedades favoráveis e
30 sequência de aminoácido. Os scFvs específicos de Endosialin são convertidos em

anticorpos de cadeia única biespecíficos recombinantes ao uni-los através de um ligante Gly4Ser1 com o I2C scFv específico de CD3 (SEQ ID N°: 185) ou qualquer outro scFv específico de CD3 da invenção para resultar em constructos com a disposição de domínio VH Endosialin - (Gli4Ser1)₃ –VL Endosialin - Ser1Gli4Ser1-VHCD3 - (Gli4Ser1)₃ - VLCD3 ou disposições de domínio alternativas. Para a expressão nas células CHO, as sequências de codificação de (i) uma líder de cadeia pesada de imunoglobulina de terminal N que compreende um códon de início embutido em uma sequência de consenso Kozak e (ii) um His6-tag de terminal-C seguido por um códon de parada são ambos fixados na estrutura à sequência de nucleotídeo que encodifica os anticorpos de cadeia única biespecíficos anteriormente à inserção do fragmento de DN resultante conforme obtido pela síntese genética no sítio de clonagem múltipla do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150). Um clone com sequência de nucleotídeo verificada pó sequência é transfectado para células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR é realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação genética do constructo é induzida pelo aumento de concentrações de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

28.5 Expressão e purificação de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas

As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas são expressas em células de ovário de hamster chinês (células CHO ou HEK 293 conforme descrito aqui acima para os anticorpos de cadeia única biespecífico de MCSPxCD3).

O isolamento e a análise dos anticorpos de cadeia única biespecíficos expressos também foi descrito acima no Exemplo 9.

28.6 Análise de aglutinação de citometria de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos de espécies cruzadas de Endosialin e CD3

Para testar a funcionalidade de constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas em relação à capacidade de aglutinar a Endosialin e CD3 humano e símio, respectivamente, uma análise FACS é realizada. Para este fim, as células CHO transfectadas com Endosialin humano, conforme descrito no Exemplo 28.1, e a linhagem de células HPB-ALL de célula de leucemia T positiva para CD3 humana (DSMZ, Braunschweig, ACC483) são usadas para testar a aglutinação a antígenos humanos. A reatividade de ligação a antígenos símios é testada pelo uso de Endosialin símio gerado transfectante descrito no Exemplo 28.2 e uma linhagem de célula T símia 4119LnPx (gentilmente fornecida pelo Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado em Knappe A, et al., e Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256 a 61). 200.000 células das respectivas linhagens de células são incubadas por 30 minutos em gelo com 50 µl de sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressão os constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. As células são lavadas duas vezes em PBS com 2% de FCS e a aglutinação do constructo é detectada com um anticorpo Penta His murino (Qiagen; diluído 1:20 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). Após a lavagem, anticorpos anti His aglutinados são detectados com um anticorpo específico de Fc gama (Dianova) conjugado à ficoeritrina, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS. o sobrenadante de células não transfectadas é usado como um controle negativo.

A citometria de fluxo é realizada em um aparelho de FACS-Calibur, o software CellQuest é usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). O manchamento FACS e a medição da intensidade de fluorescência são realizados conforme é descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach e Strober, Wiley-Interscience, 2002).

Apenas aqueles constructos que mostram aglutinação biespecífica a CD3 humano e símio assim como a Endosialin são selecionados para uso adicional.

28.7 Bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos

específicos de espécies cruzadas de Endosialin e CD3

A bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados é analisada por ensaios de citotoxicidade por liberação de crômio 51 (^{51}Cr) *in vitro* com o uso das células CHO transfectadas com Endosialin humana descrita no Exemplo 28.1 e as células CHO transfectadas com Endosialin símia descrita no Exemplo 28.2. Como células efectoras estimularam CD4/CD56 humano, PBMC depletadas ou a linhagem de células T 4119LnPx símia são usados, respectivamente.

A geração de PBMC humanas estimuladas foi descrita acima no Exemplo 11.

As células alvo foram preparadas e o ensaio foi realizado em analogia ao procedimento descrito para os anticorpos de cadeia única biespecíficos MCSPxCD3 no Exemplo 11.

Apenas aqueles constructos que mostram o recrutamento potente de atividade citotóxica de células de efector contra células positivas para Endosialin são selecionados para uso adicional.

29. Geração e caracterização de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de CD248 (Endosialin) e CD3

29.1 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de CD248 e CD3

Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas

As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, com uma especificidade de aglutinação de espécies cruzadas específica para Épsilon de CD3 humano e de primatas que não sejam do gênero Chimpanzee assim como uma especificidade de aglutinação de espécies cruzadas específica para CD248 humano e primatas que não sejam do gênero Chimpanzee, foram projetadas conforme apresentado na seguinte Tabela 13:

Tabela 13: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas anti-CD3 e anti-CD248

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
1665/1664	EN00B12HLxI2CHL
1679/1678	EN00C3HLxI2CHL
1693/1692	EN01D5HLxI2CHL
1707/1706	EN00E4HLxI2CHL
1721/1720	EN00F7HLxI2CHL
1735/1734	EN00H6HLxI2CHL

A geração, expressão e purificação dessas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas foram realizadas conforme descrito acima.

- 5 A análise de aglutinação de citometria de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos de espécies cruzadas CD248 e CD3 foi realizada conforme descrito acima. A aglutinação biespecífica das moléculas de cadeia única listadas acima, que são espécies cruzadas específicas para CD248 e espécies cruzadas específicas para CD3 humano e de primatas que não sejam do gênero
- 10 Chimpanzee foi claramente detectável conforme mostrado na Figura 58. Na análise FACS, todos os constructos são mostrados aglutinando a CD3 e CD248 se comparado ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos aos antígenos CD3 e CD248 humanos e símios foi demonstrada.
- 15 A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados foi analisada por ensaios de citotoxicidade por liberação de crômio 51 (^{51}Cr) *in vitro* conforme descrito acima. Conforme mostrado na Figura 59, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados demonstraram atividade citotóxica contra células alvo positivas para
- 20 CD248 humano elicitadas por PBMC depletadas de CD4/CD56 humano estimulado e células alvo positivas para CD248 símio elicitadas pela linhagem de células T

4119LnPx símia.

30. Geração e caracterização de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de EpCAM e CD3

30.1 Clonagem e expressão de antígeno EpCAM humano em células

5 CHO

A sequência do antígeno EpCAM humano ('NM_002354, transdutor 1 de sinal de cálcio associado a tumor de Homo sapiens (TACSTD1), mRNA, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) foi usada para se obter uma molécula sintética por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética também foi designado a conter um sítio Kozak para a expressão eucariótica do constructo e sítios de restrição no início e no final do DNA. Os sítios de restrição introduzidos XbaI na terminação 5' e SalI na terminação 3' foram utilizados durante a etapa de clonagem no plasmídeo de expressão designado pEFDHFR conforme descrito em Raum et al. (loc cit.).

15 Após a verificação de sequência, o plasmídeo foi usado para transfectar células CHO/dhfr conforme segue. Um plasmídeo de sequência verificada foi usado para transfectar células CHO/dhfr (ATCC Nº. CRL 9096; cultivadas em RPMI 1640 com glutamina estabilizada obtida a partir de Biochrom AG Berlin, Alemanha, suplementado com 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina, todos obtidos

20 junto à Biochrom AG Berlin, Alemanha e os nucleosídeos de uma solução de estoque de reagentes de grau de cultura celular obtidos junto à Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha, para uma concentração final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Deoxiadenosina e 10 µg/ml de Timidina, em uma incubadora a 37°C, 95% de umidade e 7% de CO₂). A transfecção foi realizada

25 com o uso do Reagente de Transfecção PolyFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e 5 µg de DNA de plasmídeo, de acordo com o protocolo do fabricante. Após cultivar por 24 horas, as células foram lavadas uma vez com PBS e, novamente, cultivadas no meio de cultura celular supramencionado, exceto pelo fato de que o meio não estava suplementado com nucleotídeos e FCS dialisado

30 (obtido junto à Biochrom AG Berlin, Alemanha) foi usado. Portanto, o meio de

cultura celular não continha nucleosídeos e, então, a seleção foi aplicada nas células transfectadas. Aproximadamente 14 dias após a transfecção, o crescimento das células resistentes foi observado. Após 7 a 14 dias adicionais, os transfectantes foram testados com resultado positivo para a expressão de EpCAM por FACS. A expressão da proteína eucariótica nas células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida ao aumentar as concentrações de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

30.2 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de EpCAM e CD3

Em geral, as moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, cada uma compreendendo um domínio com uma especificidade de aglutinação para o antígeno CD3 humano e símio assim como um domínio com uma especificidade de aglutinação para o antígeno EPCAM humano, foram designadas conforme apresentado na seguinte Tabela 14:

Tabela 14: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas anti-CD3 e anti-EpCAM

<u>SEQ ID</u> <u>(nucl/prot)</u>	<u>Formatos de constructos de proteína</u> <u>(N → C)</u>
945/944	Ep 5-10 LH x I2C HL
949/948	Ep 5-10 LH x F12Q HL
947/946	Ep 5-10 LH x H2C HL
961/960	hEp 14-A1 LH x I2C HL
973/972	hEp 14-D2 LH x I2C HL
985/984	hEp 14-H8 LH x I2C HL
997/996	hEp 14-A6 LH x I2C HL
1009/1008	hEp 14-D1 LH x I2C HL
1033/1032	hEp 14-H4 LH x I2C HL
1045/1044	hEp 17-A6 LH x I2C HL

1057/1056	hEp 17-E9 LH x I2C HL
1079/1078	hEp 18-E3 LH x I2C HL
1091/1090	hEp 18-F11 LH x I2C HL
1103/1102	hEp 18-F12 LH x I2C HL
1115/1114	hEp 18-G1 LH x I2C HL
1127/1126	hEp 18-G9 LH x I2C HL
1021/1020	hEp 14-G6 LH x I2C HL
1777/1776	hEp 18-A6 LH x I2C HL

Os constructos supramencionados que contêm os domínios de cadeia leve variável (L) e de cadeia pesada variável (H) específicos para EpCAM humano e as espécies cruzadas de combinações de VH e VL específicas de CD3 específicas para CD3 humano e símio foram obtidos por síntese genética. Os
5 fragmentos de síntese genética foram designados e a expressão de proteína eucariótica foi realizada em analogia ao procedimento descrito no exemplo 9 para as moléculas de cadeia única específicas de espécies cruzadas MCSPxCD3.

30.3 Expressão e purificação das moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas de domínio único

10 As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas de domínio único foram expressas em células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células HEK 293, conforme descrito aqui acima para os anticorpos de cadeia única biespecíficos de MCSPxCD3.

15 O isolamento e a análise dos anticorpos de cadeia única biespecíficos expressos também foi descrito aqui acima no Exemplo 9.

30.4 Análise de aglutinação de citometria de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos das espécies cruzadas de EpCAM e CD3

20 Para testar a funcionalidade dos constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas em relação à capacidade de aglutinação a EpCAM humano e CD3 humano/símio, uma análise FACS foi realizada. Para este fim, as células CHO transfectadas com EpCAM humano, conforme descrito no Exemplo 30.1, e a linhagem de células de leucemia HPB-ALL

de célula T positiva para CD3 humano (DSMZ, Braunschweig, ACC483) foram usadas para verificar a aglutinação aos antígenos humanos. A reatividade de aglutinação ao CD3 símio foi testada pelo uso de uma linhagem de células T símia 4119LnPx (gentilmente fornecida pelo Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; Knappe A, et al., e Fickenscher H: Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion. Blood 2000;95:3256 a 61.) 200.000 células da respectiva população celular foram incubadas por 30 minutos em gelo com 50 µl da proteína purificada dos constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas (por exemplo, 2 µg/ml) alternativamente, o sobrenadante da cultura celular de proteínas produzidas transientemente foi usado. As células foram lavadas duas vezes em PBS e a aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo Penta His murino não marcado (Qiagen; diluído 1:20 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). após a lavagem, os anticorpos anti His ligados foram detectados com um anticorpo gama específico Fc (Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluído 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS. meio de cultura fresco foi usado como um controle negativo.

A citometria de fluxo foi realizada em um aparelho FACS-Calibur, o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). Manchamento FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram realizados conforme descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A habilidade de aglutinação de todas as moléculas de cadeia única biespecíficas direcionadas a EpCAM foi claramente detectável, conforme mostrados na Figura 60. Na análise FACS, todos os constructos mostraram aglutinação a CD3 humano e símio e a EpCAM humano, se comparado ao controle negativo com o uso do meio de cultura e os anticorpos de detecção 1 e 2. Resumindo, a especificidade das espécies cruzadas do anticorpo biespecífico a CD3 humano e símio e EpCAM humano poderia claramente ser demonstrada.

30.5 Bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas de EpCAM e CD3

A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados foi analisada ensaio de citotoxicidade por liberação de crômio 51 *in vitro* com o uso da linhagem de células EpCAM positiva descrita no Exemplo 30.1. Já que as células efetoras estimularam CD8 humano, as células T positivas ou a linhagem de células T símia 4119LnPx foram usadas.

Células T de CD8+ estimuladas foram obtidas conforme segue:

A geração de PBMC humanas estimuladas foi descrita acima no Exemplo 11.

As células alvo foram preparadas e o ensaio foi realizado em analogia ao procedimento descrito para os anticorpos de cadeia única biespecíficos MCSPxCD3 no Exemplo 11.

Conforme mostrado nas Figuras 61 a 66, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecífico específico de espécies cruzadas indicados revelaram uma atividade citotóxica contra as células alvo positivas de EpCAM humano elicitadas por células de CD8+ humano e contra células alvo positivas de EpCAM humano elicitadas pela linhagem de células T símia 4119LnPx. Como controle negativo, um anticorpo de cadeia única biespecífico irrelevante foi usado.

30.6 Clonagem e expressão de antígeno EpCAM murino e um antígeno híbrido EpCAM humano-murino em células CHO

A sequência de antígeno EpCAM de camundongo ('NM 008532, transductor 1 de sinal de cálcio associado a tumor Mus musculus (Tacstd1), mRNA., National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) foi usada para obter uma molécula sintética por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética também foi designado para conter um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo e dos sítios de restrição no início e no final do DNA. Os sítios de restrição introduzidos XbaI na terminação 5' e Sall na terminação 3' foram utilizados durante a etapa de clonagem no plasmídeo de expressão designado

pEFDHFR. Depois da verificação de sequência, o plasmídeo foi usado para transfectar as células CHO/DHFR⁻ conforme descrito no Exemplo 30.1. O antígeno híbrido EpCAM humano-murino foi gerado pela troca do Exon 2 murino (aminoácidos nº 26 a 61) pelos aminoácidos do Exon 2 humano para permitir a

5 identificação dos epítomos reconhecidos pelos constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. A sequência deduzida foi usada para obter uma molécula sintética por síntese genética e as células CHO foram transfectadas conforme descrito acima.

30.7 Análise de aglutinação de citometria de fluxo dos anticorpos

10 biespecíficos específicos de espécies cruzadas de EpCAM e CD3 a antígenos EpCAM diferentes

Para analisar a habilidade de aglutinação dos constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas em relação às habilidades de aglutinação a epítomos diferentes em EpCAM humano ou murino ou

15 híbrido humano-murino, uma citometria de fluxo FACS foi realizada. Para este fim, as células CHO transfectadas com EpCAM humano, conforme descrito no Exemplo 1, as células CHO transfectadas com EpCAM murino (exemplo 30.6) e as células CHO transfectadas com EpCAM híbrido humano-murino (exemplo 30.6) foram usadas para verificar os diferentes padrões de aglutinação. As 200.000 células da

20 respectiva população celular foram incubadas por 30 minutos em gelo com 50 µl do sobrenadante de cultura celular de proteínas produzidas transientemente. As células foram lavadas duas vezes em PBS e a aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo Penta His murino não marcado (Qiagen; diluído 1:20 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). após a lavagem, anticorpos anti His ligados

25 foram detectados com um anticorpo gama-específico Fc (Dianova) conjugado a ficoeritrina, diluído 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS. meio de cultura fresco foi usado em vez de sobrenadante de cultura celular de células CHO transfectadas com as respectivas moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas como um controle negativo. Como controle positivo para a expressão do EpCAM murino, a

30 detecção com um anticorpo não marcado derivado de rato específico para EpCAM

murino (BD Pharmingen, #552370, Rat IgG2a,k) seguido de IgG2a anti rato marcado com PE, anticorpo específico de κ (BD Pharmingen, Heidelberg, #553930) foi usada.

A citometria de fluxo foi realizada em um aparelho de FACS-Calibur, sendo que o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). Manchamento FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram executados conforme descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002). Para fins de comparação, os valores medianos da intensidade de fluorescência foram usados para gerar um gráfico de barras.

A habilidade de aglutinação de todas as moléculas de cadeia única biespecíficas direcionadas a EpCAM a células CHO transfectadas com EpCAM humano foi claramente detectável, conforme mostrado na Figura 67. Nenhuma das moléculas específicas de EpCAM humano obteve um valor médio significativamente acima do controle negativo quando a aglutinação a EpCAM murino foi analisada. As propriedades de aglutinação das moléculas de anticorpo biespecífico de cadeia única específicas de EpCAM humano a antígeno híbrido de EpCAM humano-murino revelaram dois subconjuntos de moléculas: aquelas sem uma aglutinação detectável ao antígeno híbrido EpCAM humano-murino (HD69 HL x I2C HL) e aqueles com uma intensidade de fluorescência mediana aproximadamente ao nível da força de aglutinação ao antígeno EpCAM humano (hEp 14-A1 LH x I2C HL; hEp 14-H8 LH x I2C HL; hEp 14-A6 LH x I2C HL; hEp 14-D1 LH x I2C HL; hEp 14-H4 LH x I2C HL; hEp 17-A6 LH x I2C HL; hEp 17-E9 LH x I2C HL; hEp 18-E3 LH x I2C HL; hEp 18-F11 LH x I2C HL; hEp 18-F12 LH x I2C HL; hEp 18-G1 LH x I2C HL; hEp 18-G9 LH x I2C HL; para as SEQ ID N^{os} dos constructos, consultar a Tabela 14). Os padrões de aglutinação divergentes desses dois subconjuntos de moléculas de anticorpo biespecífico de cadeia única específico de EpCAM humano demonstram epítomos diferentes no antígeno EpCAM humano. O transplante do domínio exon 2 de EpCAM humano para a cadeia principal do EpCAM murino levou ao ganho de aglutinação pelas moléculas

de cadeia única biespecíficas direcionadas a EpCAM dessa invenção, mas não pela molécula HD69 HL x I2C HL.

Portanto, o segundo domínio de aglutinação do anticorpo de cadeia única biespecífico EpCAM-CD3 da invenção aglutina a um epítopo localizado nos
5 resíduos de aminoácido de 26 a 61 do domínio similar a EGF 1 de EpCAM, que está encodificado por Exon 2 do gene de EpCAM. Os ditos resíduos de aminoácido 26 a 61 do domínio 1 similar a EGF do EpCAM humano encodificado por exon 2 do gene de EpCAM são mostrados na SEQ ID Nº. 1130.

Em conformidade, o epítopo das moléculas de cadeia única
10 biespecíficas direcionadas a EpCAM desta invenção é mapeado para a região Exon 2 de EpCAM humano, enquanto outras regiões de EpCAM participam na formação do epítopo da molécula HD69 HL x I2C HL. Portanto, as moléculas de cadeia única biespecíficas direcionadas a EpCAM desta invenção formam uma classe própria única de moléculas de aglutinação a EpCAM, que é claramente
15 diferenciada das moléculas de aglutinação a EpCAM anteriores, com base no aglutinador de EpCAM HD69.

31. Geração e caracterização de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas alfa de FAP e CD3

31.1 Geração de células CHO que expressam alfa de FAP humana

20 A sequência de codificação de alfa de FAP humana publicada em GenBank (Número de Acesso NM_004460) foi obtida por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi designado para conter primeiro um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo, seguido pela sequência de codificação da proteína de alfa de FAP humana e um
25 códon de parada (o cDNA e a sequência de aminoácido dos constructos são listados sob SEQ ID Nºs 1149 e 1150). O fragmento de síntese genética também foi designado para introduzir sítios de restrição no início e no final do fragmento. Os sítios de restrição introduzidos, XmaI na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento de
30 síntese genética foi clonado através de XmaI e Sall em um plasmídeo designado

pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo protocolos padrão. Os procedimentos supramencionados foram realizados de acordo com os protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com sequência de nucleotídeo verificada por sequência foi transfectado em células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida por concentrações cada vez maiores de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

31.2 Geração de células CHO que expressam o alfa de FAP símia

A sequência de cDNA de alfa de FAP símia (Cinomoilgo) foi obtida por um conjunto de quatro PCRs em cDNA de pele de macaco símio preparados de acordo com os protocolos padrão. As seguintes condições de reação: 1 ciclo a 94°C por 3 minutos seguido de 40 ciclos a 94°C por 0,5 minutos, 56°C por 0,5 minutos e 72°C por 3 minutos seguidos por um ciclo terminal de 72°C por 3 minutos e os seguintes iniciadores foram usados:

- iniciador direto: 5'-cagctccaactacaaagacagac-3' (SEQ ID Nº. 1153)
- iniciador reverso: 5'-ttcctcttcataaaccagctctgg-3' (SEQ ID Nº. 1154)
- iniciador direto: 5'-ttgaaacaaagaccaggagatccacc-3' (SEQ ID Nº. 1155)
- iniciador reverso: 5'-agatggcaagtaacacacttctgc-3' (SEQ ID Nº. 1156)
- iniciador direto: 5'-gaagaaacatctacagaattagcattgg-3' (SEQ ID Nº. 1157)
- iniciador reverso: 5'-cacatttgaaaagaccagttccagatgc-3' (SEQ ID Nº. 1158)
- iniciador direto: 5'-agattacagctgtcagaaaattcatagaaatgg-3' (SEQ ID Nº. 1159)
- iniciador reverso: 5'-atataagggtttcagattctgatacaggc-3' (SEQ ID Nº. 1160)

Estes PCRs geraram quatro fragmentos sobrepostos, que foram isolados e sequenciados de acordo com protocolos padrão com o uso dos iniciadores de PCR, e, através disso, forneceram a sequência de cDNA que codifica a alfa de FAP símia. Para gerar um constructo para a expressão de alfa de FAP símia, um fragmento de cDNA foi obtido por síntese de gene de acordo com protocolos padrão (o cDNA e a sequência de aminoácido do constructo estão listados sob SEQ ID N^{os} 1151 e 1152). Este constructo contém a sequência completa de codificação de alfa de FAP símia seguida de um códon de parada. O fragmento de síntese genética também foi designado para conter um sítio de Kozak para a expressão eucariótica do constructo e sítios de restrição no início e no fim do fragmento que contém o cDNA. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. O fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141 a 150) seguindo protocolos padrão. Os procedimentos mencionados anteriormente foram realizados de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3^a edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com sequência de nucleotídeo verificada por sequência foi transfectado em células CHO deficientes de DHFR para a expressão eucariótica do constructo. A expressão de proteína eucariótica em células CHO deficientes de DHFR foi realizada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537 a 566. A amplificação de gene do constructo foi induzida por concentrações cada vez maiores de metotrexato (MTX) a uma concentração final de até 20 nM de MTX.

31.3 Geração de moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas alfa de FAP e CD3

Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas

Em geral, as moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas,

cada uma compreendendo um domínio com uma especificidade de aglutinação de específica de espécies cruzadas de épsilon de CD3 humano e de primatas que não sejam do gênero Chimpanzee assim com um domínio com uma especificidade de aglutinação específica para espécies cruzadas de alfa de FAP humana e de primatas que não sejam do gênero Chimpanzee, foram designadas conforme esta apresentado na seguinte Tabela 15:

Tabela 15: Formatos de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas anti-CD3 e anti-alfa de FAP

SEQ ID Nº. (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
1144/1143	FAPA-1 LH x I2C HL
1148/1147	FAPA-1 LH x F12Q HL
1146/1145	FAPA-1 LH x H2C HL

Os constructos mencionados anteriormente que contêm os domínios de cadeia leve variável (L) e a cadeia pesada variável (H) específicos para espécies cruzadas para alfa de FAP humana e símia e as combinações específicas VH e VL específicas de espécies cruzadas para CD3 humano e símio foram obtidos por síntese genética. Os fragmentos de síntese genética foram designados e a expressão de proteína eucariótica foi realizada em analogia ao procedimento descrito no Exemplo 9 para as moléculas de cadeia única específicas de espécies cruzadas MCSPxCD3.

31.4 Expressão e purificação de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas

As moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas foram expressas em células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células HEK 293 conforme descrito acima para os anticorpos de cadeia única biespecíficos MCSPxCD3.

O isolamento e a análise dos anticorpos de cadeia única biespecíficos expressos também foram descritos acima no Exemplo 9.

31.5 Análise de aglutinação de citometria de fluxo dos anticorpos biespecíficos específicos de espécies cruzadas de alfa de FAP e CD3

Para testar a funcionalidade dos constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas em relação à capacidade de aglutinação a alfa de FAP e CD3 humanos e símios, respectivamente, uma análise FACS foi realizada. Para este fim, células CHO transfectadas com alfa de FAP humana, conforme descrito no Exemplo 31.1., e a linhagem de células de leucemia T positiva para CD3 humano (DSMZ, Braunschweig, ACC483) foram usadas para testar a aglutinação aos antígenos humanos. A reatividade de aglutinação a antígenos símios foi testada com o uso de transfectante de alfa de FAP símia gerada descrita no Exemplo 31.2 e uma linhagem de células T símia 4119LnPx (gentilmente fornecida pelo Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado em Knappe A, et al., and Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256 a 61). 200.000 células das respectivas linhagens de célula foram incubadas por 30 minutos em gelo com 50 µl de sobrenadante de cultura celular de células transfectadas que expressam os constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. As células foram lavadas duas vezes em PBS com 2% de FCS e a aglutinação do constructo foi detectada com um anticorpo Penta His murino (Qiagen; diluído 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS). após a lavagem, anticorpos anti His ligados foram detectados com um anticorpo específico de Fc gama (Dianova) conjugado à ficoeritrina, diluído 1:100 em PBS com 2% de FCS. O sobrenadante de células não transfectadas foi usado como um controle negativo.

A citometria de fluxo foi realizada em um aparelho FACS-Calibur, o software CellQuest foi usado para adquirir e analisar os dados (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). Manchamento por FACS e a medição da intensidade de fluorescência foram realizados conforme descrito em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002).

A aglutinação biespecífica das moléculas de cadeia única listadas acima, que são específicas de espécies cruzadas para alfa de FAP e espécies

cruzadas específicas para CD3 humano e de primatas que não sejam do gênero Chimpanzee foi claramente detectável, conforme mostrado na Figura 68. Na análise FACS, todos os constructos mostraram aglutinação ao CD3 e à alfa de FAP se comparado ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos biespecíficos aos antígenos CD3 e alfa de FAP humanos e símios foi demonstrada.

31.6 Bioatividade de anticorpos de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas de CD3 e Alfa de FAP

A bioatividade dos anticorpos de cadeia única biespecíficos gerados foi analisada por ensaios de citotoxicidade por liberação de crômio 51 (^{51}Cr) *in vitro* com o uso de células CHO transfectadas com alfa de FAP humana descrita no Exemplo 31.1 e as células CHO transfectadas com alfa de FAP símia descrita no Exemplo 31.2. já que as células efetoras estimularam CD4/CD56 humano, PBMC depletadas ou a linhagem de células T símia 4119LnPx foram usadas, respectivamente.

A geração de PBMC humanas estimuladas foi descrita acima no Exemplo 11.

as células alvo foram preparadas e o ensaio foi realizado em analogia ao procedimento descrito para os anticorpos de cadeia única biespecíficos MCSPxCD3 no Exemplo 11.

Conforme mostrado na Figura 69, todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados demonstraram atividade citotóxica contra células alvo positivas para alfa de FAP humana obtidas por PBMC depletadas de CD4/CD56 humano e células alvo positivas para alfa de FAP símia obtidas pela linhagem de células T símia 4119LnPx.

31.7 Geração de moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas de alfa de FAP e CD3 adicionais

A sequência VH1 1-03 da linhagem germinativa VH humana (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para

CDRH1 (SEQ ID Nº. 1137), CDRH2 (SEQ ID Nº. 1138) e CDRH3 (SEQ ID Nº. 1139). Para o VH humano vários oligonucleotídeos degenerados têm que ser sintetizados que se sobrepõem em um trecho terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Para este fim, um a cada dois iniciadores é um iniciador antisenso.

5 Para VH1 1-03, os seguintes oligonucleotídeos são usados:

5'FAP-VH-A-XhoI

CCG CTA CTC GAG TCT GGA SCT GAG STG RWG AAG CCT GGG GCT TCA
GTA AAG (SEQ ID Nº. 1161)

3'FAP-VH-B

10 CTG TCT CAC CCA GTG TAT GGT GTA TTC AGT GAA TGT GTA TCY AGA
AGY CTT GCA GGA CAY CTT TAC TGA AGC CCC (SEQ ID Nº. 1162)

5'FAP-VH-C

CAC TGG GTG AGA CAG KCC CMT GGA MAG AGM CTT GAG TGG ATK GGA
GGT ATT AAT CCT AAC AAT GGT ATT CCT AAC TAC (SEQ ID Nº. 1163)

15 3'FAP-VH-D

CAT GTA GGC GGT GCT GGM GGA CKT GYC TMY AGT TAW TGT GRC CCT
GCC CTT GAA CTT CTG ATT GTA GTT AGG AAT ACC (SEQ ID Nº. 1164)

5'FAP-VH-E

AGC ACC GCC TAC ATG GAG CTC MGC AGC CTG ASA TCT GAG GAT ACT
20 GCG GTC TAT TWC TGT GCA AGA AGA AGA ATC GCC (SEQ ID Nº. 1165)

3'FAP-VH-F-BstEII

CCA GTA GGT GAC CAG GGT TCC TTG ACC CCA GTA GTC CAT AGC ATG
GCC CTC GTC GTA ACC ATA GGC GAT TCT TCT TCT TGC ACA (SEQ ID Nº.
1166)

25 Este conjunto de iniciadores atravessa toda a sequência VH
correspondente.

Neste conjunto, iniciadores estão misturados em quantidade iguais
(por exemplo, reação de PCR de 1 µl de cada iniciador (estoques de iniciador de
20 a 100 µM) a 20 µl) e são adicionados a uma mistura de PCR que consiste em

30 tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase. Esta mistura é incubada a 94 °C

por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um ciclador de PCR. Subsequentemente, o produto é processado em uma eletroforese de gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 é isolado do gel, de acordo com os métodos padrão.

O produto de PCR de VH é, então, usado como um modelo para uma reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem de terminal N e terminal C adequados. O fragmento de DNA do tamanho correto (para um VH de aproximadamente 350 nucleotídeos) é isolado por eletroforese de gel de agarose de acordo com métodos padrão. Desta forma, o fragmento de DNA de VH o suficiente é amplificado.

A sequência VkII O11 da linhagem germinativa de anticorpo humano VL (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) é escolhida como contexto de estrutura para CDRL1 (SEQ ID Nº. 1132), CDRL2 (SEQ ID Nº. 1133) e CDRL3 (SEQ ID Nº. 1134). Para este VL humano, diversos oligonucleotídeos degenerados têm que ser sintetizados que se sobrepõem em um trecho terminal de aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. Para este fim, um a cada dois iniciadores é um iniciador antisenso. Sítios de restrição necessários para a clonagem posterior com os oligonucleotídeos são excluídos. Para VkII O11, os seguintes oligonucleotídeos são usados:

5'FAP-VL-A-SacI

CGA CCT GAG CTC GTG ATG ACA CAG ACT CCA YYC TCC CTA SCT GTG
ACA SYT GGA GAG MMG GYT TCT ATS AGC TGC AAG TCC AGT CAG (SEQ
ID Nº. 1167)

3'FAP-VL-B

AGA CTG CCC TGG CTT CTG CWG GWA CCA GGC CAA GTA GTT CTT TTG
ATT ACG ACT ATA TAA AAG GCT CTG ACT GGA CTT GCA GCT (SEQ ID Nº.
1168)

5'FAP-VL-C

CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCT MAA CTG CTG ATT TWC TGG GCA TCC

ACTA GG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC TCA GGC AGT GGA (SEQ ID N°. 1169)

3'FAP-VL-D

ATA TTG CTG ACA GTM ATA AAC TSC CAS GTC CTC AGC CTS CAC WCT
5 GCT GAT CKT GAG AKT GAA ATC CGT CCC ARA TCC ACT GCC TGA GAA
(SEQ ID N°. 1170)

3'FAP-VL-E-BsiWI/Spel

CCA GTA ACT AGT CGT ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC ACC ACC
GAA CGT GAG CGG ATA GCT AAA ATA TTG CTG ACA GT (SEQ ID N°. 1171)

10

Este conjunto de iniciadores atravessa toda a sequência VL correspondente.

No conjunto, iniciadores estão misturados em quantidade iguais (por exemplo, reação de PCR de 1 µl de cada iniciador (estoques de iniciadores 20 a
15 100 µM) a 20 µl) e adicionados a uma mistura de PCR que consiste em um tampão de PCR, nucleotídeos e Taq polimerase. Esta mistura é incubada a 94 °C por 3 minutos, 65 °C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e a 72°C por 10 minutos em um ciclador de PCR. Subsequentemente, o produto é processado em uma eletroforese
20 de gel de agarose e o produto de um tamanho de 200 a 400 é isolado do gel, de acordo com métodos padrão.

O produto de PCR VL é, então, usado como um modelo para uma reação de PCR padrão com o uso de iniciadores que incorporam sítios de restrição de clonagem de terminal N e terminal C adequados. O fragmento de DNA do
25 tamanho correto (para um VL, aproximadamente 330 nucleotídeos) é isolado por eletroforese de gel de agarose de acordo com métodos padrão. Dessa forma, fragmento de DNA de VL o suficiente é amplificado.

O produto de PCR de VH baseado em VH1 1-03 final (isto é, o repertório de VH humano/humanizado) é, então, combinado ao produto de PCR de
30 VL baseado em Vkl1 O11 final (isto é, o repertório de VL humano/humanizado) no

vetor de exibição de fago pComb3H5Bhis para formar uma biblioteca de scFvs funcionais a partir da qual – após a exibição em fago filamentosos – aglutinadores anti-alfa de FAP são selecionados, triados, identificados e confirmados, conforme descrito a seguir:

5 450 ng dos fragmentos de cadeia leve (digeridos por SacI-SpeI) são ligados a 1400 ng do fagemídeo pComb3H5Bhis (digerido por SacI-SpeI; fragmento grande). A biblioteca de anticorpos combinatória resultante é, então, transformada em 300 µl de células de *Escherichia coli* XL1 Blue eletrocompetentes por eletroporação (2,5 kV, cubeta com abertura de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm, Biorad
10 gene-pulser) resultando em um tamanho de biblioteca maior que 10^7 clones independentes. Após uma hora de expressão fenotípica, transformantes positivos são selecionados por resistência à carbenicilina encodificada pelo vetor pComb3H5Bhis em 100 ml de caldo de cultura super líquido (SB) durante a noite. As células são, então, colhidas por centrifugação e a preparação de plasmídeo é
15 realizada com o uso de um kit de preparação de plasmídeo comercialmente disponível (Qiagen).

2800 ng deste DNA de plasmídeo que contém a biblioteca de VL (digerido por XhoI-BstEII; fragmento grande) são ligados com 900 ng dos fragmentos de V de cadeia pesada (digeridos por XhoI-BstEII) e novamente
20 transformados em duas partes alíquotas de 300 µl de células de *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes por eletroporação (2,5 kV, cubeta com abertura de 0,2 cm, 25 µFD, 200 Ohm) resultando em um tamanho de biblioteca de scFv de VH-VL total (fragmento de cadeia única variante) de mais que 10^7 clones independentes.

Após a expressão fenotípica e a lenta adaptação à carbenicilina, as
25 células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpo são transferidas em meio de seleção de SB-carbenicilina (SB com 50 µg/mL de carbenicilina). As células de *E. coli* que contêm a biblioteca de anticorpos são, então, infectadas com uma dose infecciosa de 10^{12} partículas de fago auxiliar VCSM13 resultando na produção e secreção de fago filamentosos M13, em que cada partícula de fago contém DNA de
30 pComb3H5Bhis de filamento único encodificando um fragmento scFv e exibe a

proteína-scFv correspondente como uma fusão translacional para a proteína de revestimento de fago III. Este grupo de fagos exibindo a biblioteca de anticorpos é usado para a seleção de entidades de aglutinação de antígeno.

Para este fim, a biblioteca de fago que tem o repertório de scFv clonado é colhida do respectivo sobrenadante de cultura por precipitação e centrifugação de PEG8000/NaCl. Aproximadamente 10^{11} a 10^{12} partículas de fago de scFv são ressuspensas em 0,4 ml de PBS/0,1% de BSA e incubadas com 10^5 a 10^7 células CHO transfectadas com alfa de FAP (ver o exemplo 31.1) por 1 hora em gelo sob agitação lenta. Estas células CHO transfectadas com alfa de FAP são colhidas anteriormente por centrifugação, lavadas em PBS e ressuspensas em PBS/1% de FCS (contendo 0,05% de Azida de Na). O fago de scFv que não se aglutina especificamente às células CHO transfectadas com alfa de FAP é eliminado por ate cinco etapas de lavagem com PBS/1% de FCS (contendo 0,05% de Azida de Na). Após a lavagem, as entidades de aglutinação são eluídas das células ao ressuspender as células em HCl-glicina pH 2,2 (10 minutos de incubação com vortexação subsequente) e após a neutralização com 2 M Tris pH 12, o eluato é usado para a infecção de uma cultura de *E. coli* XL1 Blue fresca não infectada ($OD_{600} > 0,5$). A cultura de *E. coli* que contem células de *E. coli* que foram transduzidas com sucesso com uma cópia de fagemídeo, encodificando um fragmento humano/humanizado de scFv, são novamente selecionadas por resistência à carbenicilina e são, subsequentemente, infectadas com fago auxiliar VCMS 13 para começar o segundo ciclo de exibição de anticorpo e seleção *in vitro*. Tipicamente, um total de 4 a 5 ciclos de seleção são realizados.

Para triar por DNA de plasmídeo, o aglutinador específico de alfa de FAP correspondente a 4 e 5 ciclos de panning é isolado de culturas *E. coli* após a seleção. Para a produção de proteína-scFv solúvel, fragmentos de DNA de VH-VL são excisados dos plasmídeos (XhoI-SpeI). Estes fragmentos são clonados através dos mesmos sítios de restrição no plasmídeo pComb3H5BFlag/His diferindo do original pComb3H5BHis no que diz respeito ao constructo de expressão (por exemplo, scFv) que inclui um Flag-tag (DYKDDDDK) entre o scFv e o His6-tag e as

proteínas de fago adicionais são excluídas. Após a ligação, cada grupo (diferentes ciclos de panning) de DNA de plasmídeo é transformado em 100 µl de *E. coli* TG1 ou XLI blue competente por choque térmico e plaqueado em LB-agar contendo carbenicilina. Colônias únicas são selecionadas em 100 µl de LB carb (LB com 50 µg/ml de carbenicilina).

E. coli transformado com pComb3H5BFlag/His que contém um segmento VL-e um segmento VH produz scFv solúvel em quantidades suficientes após a indução com 1 mM de IPTG. Devido a uma sequência de sinal adequada, o scFv é exportado para o periplasma onde se transforma em uma conformação funcional.

Colônias bacterianas únicas de *E. coli* das placas de transformação são selecionadas para preparações periplásmicas de pequena escala e são cultivadas em meio SB (por exemplo, 10 ml) suplementado com 20 mM de MgCl₂ e carbenicilina 50µg/ml (e re-dissolvido em PBS (por exemplo, 1 ml) após a colheita. Um choque de temperatura é aplicado por quatro ciclos de congelamento a -70°C e degelo a 37°C através dos quais a membrana externa da bactéria é destruída e as proteínas periplásmicas solúveis, incluindo os scFvs, são liberadas no sobrenadante. Após a eliminação de células intactas e fragmentos celulares por centrifugação, o sobrenadante que contém os scFvs anti-alfa de FAP é coletado e usado para a identificação de aglutinador específico de alfa de FAP, conforme segue:

A aglutinação de scFvs a alfa de FAP é testada por citometria de fluxo em células CHO transfectadas com alfa de FAP (consultar exemplo 31.1); sendo que as células CHO não transfectadas são usadas como um controle negativo.

Para a citometria de fluxo 2,5x10⁵ células são incubadas com 50 µl de preparação periplásmica de scFv ou com 5 µg/ml de scFv purificado em 50 µl de PBS com 2% de FCS. a aglutinação de scFv é detectada com um anticorpo anti-His (Anticorpo Penta-His, isento de BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 µg/ml em 50 µl de PBS com 2% de FCS. como um reagente de segunda etapa, um

fragmento F(ab')₂ purificado de afinidade conjugado a R-Ficoeritrina, IgG anti-camundongo de cabra (Específico de fragmento de Fc-gama), diluído 1:100 em 50 µl de PBS com 2% de FCS (Dianova, Hamburg, FRG) é usado. as amostras são medidas em um FACSscan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

5 Clones únicos são então analisados para propriedades favoráveis e sequência de aminoácido. FAPalfa específico scFvs são convertidos em anticorpos de cadeia única bi específicos recombinantes aglutinando-os através de um Gly₄Ser₁-de ligação com o I2C scFv específico de CD3 (SEQ ID Nº. 185) ou qualquer outro ScFv específico de CD3 da invenção para resultar em constructos com o regime de domínio VL_{FAPalpha} - (Gly₄Ser₁)₃ - VH_{FAPalpha}- Ser₁Gly₄Ser₁-VH_{CD3} - 10 (Gly₄Ser₁)₃ - VL_{CD3} ou regimes de domínio alternativos. Para expressão em Células CHO as seqüências codificadoras de (i) um Terminal N de líder da cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo um códon de início incorporado dentro de uma seqüência de consenso Kozak e (ii) uma etiqueta de Terminal C His₆- seguida por 15 um códon de parada estão ambos presos em estrutura para a seqüência de nucleotídeo codificando anticorpos de cadeia única bi específica anteriormente à inserção do fragmento de DNA resultante conforme obtido por síntese de gene no sítio de clonagem múltipla do vetor de expressão pEF-DHFR (Raum et al. Câncer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Transfecção da expressão gerada de 20 plasmídeos, purificação e expressão da proteína de constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas são desempenhadas conforme descrito nos Exemplos 31.3 e 31.4. Todos os outros procedimentos do estado da técnica são conduzidos de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Molecular Clonagem; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). 25

A identificação de constructos de anticorpo de cadeia única bi específica funcional é conduzida por análise de aglutinação de citometria de fluxo de cultura sobrenadante de células transfectadas expressando os constructos de anticorpo biespecíficos específicos de espécies cruzadas. A análise é 30 desempenhada conforme descrito no Exemplo 31.5. Somente aqueles constructos

que mostram aglutinação bi específica para humano e símios CD3 bem como para FAPalfa são selecionados para uso adicional.

A atividade citotóxica dos constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados contra FAPalfa células alvo positivas provocada por células de efeito é analisada como descrita no Exemplo 31.6. Somente estes constructos que mostram forte recrutamento de atividade citotóxica de células de efeito contra células positivas para FAPalfa são selecionadas para uso adicional.

32. Geração e caracterização de adicional FAPalfa e CD3 moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas

32.1 Geração de FAPalfa e CD3 moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas

Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas

Moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas, com uma especificidade de ligação de espécie cruzada específica para humano e primata não chimpanzé CD3epsilon bem como uma especificidade de espécie cruzada específica para humano e primata não chimpanzé FAPalfa, foram designadas conforme estabelecidas na seguinte Tabela 16:

Tabela 16: Formatos de anti-CD3 e anti-FAPalfa moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
1861/1860	FA19D12HLxI2CHL
1847/1846	FA20H3HLxI2CHL
1791/1790	FA22A9HLxI2CHL
1805/1804	FA22C11HLxI2CHL
1875/1874	FA19D9HLxI2CHL

1819/1818	FA22D8HLxI2CHL
1833/1832	FA22E8HLxI2CHL

Geração, expressão e purificação destas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas foram desempenhadas conforme descrito acima.

A análise de aglutinação de citometria de fluxo do FAPalfa e CD3 espécies cruzadas específicas de bi específicos anticorpos foi desempenhada conforme descrito acima. A aglutinação bi específica de moléculas de cadeia única listada acima, que são espécies cruzadas específicas para FAPalfa e espécies cruzadas específicas para humanos e primatas não chimpanzé CD3 foi claramente detectável conforme mostrado na Figura 70. Na análise FACS todos os constructos mostrados com ligação a CD3 e FAPalfa comparados ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos bi específicos para humanos e símios CD3 e FAPalfa antígenos foi demonstrada.

A bioatividade de anticorpos de cadeia única bi específicos gerados foi analisada por ensaios de citotoxicidade por liberação de crômio 51 (⁵¹Cr) in vitro conforme descrito acima. Conforme mostrado na Figura 71 todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecíficos específicos de espécies cruzadas gerados demonstraram atividade citotóxica contra humanos FAPalfa células alvo positivas provocadas por CD4/CD56 de humanos estimulados PBMC depletado e células de alvo positivas FAPalfa de símios provocadas pela linha de célula T de símios 4119LnPx.

32.2 Geração e análise de aglutinação de citometria de fluxo de fragmentos de anticorpo de cadeia única específicos de espécies cruzadas (scFv) de ligação para FAPalfa

As espécies cruzadas scFv específicas para FAPalfa foram geradas conforme descrito acima e designadas conforme estabelecido na seguinte Tabela 17:

Tabela 17: Designação de fragmentos de anticorpo de cadeia única específicos de espécies cruzadas

SEQ ID (nucl/prot)	Designação
1901/1900	86C12HL
1887/1886	87G9HL
1971/1970	86F12HL
1957/1956	86F10HL
1985/1984	86F2HL
1943/1942	86E5HL
1929/1928	86D6HL
1915/1914	86D2HL

A análise de aglutinação de citometria de fluxo de preparações Peri plásmicas que contêm espécies cruzadas de scFv específicas para FAPalfa usando Células CHO transfectadas com FAPalfa de humanos e Células CHO transfectadas com FAPalfa de símios foi desempenhada conforme descrito acima.

5 A ligação do scFv listado acima, que são espécies cruzadas específicas para FAPalfa foi claramente detectável conforme mostrado na Figura 72. Na análise FACS todos os constructos mostrados de ligação para FAPalfa comparado ao controle negativo. Foi demonstrada a especificidade de espécies cruzadas dos anticorpos scFv para humanos e símios FAPalfa antígenos.

10

Clonagem de moléculas de aglutinação específica de espécies cruzadas baseadas em scFvs e expressão e purificação destas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas é desempenhada conforme descrito acima. A análise de citometria de fluxo de aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas e análise de bioatividade por ensaios de cito toxicidade por liberação de crômio 51 (⁵¹Cr) in vitro são desempenhadas conforme descrito acima. Baseado em aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas demonstrada e citotoxicidade recrutada de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas são selecionadas para uso adicional.

15

Equivalentes de humanos/humanizados de scFvs não humanos espécies cruzadas específicas para FAPalfa, contidas em moléculas selecionadas de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas são gerados conforme descrito na presente. Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas baseadas nestes scFvs humanos/humanizados e expressão e purificação dessas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas é desempenhada conforme descrito acima. A análise de citometria de fluxo de aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas e análise de bioatividade por ensaios de cito toxicidade por liberação de crômio 51 (51Cr) in vitro são desempenhadas conforme descrito acima. Baseado em aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas demonstrada e citotoxicidade recrutada de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas são selecionadas para uso adicional.

33. Geração e caracterização de IGF-1R e CD3 moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas

33.1 Gerações de Células CHO expressando IGF-1R humano

A seqüência de codificação de IGF-1R humano conforme publicado em GenBank (Número de acesso NM_000875) foi obtido síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi projetado de modo a conter primeiro um sítio Kozak para expressão eucariótica do constructo seguido da seqüência de codificação do IGF-1R humano, proteína e um códon de parada (o cDNA e seqüência de aminoácido do constructo estão listados sob SEQ ID N°s 2011 e 2012). O fragmento de síntese genética foi também projetado de modo a introduzir sítios de restrição no início e no fim do fragmento. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI em terminação 5' e Sall em terminação 3' foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. Sítios de restrição interna indesejados foram removidos por mutação silenciosa da seqüência de codificação no fragmento de síntese genética. O fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR é descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) seguindo

protocolos padrão. Os procedimentos supramencionados foram conduzidos de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Clonagem Molecular; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com seqüência verificada de seqüência de nucleotídeo foi transfectado em Células CHO deficientes de DHFR for expressão eucariótica do constructo. Proteína Eucariótica com expressão em Células CHO deficientes de DHFR foi desempenhada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. A amplificação genética do constructo foi induzida concentrações crescentes de metotrexato (MTX) para uma concentração final de até to 20 nM MTX.

33.2 Gerações de Células CHO de expressão de símios IGF-1R

A sequência de codificação de símio IGF-1R conforme publicado GenBank (Número de acesso XM_001100407) foi obtida por síntese genética de acordo com protocolos padrão. O fragmento de síntese genética foi projetado de modo a conter primeiro um sítio Kozak para expressão eucariótica do constructo seguido pela seqüência de codificação de símio IGF-1R proteína e um códon de parada (o cDNA e seqüência de aminoácido do constructo estão listados sob SEQ ID N°s 2013 e 2014). O fragmento de síntese genética foi também projetado de modo a introduzir sítios de restrição no início e na terminação do fragmento. Os sítios de restrição introduzidos, EcoRI na terminação 5' e Sall na terminação 3', foram utilizados nos seguintes procedimentos de clonagem. Sítios de restrição interna indesejados foram removidos por mutação silenciosa da seqüência de codificação no fragmento de síntese genética. O fragmento de síntese genética foi clonado através de EcoRI e Sall em um plasmídeo designado pEF-DHFR (pEF-DHFR que foi descrito em Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) seguindo protocolos padrão. Os procedimentos supracitados foram conduzidos de acordo com protocolos padrão (Sambrook, Clonagem Molecular; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Um clone com seqüência verificada de seqüência de nucleotídeo foi transfectado em Células CHO deficientes de DHFR para expressão

eucariótica do constructo. Expressão eucariótica de proteína em Células CHO deficientes de DHFR foi desempenhada conforme descrito por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. A amplificação genética do constructo foi induzida por concentrações crescentes de metotrexato (MTX) a uma concentração

5 final de até 20 nM MTX.

33.3 Gerações de IGF-1R e CD3 moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas

Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas

10 Geralmente, moléculas de anticorpo de cadeia única bi específicas, cada uma compreendendo um domínio com uma especificidade de ligação de espécies cruzadas específica para humanos e primatas não chimpanzé CD3epsilon assim como um domínio com uma especificidade de ligação de espécies cruzadas específica para humanos e primatas não chimpanzé IGF-1R,

15 foram designados conforme estabelecido na seguinte Tabela 18:

Tabela 18: Formatos de anti-CD3 e anti-IGF-1R moléculas de anticorpo de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de constructos de proteína (N → C)
2028/2027	IGF1R2HLxI2CHL
2042/2041	IGF1R7HLxI2CHL
2056/2055	IGF1R9HLxI2CHL
2070/2069	IGF1R10HLxI2CHL
2084/2083	IGF1R11HLxI2CHL
2098/2097	IGF1R12HLxI2CHL
2112/2111	IGF1R13HLxI2CHL
2126/2125	IGF1R15HLxI2CHL
2140/2139	IGF1R16HLxI2CHL
2154/2153	IGF1R17HLxI2CHL

2168/2167	IGF1R19HLxI2CHL
2182/2181	IGF1R20HLxI2CHL
2196/2195	IGF1R21HLxI2CHL
2210/2209	IGF1R23HLxI2CHL
2224/2223	IGF1R24HLxI2CHL

Geração, expressão e purificação destas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas foram desempenhadas conforme descrito acima.

A análise de aglutinação de citometria de fluxo do IGF-1R e CD3 espécies cruzadas específica bi específica de anticorpos foi desempenhada conforme descrito acima. A aglutinação bi específica de moléculas de cadeia única listada acima, que são espécies cruzadas específica para IGF-1R e espécies cruzadas para humanos e primatas não chimpanzé CD3 foi claramente detectável conforme mostrado na Figura 73. Na análise FACS todos os constructos mostrados ligando a CD3 e IGF-1R comparados ao controle negativo. A especificidade de espécies cruzadas de anticorpos bi específicas para humanos e símios de antígenos CD3 e IGF-1R foi demonstrada.

A bioatividade de anticorpos de cadeia única bi específica gerados foi analisada por ensaios de cito toxicidade por liberação de crômio 51 (⁵¹Cr) in vitro conforme descrito acima. Todos os constructos de anticorpo de cadeia única biespecífica específica de espécies cruzadas mostrados na Figura 74 demonstraram atividade citotóxica contra humanos IGF-1R de células alvo positivas provocadas por CD4/CD56 humano estimulado depletado PBMC e símio IGF-1R de células alvo positivas provocadas pela linha de célula T de símio 4119LnPx.

Equivalentes de Humano/humanizados de scFvs não humanos de espécie cruzada específica para IGF-1R contidos em moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas são gerados conforme descrito na presente. Clonagem de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas baseadas nestes humano/humanizados scFvs e expressão e purificação

- destas moléculas de cadeia única biespecíficas específicas de espécies cruzadas é desempenhada conforme descrito acima. Análise de citometria de fluxo de aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas e análise de bioatividade por ensaios de cito toxicidade por liberação de crômio 51 (^{51}Cr) in vitro são
- 5 desempenhadas conforme descrito acima. Baseada em demonstrada aglutinação biespecífica específica de espécies cruzadas e cito toxidade recrutada de moléculas de aglutinação específicas de espécies cruzadas são selecionadas para uso adicional.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro domínio de aglutinação, o qual é um sítio de interação com o antígeno, capaz de se aglutinar a um epítopo de cadeia de CD3 ϵ (épsilon) de humano e de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* ou *Saimiri sciureus*, em que o epítopo é parte de uma sequência de aminoácido contida no grupo que consiste em SEQ ID N° 2, 4, 6 ou 8, e compreende pelo menos a sequência de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu e um segundo domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um antígeno selecionado a partir do grupo que consiste em antígeno de Célula-Tronco Prostática (PSCA), antígeno de Linfócito B CD19 (CD19) receptor de fator de crescimento de hepatócito (C-MET), Endosialin, o domínio 1 similar a EGF de EpCAM, codificado por éxon 2, proteína alfa de ativação de fibroblasto (alfa de FAP) e receptor I de fator de crescimento similar à insulina (IGF-IR ou IGF-1 R).

2. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de aglutinação compreende uma região VL que compreende CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 selecionados a partir de:

(a) CDR-L1, conforme retratado em SEQ ID N° 27, CDR-L2, conforme retratado em SEQ ID N° 28, e CDR-L3, conforme retratado em SEQ ID N° 29;

(b) CDR-L1, conforme retratado em SEQ ID N° 117, CDR-L2, conforme retratado em SEQ ID N° 118, e CDR-L3, conforme retratado em SEQ ID N° 119; e

(c) CDR-L1, conforme retratado em SEQ ID N° 153. CDR-L2, conforme retratado em SEQ ID N° 154, e CDR-L3, conforme retratado em SEQ ID N° 155.

3. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de aglutinação compreende uma região VH que compreende CDR-H 1, CDR-H2 e CDR-H3 selecionados a partir de:

(a) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 12, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 13, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 14;

5 (b) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 30, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 31, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 32;

(c) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 48, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 49, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 50;

10 (d) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 66, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 67, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 68;

(e) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 84, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 85, e CDR-H3, conforme retratado em
15 SEQ ID N° 86;

(f) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 102, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 103, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 104;

(g) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 120, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 121, e CDR-H3, conforme retratado em
20 SEQ ID N° 122;

(h) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 138, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 139, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 140;

25 (i) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 156, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 157, e CDR-H3, conforme retratado em SEQ ID N° 158; e

(j) CDR-H1, conforme retratado em SEQ ID N° 174, CDR-H2, conforme retratado em SEQ ID N° 175, e CDR-H3, conforme retratado em
30 SEQ ID N° 176.

4. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o primeiro

domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítipo de cadeia de CD3ε humano ou de primata não Chimpanzé compreende uma região VL selecionada a partir do grupo que consiste em uma região VL, conforme retratado na SEQ ID N° 35, 39, 125, 129, 161 ou 165.

5 5. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítipo de cadeia de CD3ε humano ou de primata não Chimpanzé compreende uma região VH selecionada a partir do grupo que consiste em uma região VH, conforme
10 retratado na SEQ ID N° 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 ou 181.

6. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítipo de
15 cadeia de CD3E humano ou de primata não Chimpanzé compreende uma região VL e uma região VH selecionadas a partir do grupo que consiste em:

- (a) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 17 ou 21, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 15 ou 19;
- (b) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 35 ou 39,
20 e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 33 ou 37;
- (c) uma região VL, conforme retratado em SEQ D N° 53 ou 57, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 51 ou 55;
- (d) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID. N° 71 ou 75, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 69 ou 73;
- (e) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 89 ou 93,
25 e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 87 ou 91;
- (f) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 107 ou 11, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 105 ou 109;
- (g) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 125 ou
30 129, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 123 ou 127;
- (h) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 143 ou 147, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 141 ou 145;

(i) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 161 ou 165, e uma região.

VH, conforme retratado em SEQ ID N° 159 ou 163; e

(j) uma região VL, conforme retratado em SEQ ID N° 179 ou 183, e uma região VH, conforme retratado em SEQ ID N° 177 ou 181.

7. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de aglutinação capaz de se aglutinar a um epítopo de cadeia de CD3ε humano ou de primata não Chimpanzé compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 ou 187.

8. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de aglutinação é selecionado do grupo que consiste em de domínios de aglutinação capazes de se aglutinar a um antígeno de Célula-Tronco Prostática humano (PSCA) e/ou um PSCA de primata não humano, capazes de se aglutinar ao antígeno de Linfócito B CD19 (CD19) humano e/ou de um CD19 de primata não humano, capazes de se aglutinar ao receptor de fator de crescimento de hepatócito (C-MET) humano e/ou um C-MET de primata não humano, capazes de se aglutinar ao Endosialin humano e/ou a um Endosialin de primata não humano, capazes de se aglutinar ao EpCAM humano e/ou a um EpCAM de primata não humano, capazes de se aglutinar a proteína alfa de ativação de fibroplasto (alfa FAP) humana e/ou a uma alfa FAP de primata não humano, e capazes de se aglutinar ao receptor I de fator decrescimento similar a insulina (IGF-IR ou IGF-1R) e/ou a IGF-IR de primata não humano.

9. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de se aglutinar ao antígeno de Célula-Tronco Prostática humano (PSCA) e/ou um PSCA de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das sequências a seguir, como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de

aglutinação selecionado a partir de:

- a) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 382 a 384 e CDR L1-3 de SEQ TD N°: 377 a 379;
- b) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 400 a 402 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 395 a 397;
- c) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 414 a 416 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 409 a 411;
- d) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 432 a 434 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 427 a 429;
- e) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1215 a 1217 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1220 a 1222;
- f) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1187 a 1189 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1192 a 1194;
- g) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1173 a 1175 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1178 a 1180;
- h) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1229 a 1231 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1234 a 1236;
- i) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1201 a 1203 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1206 a 1208
- k) CDR N1-3 de SEQ ID N°: 1257 a 1259 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1262 a 1264; e
- l) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1243 a 1245 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1248 a 1250.

10. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de se aglutinar ao antígeno de Linfócito B CD19 (CD19) humano e/ou de um CD19 de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das sequências a seguir, como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado a partir de:

- a) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 478 - 480 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 473 a 475;

- b) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 530 - 532 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 525 a 527;
- c) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 518 - 520 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 513 a 515;
- 5 d) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 506 - 508 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 501 a 503;
- e) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 494 a 496 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 489a491;
- f) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 542 a 544 e CDR L1-3 de SEQ ID
10 N°: 537a 539;
- g) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 554 a 556 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 549a551;
- h) CPR H1-3 de SEQ ID N°: 566 a 568 e CDR L1-3 de SEO ID N°: 561a563;
- 15 i) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 578 a 580 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 573 a 575;
- j) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 590 a 592 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 585 a 587;
- k) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 602 a 604 e CDR L1-3 de SEQ ID
20 N°: 597 a 599;
- l) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 614 a 616 e CDRL1-3 de SEQ ID N°: 609 a 611;
- m) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 626 a 628 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 621 a 623;
- 25 n) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 638 a 640 e CDR L1-3 de SEQ 10 N°: 633 a 635;
- o) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 650 a 652 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 645 a 647;
- p) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 662 a 664 e CDR L1-3 de SEQ ID
30 N°: 657 a 659;
- q) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 674 a 676 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 669 a 671;

- r) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 686 a 688 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 681 a 683;
- s) CDRH1-3 de SEQ ID N°: 698 a 700 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 693 a 695;
- 5 t) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 710 a 712 e CDR L1-3 de*SEQ 10 N°: 705 a 707;
- u) CDR H-1-3 de SEQ ID N°: 722 a 724 e CDR L1-3 de SEQ 10 N°: 717 a 719;
- v) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 734 a 736 e CDR L1-3 de SEQ ID 10 N°: 729 a 731;
- w) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 746 a 748 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 741 a 743;
- x) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 758 a 760 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 753 a 755;
- 15 y) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1271 a 1273 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1276 a 1278;
- z) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1285 a 1287 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1290 a 1292;
- aa) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1299 a 1301 e CDR L1-3 de SEQ 20 ID N°: 1304 a 1306;
- ab) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1313 a 1315 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1318 a 1320;
- ac) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1327 a 1329 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1332 a 1334;
- 25 ad) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1341 a 1343 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1346 a 1348;
- ae) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1355 a 1357 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1360 a 1362;
- af) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1369 a 1371 e CDR L1-3 de SEQ 30 ID N°: 1374 a 1376; e
- ag) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1383 a 1385 e CDR L1-3 de SEQ 10 N°: 1388 a 1390.

11. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de se aglutinar ao receptor de fator de crescimento de hepatócito (C-MET) humano e/ou a um C-MET de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das sequências a seguir, como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado a partir de:

- a) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 821 a 823 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 816 a 818;
- 10 b) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 836 a 838 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 833 a 835;
- c) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 845 a 847 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 840 a 842;
- d) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 863 a 865 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 858 a 860;
- 15 e) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 881 a 883 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 876 a 878;
- f) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 899 a 901 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 894 a 896;
- 20 g) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1401 a 1403 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1406 a 1408;
- h) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1415 a 1417 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1420 a 1422;
- i) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1429 a 1431 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1434 a 1436;
- 25 j) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1443 a 1445 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1448 a 1450;
- k) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1457 a 1459 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1462 a 1464;
- 30 l) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1471 a 1473 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1476 a 1478;
- m) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1639 a 1641 e CDR L1-3 de SEQ

ID N°: 1644 a 1646;

n) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1625 a 1627 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1630 a 1632;

5 o) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1611 a 1613 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1616 a 1618;

p) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1597 a 1599 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1602 a 1604

q) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1569 a 1571 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1574 a 1576

10 r) CQR H1-3 de SEQ ID N°: 1555 a 1557 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1560 a 1562;

s) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1583 a 1585 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1588 a 1590;

15 t) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 1541 a 1543 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1546 a 1548;

u) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 1513 a 1515 e CDR L1-3 de SEQ 10 N°: 1518 a 1520;

v) CDR H1-3 de SEQ ib N°: 1527 a 1529 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1532 a 1534;

20 w) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1499 a 1501 e CDR L1-3 de SEQ 10 N°: 1504 a 1506; e

x) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 1485 a 1487 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1490 a 1492.

12. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de
25 se aglutinar ao Endosialin humano e/ou a um Endosialin de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das sequências a seguir como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado a partir de:

30 a) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 1653 a 1655 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1658 a 1660;

b) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1667 - 1669 e CDR L1-3 de SEQ ID

Nº: 1672 a 1674;

c) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1681 a 1683 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1686 a 1688;

5 d) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1695 a 1697 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1700 a 1702;

e) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1709 a 1711 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1714 a 1716; e

f) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1723 a 1725 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1728 a 1730.

10 13. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de se aglutinar ao EpCAM humano e/ou a um EpCAM de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das
15 CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado a partir de:

a) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 940 a 942 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 935 a 937;

b) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 956 a 958 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 951 a 953;

20 c) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 968 a 970 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 963 a 965;

d) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 980 a 982 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 975 a 977;

25 e) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 992 a 994 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 987 a 989;

f) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1004 a 1006 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 999 a 1001;

g) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1028 a 1030 e CDR L1-3 de SEQ ~D Nº: 1023 a 1025;

30 h) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1040 a 1042 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1035 a 1037;

i) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1052 a 1054 e CDR L1-3 de SEQ ID

Nº: 1047 a 1049;

j) CDR H1-3 de EQ ID Nº: 1074 a 1076 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1069 a 1071;

5 k) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1086 a 1088 e CDR L1-3 de EQ ID Nº: 1081 a 1083;

l) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1098 a 1000 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1093 a 1095;

m) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1110 a 1112 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1105 a 1107;

10 n) CDR FI1-3 de SEQ ID Nº: 1122 a 1124 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1117 a 1119;

o) CDR H1-3 de SEQ ~D Nº: 1016 a 1018 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1011 a 1013; e

15 p) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1765 a 1767 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1770 a 1772.

14. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de se aglutinar a proteína alfa de ativação de fibroblasto (alfa FAP) humana e/ou a uma alfa FAP de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das sequências a seguir, como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado a partir de:

a) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1 137 a 1 139 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1132 a 1134;

25 b) COR H1-3 de SEQ ID Nº: 1849 a 1851 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1854 a 1856;

c) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1835 a 1837 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1840 a 1842;

30 d) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1779 a 1781 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1784 a 1786;

e) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 1793 a 1795 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 1798 a 1800;

f) CDR H1-3 de SEQ 10 N°: 1863 a 1865 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1868 a 1870;

g) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1807 a 1809 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1812 a 1814;

5 h) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1821 a 1823 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1826 a 1828;

i) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1891 a 1893 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1896 a 1898;

10 j) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1877 a 1879 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1882 a 1884;

k) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1961 a 1963 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1966 a 1968;

l) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1947 a 1949 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1952 a 1954

15 m) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1975 a 1977 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1980 a 1982;

n) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1933 a 1935 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1938 a 1940;

20 o) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1919 a 1921 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1924 a 1926; e

p) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 1905 a 1907 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 1910 a 1912.

15. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica capaz de se aglutinar ao receptor I de fator decrescimento similar a insulina (IGF-IR ou IGF-1R) e/ou a IGF-IR de primata não humano de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única compreende um grupo das sequências a seguir, como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 e CDR L3 no segundo domínio de aglutinação selecionado a partir de:

30 a) CDR H1-3 SEQ ID N°: 2016 a 2018 e CDR L1-3 de SEQ ID N°: 2021 a 2023;

b) CDR H1-3 de SEQ ID N°: 2030 a 2032 e CDR L1-3 de SEQ ID

Nº: 2035 a 2037;

c) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2044 a 2046 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2049 a 2051;

d) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2058 a 2060 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2063 a 2065;

e) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2072 a 2074 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2077 a 2079;

f) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2086 a 2088 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2091 a 2093;

g) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2100 a 2102 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2105 a 2107;

h) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2114 a 2116 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2119 a 2121;

i) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2128 a 2130 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2133 a 2135;

j) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2142 a 2144 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2147 a 2149;

k) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2156 a 2158 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2161 a 2163;

l) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2170 a 2172 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2175 a 2177;

m) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2184 a 2186 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2189 a 2191;

n) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2198 a 2200 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2203 a 2205; e

o) CDR H1-3 de SEQ ID Nº: 2212 a 2214 e CDR L1-3 de SEQ ID Nº: 2217 a 2219.

16. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é usada na

prevenção, tratamento ou melhora de câncer ou doenças autoimunes.

18. Molécula de anticorpo de cadeia única biespecífica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de anticorpo biespecífico de cadeia única é usada na

5 prevenção, tratamento ou melhora de câncer ou doenças autoimunes.

Figura 1

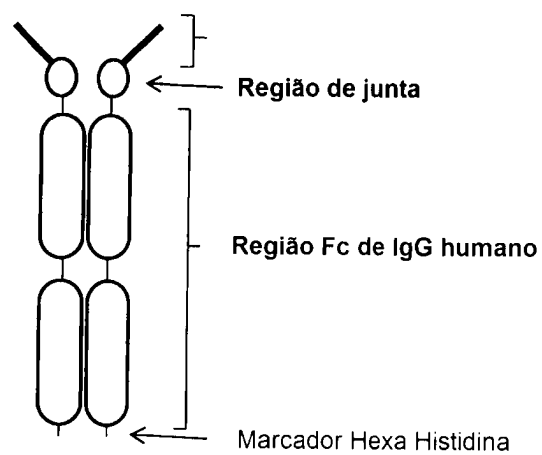


Figura 2

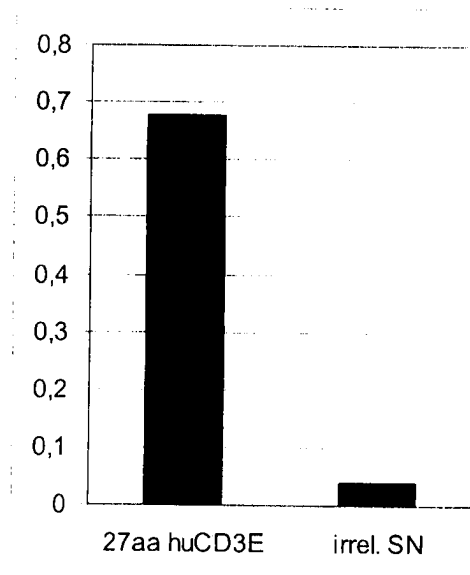


Figura 3

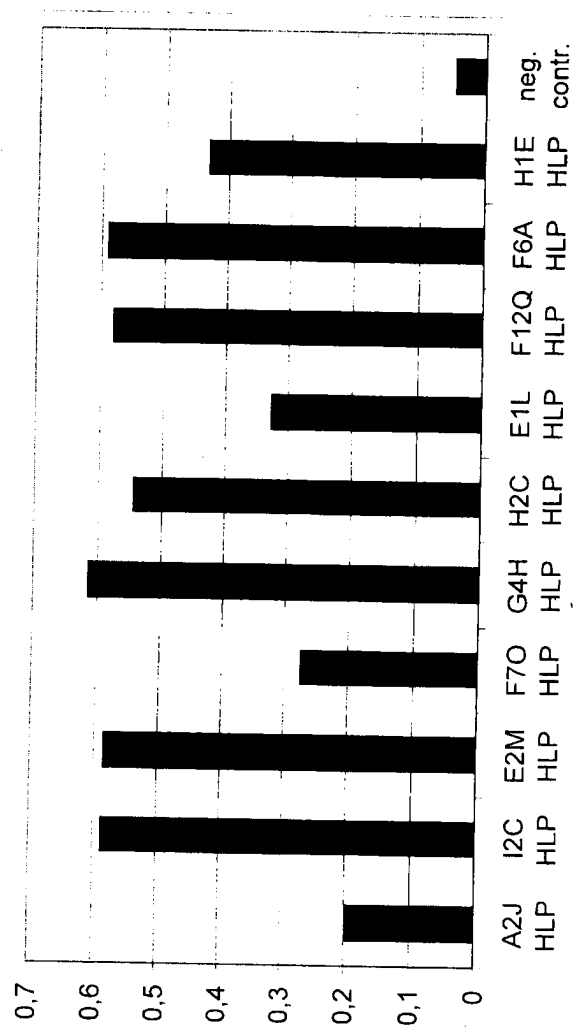


Figura 4

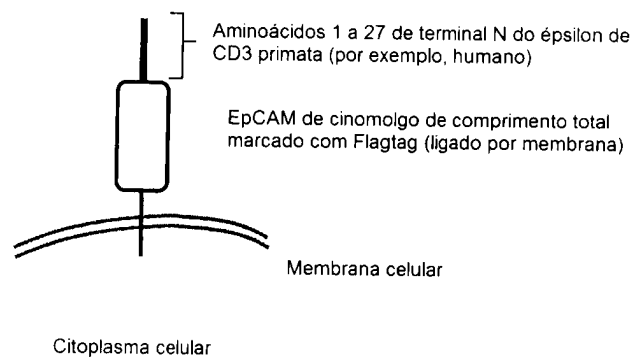


Figura 5

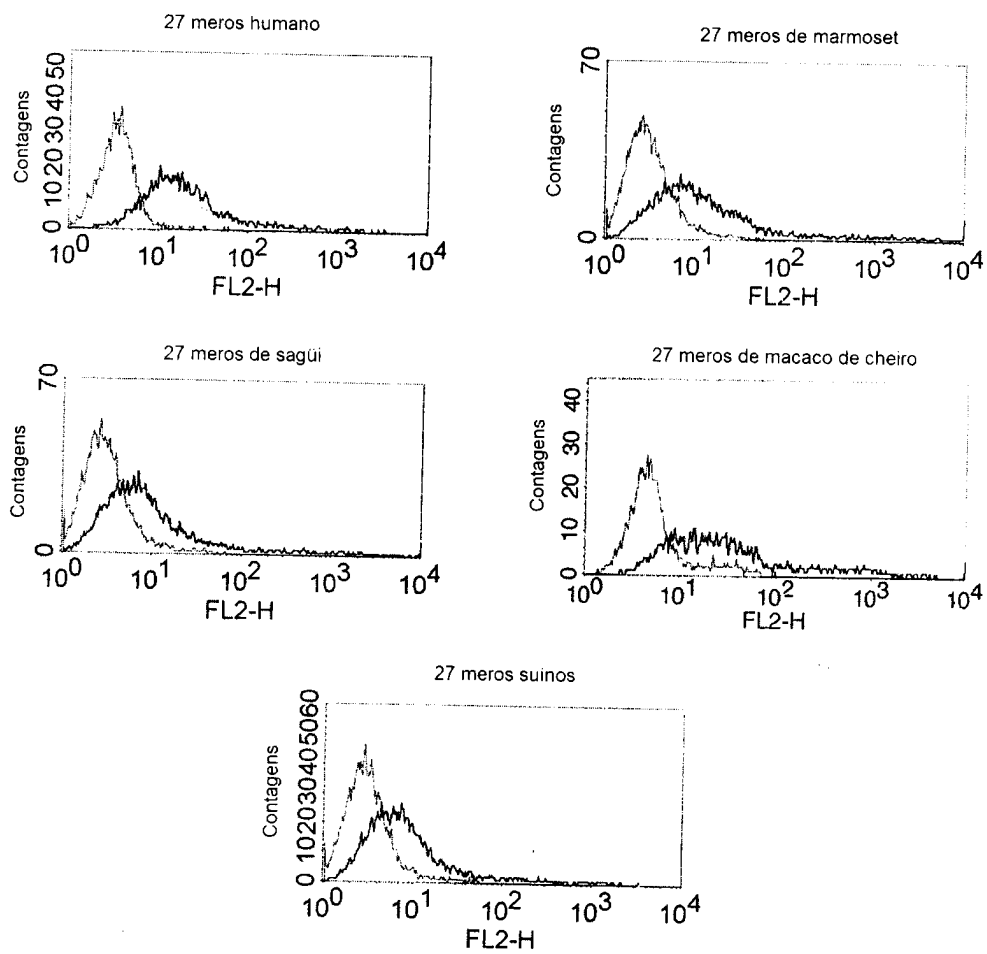


Figura 6A

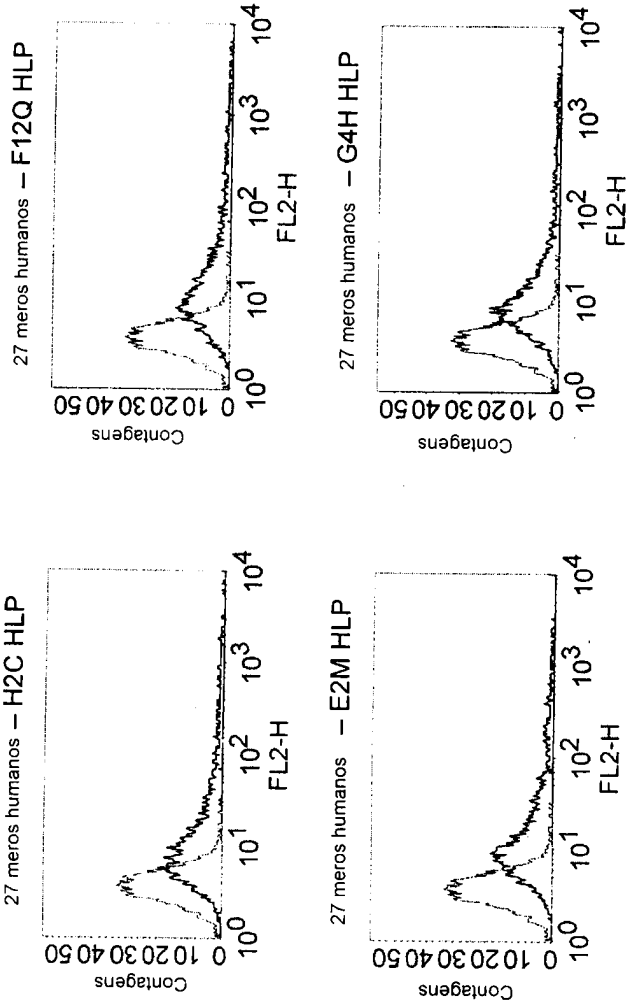


Figura 6B

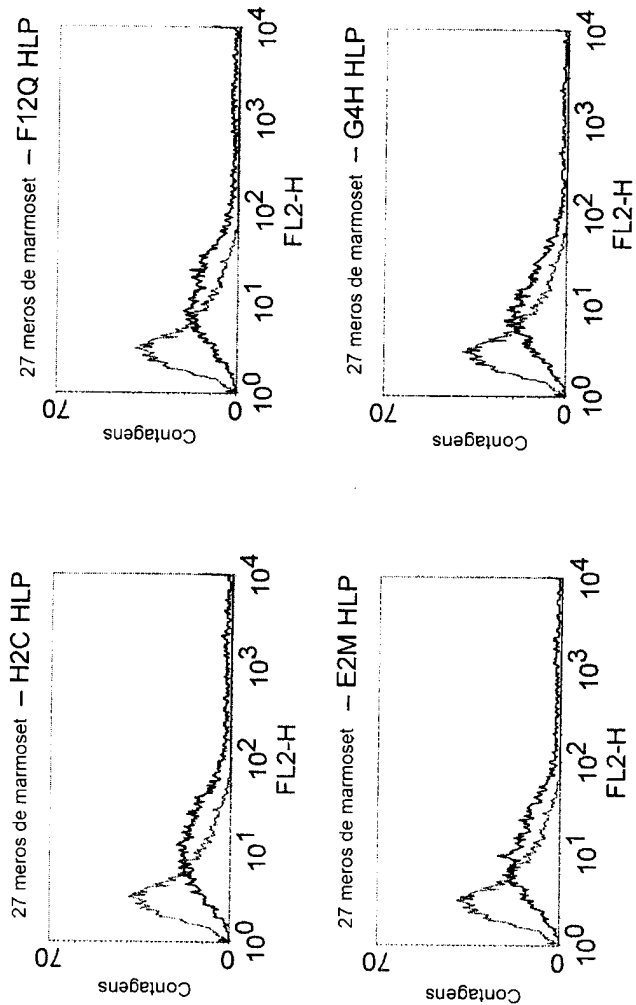


Figura 6C

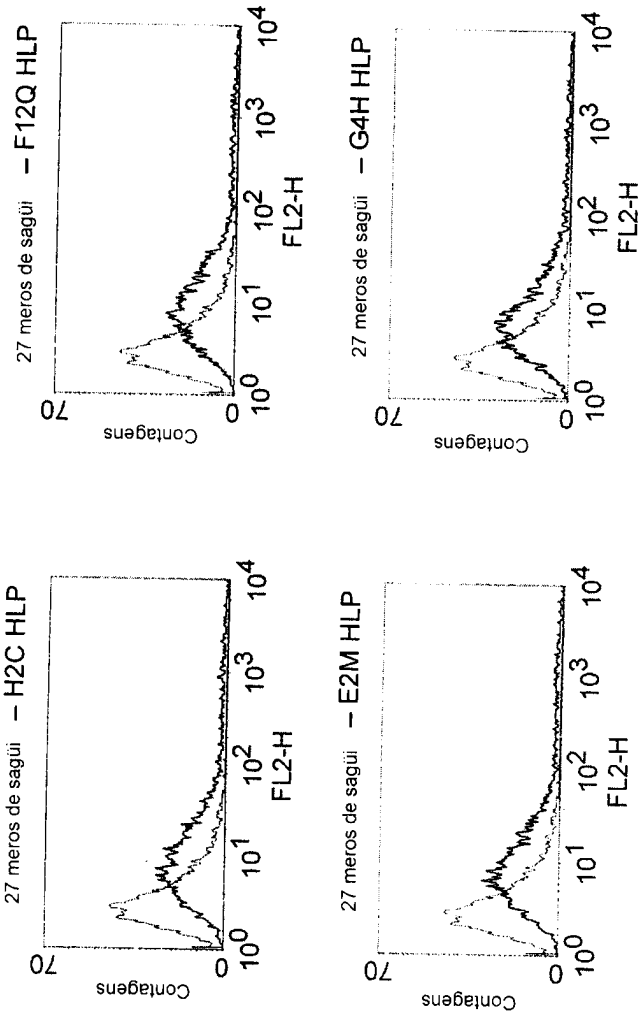


Figura 6D

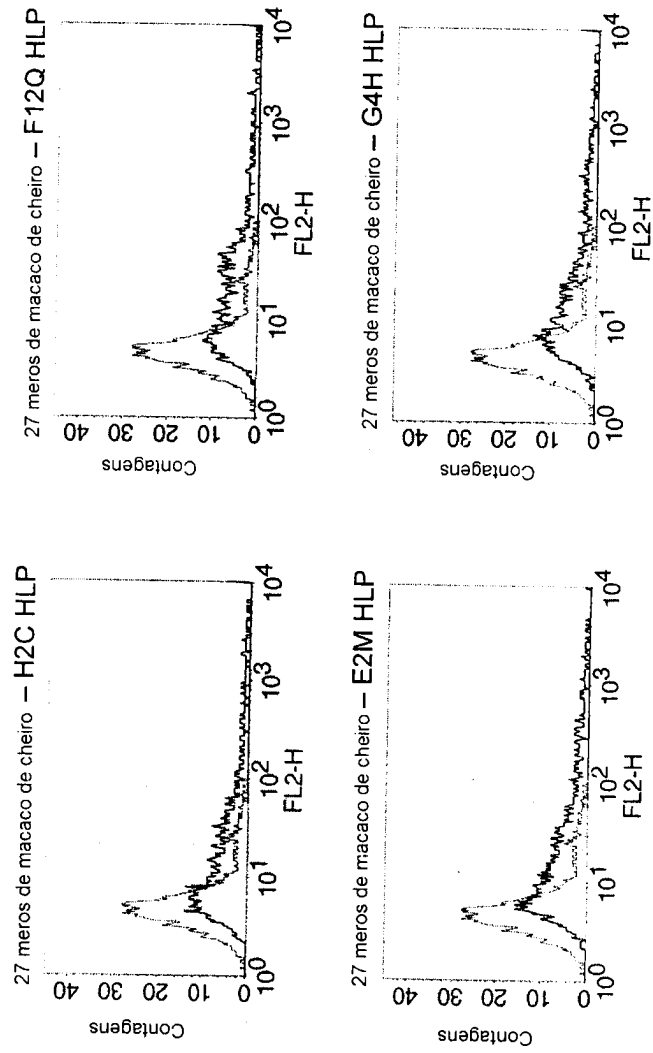


Figura 6E

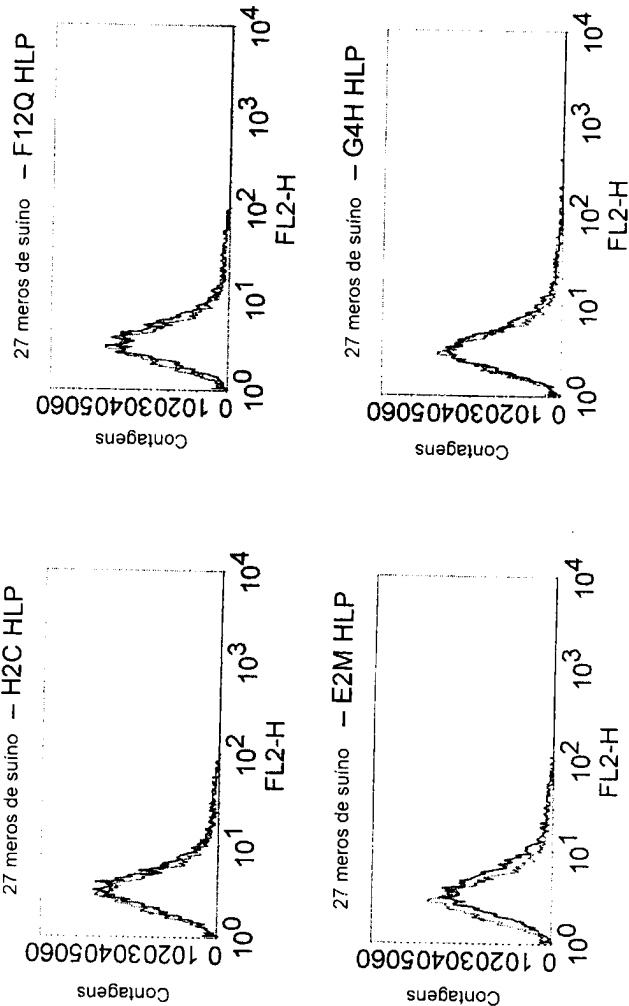


Figura 7

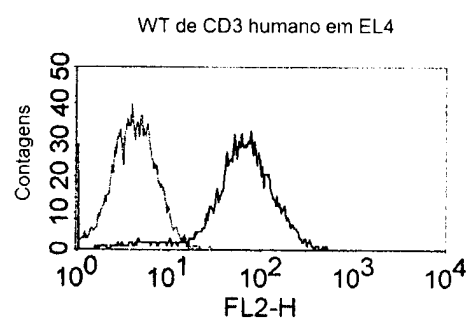


Figura 8A

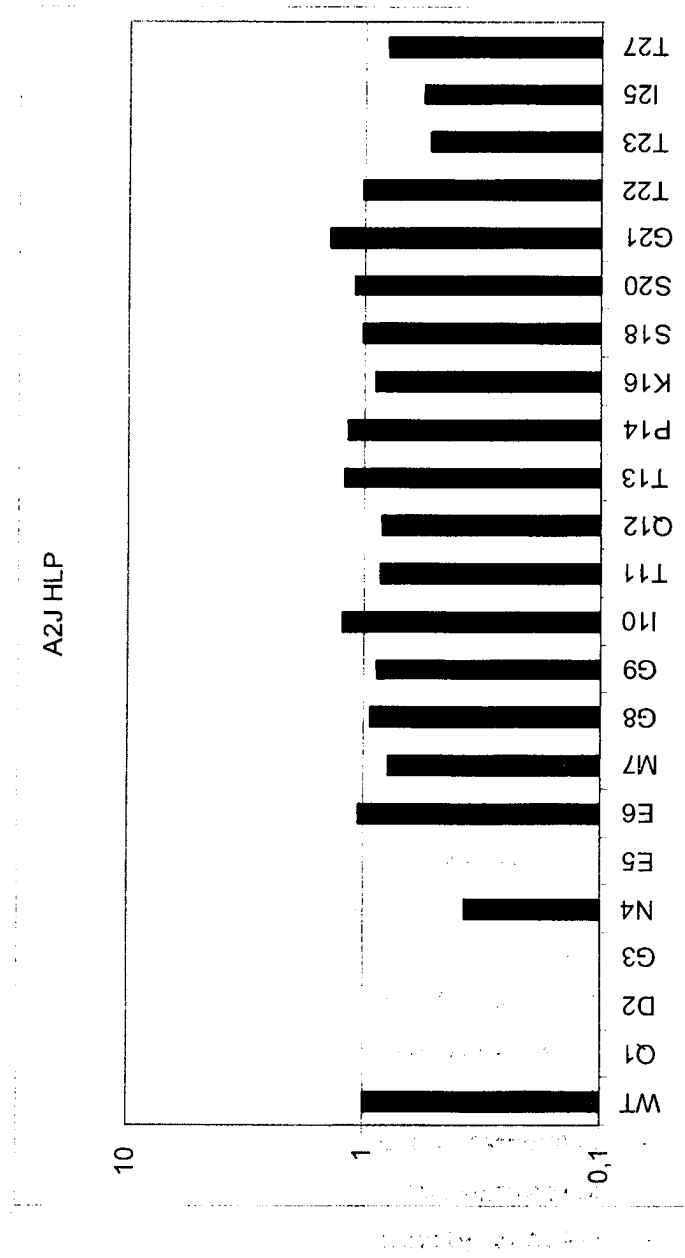


Figura 8B

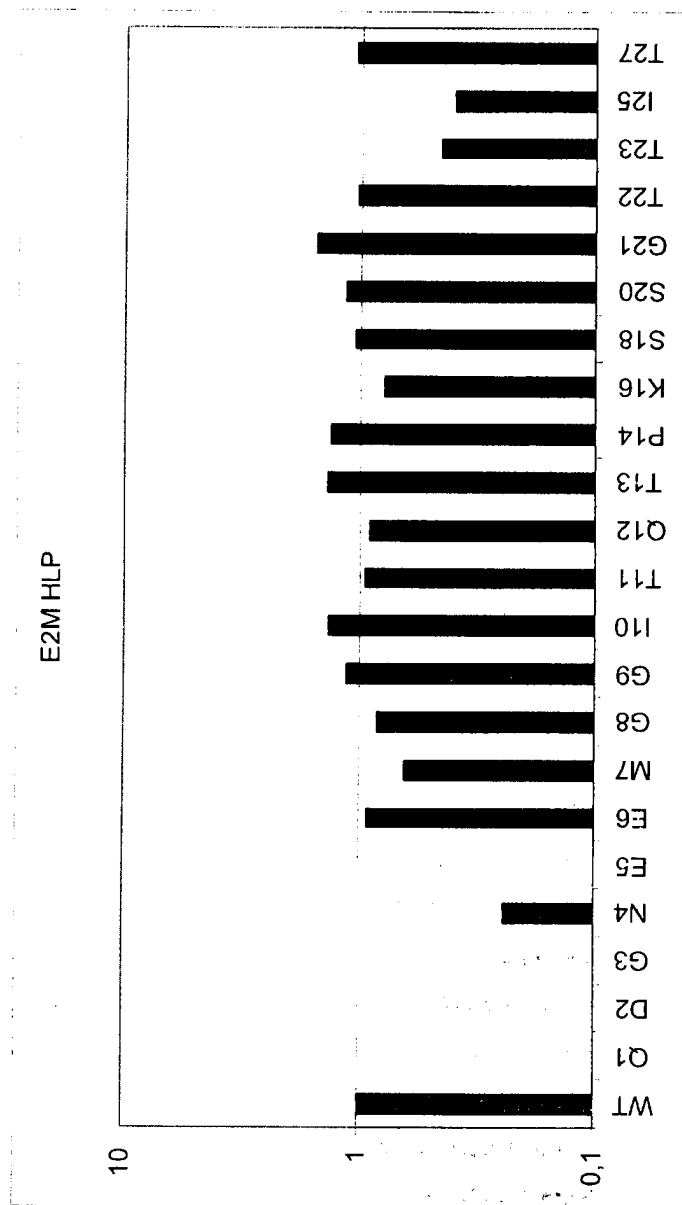
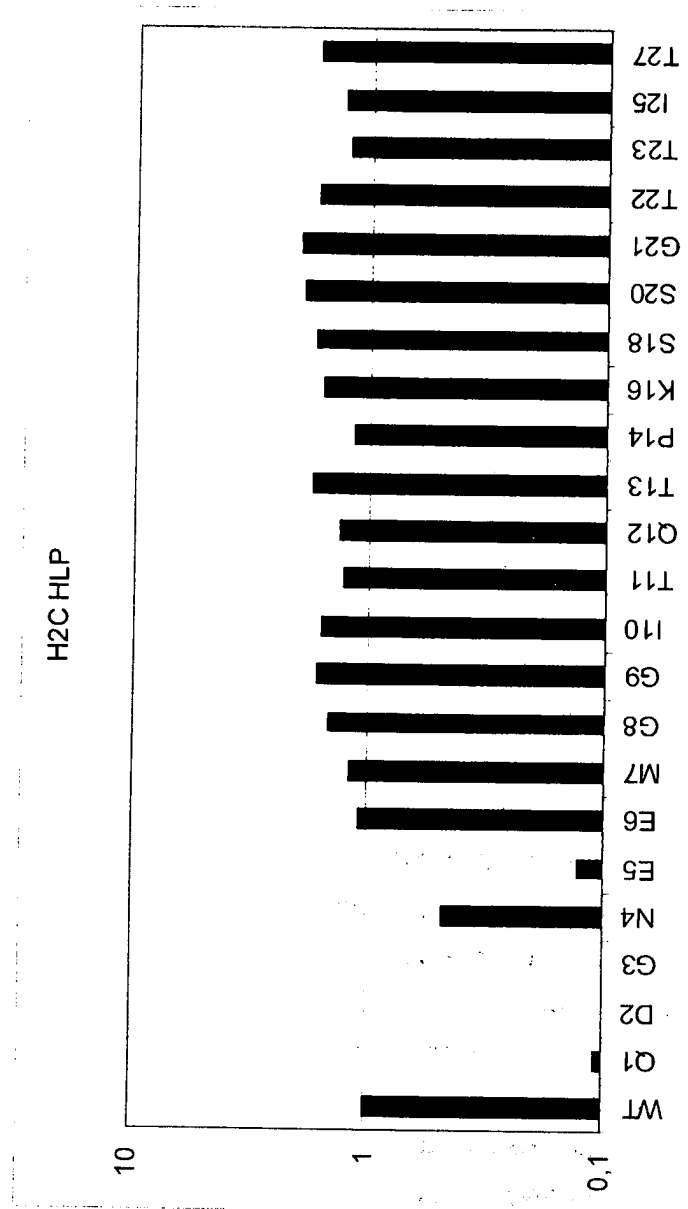


Figura 8C



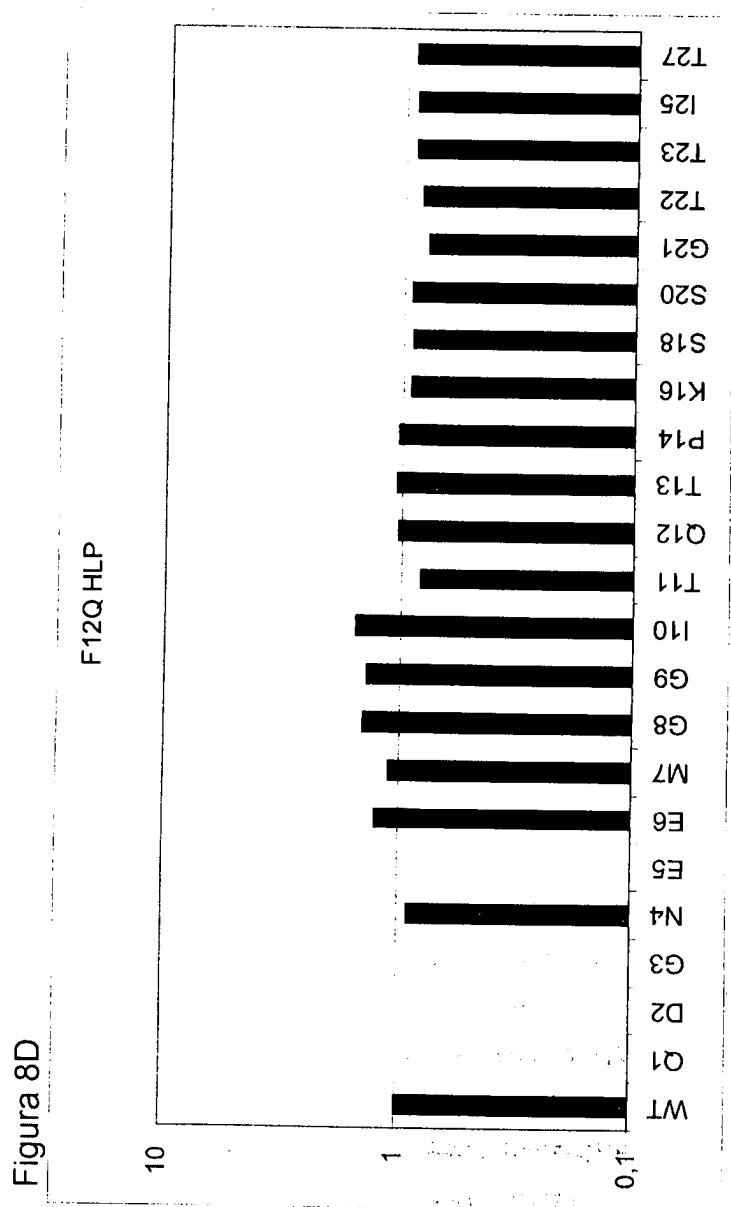


Figura 9

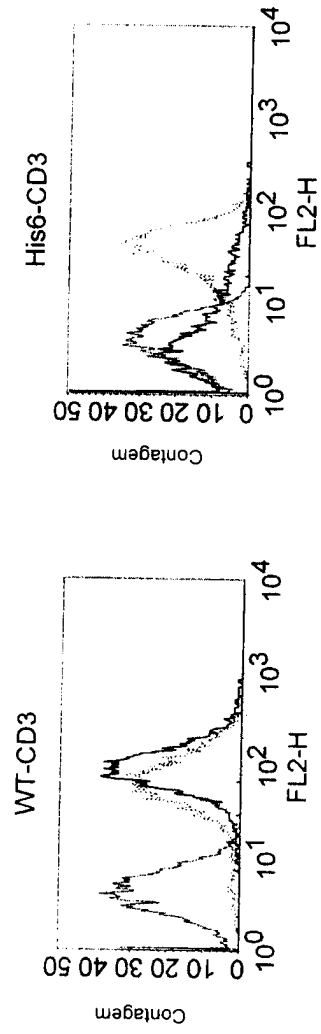


Figura 10

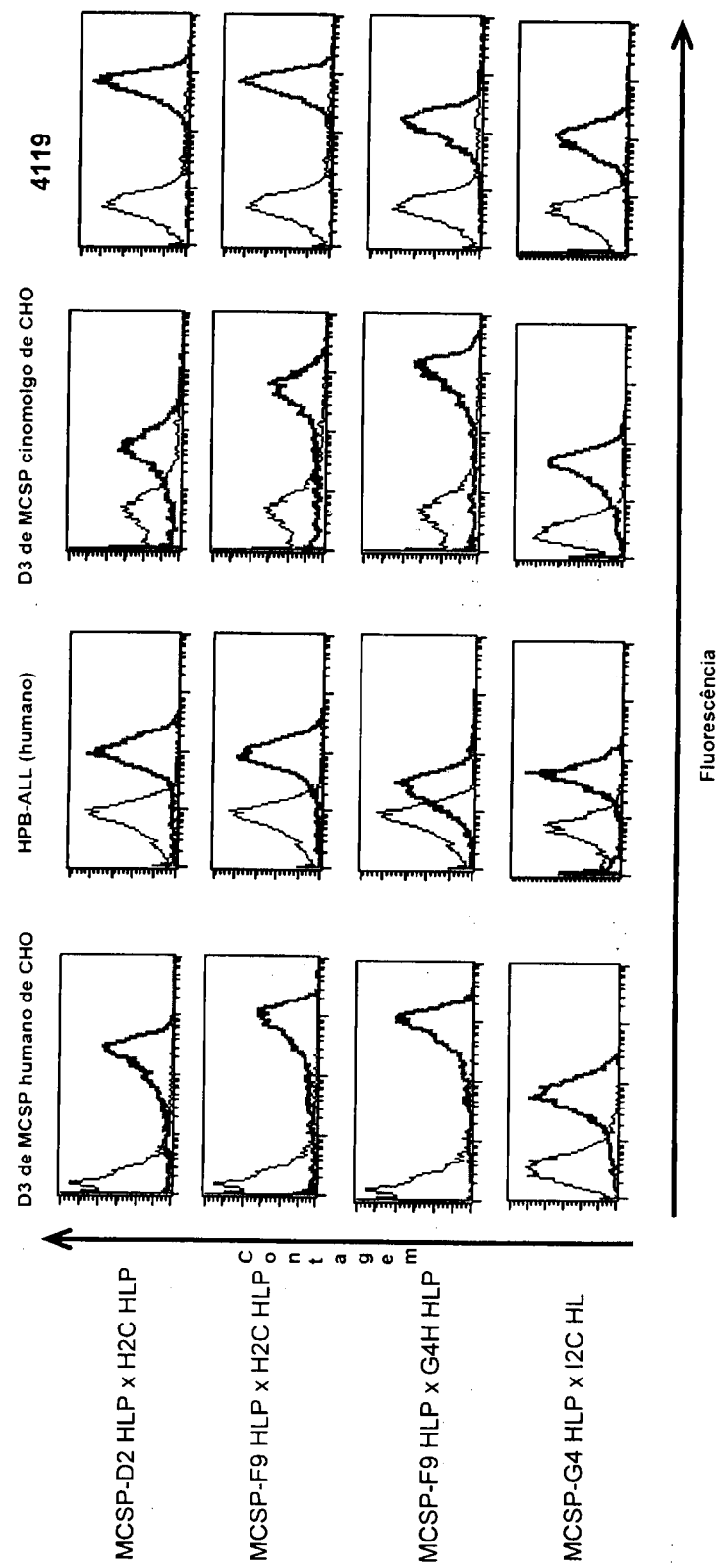


Figura 11

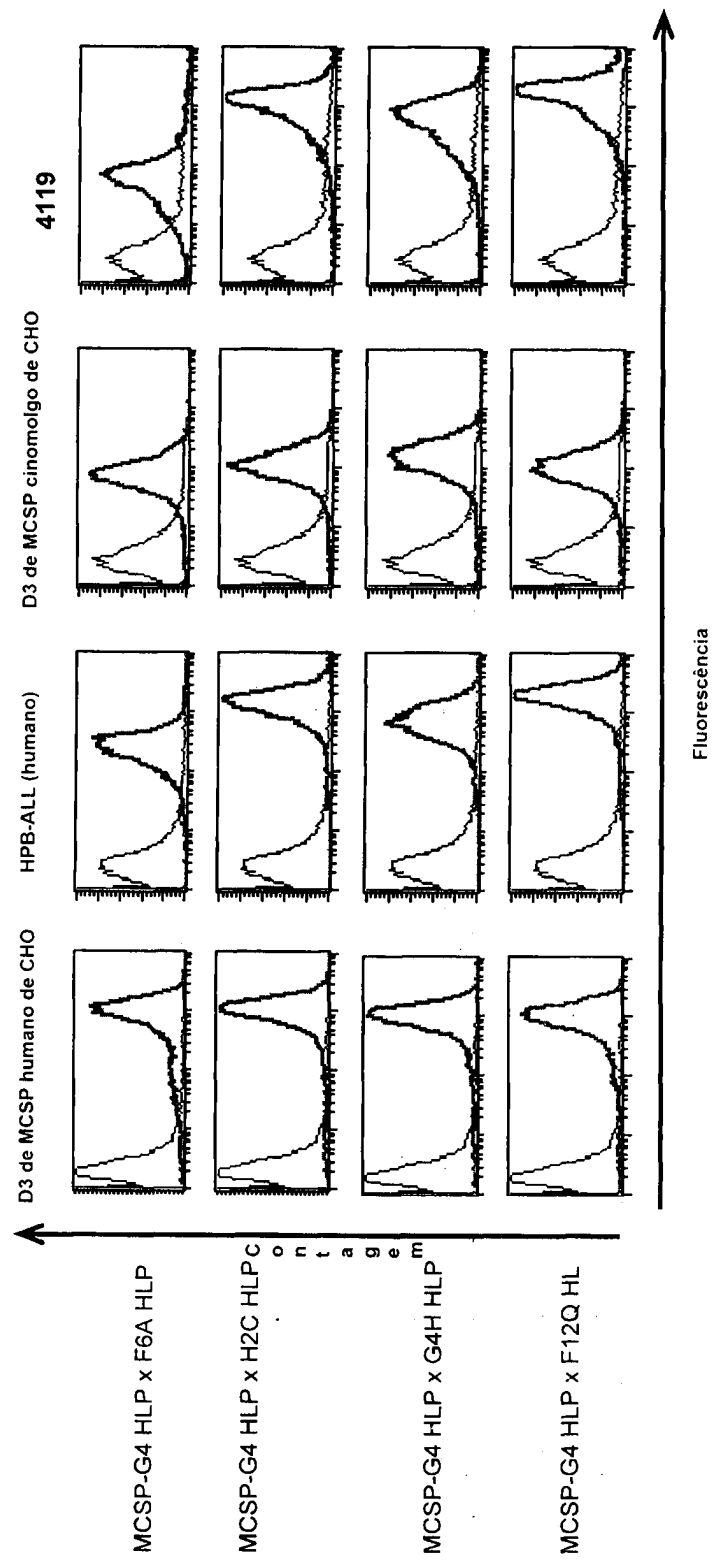


Figura 12

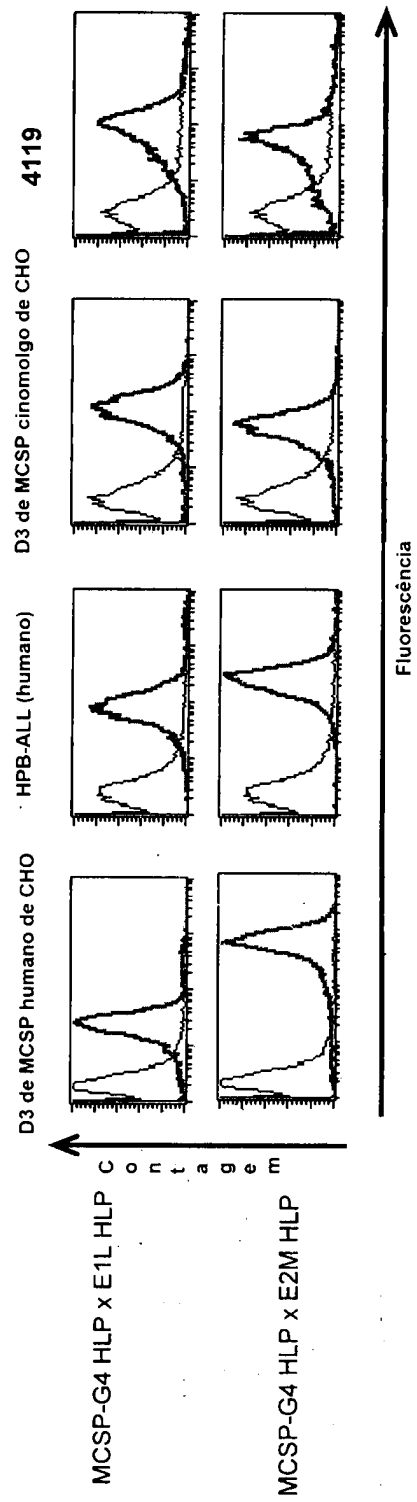
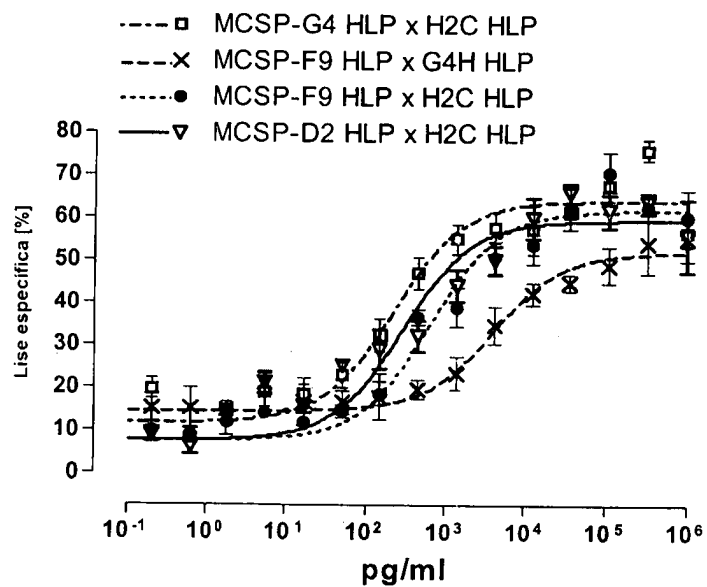


Figura 13

A)

Células efetoras: PBMC humano esgotado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP humano



B)

Células efetoras: 4119 LnPx de linhagem de célula T símia
Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP cinomolgo

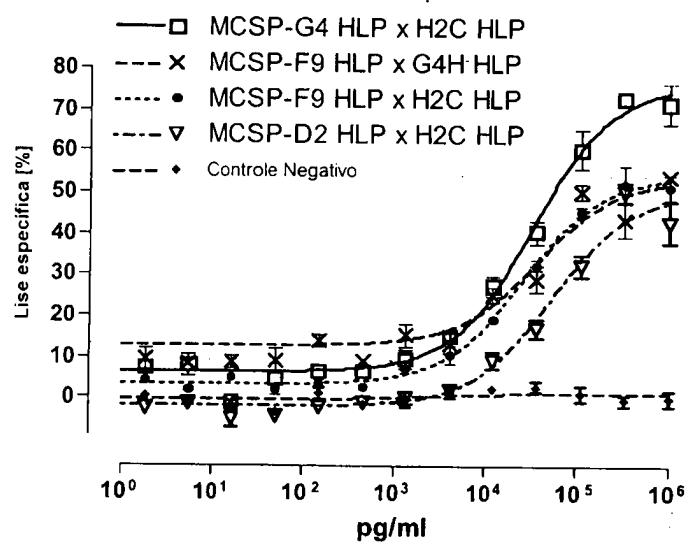
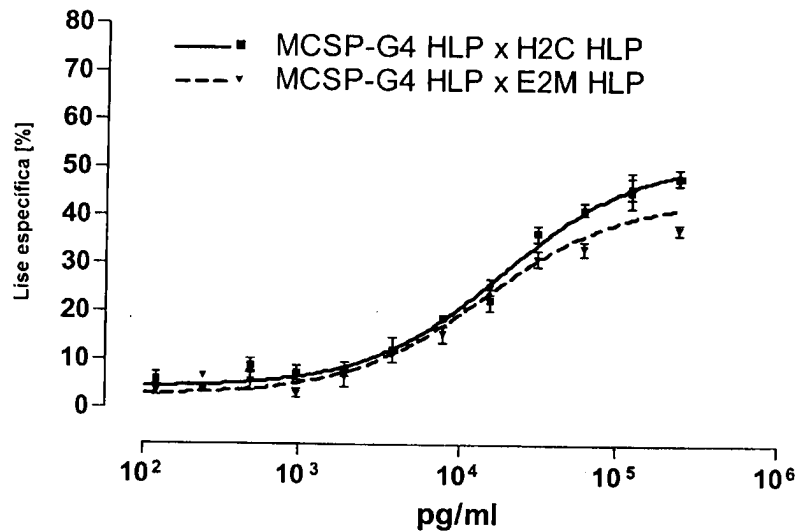


Figura 14

A)

Células efectoras: 4119 LnPx de linhagem de célula T símia
 Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP cinomolgo



B)

Células efectoras: 4119 LnPx de linhagem de célula T símia
 Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP cinomolgo

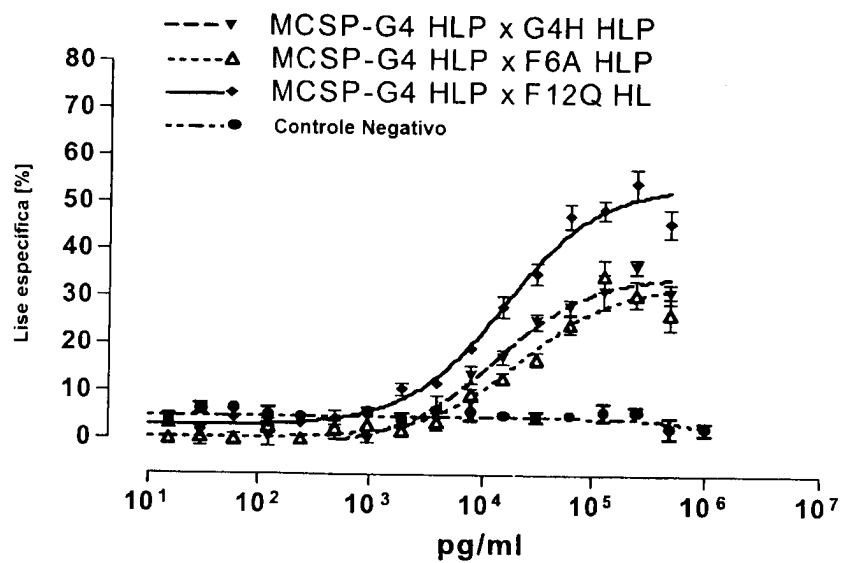
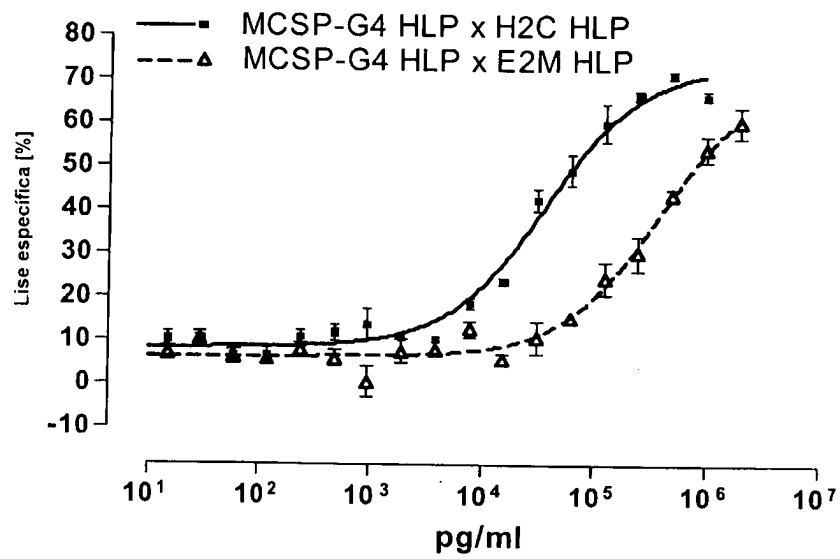


Figura 15

A)

Células efectoras: PBMC humano esgotado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP humano



B)

Células efectoras: PBMC humano esgotado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP humano

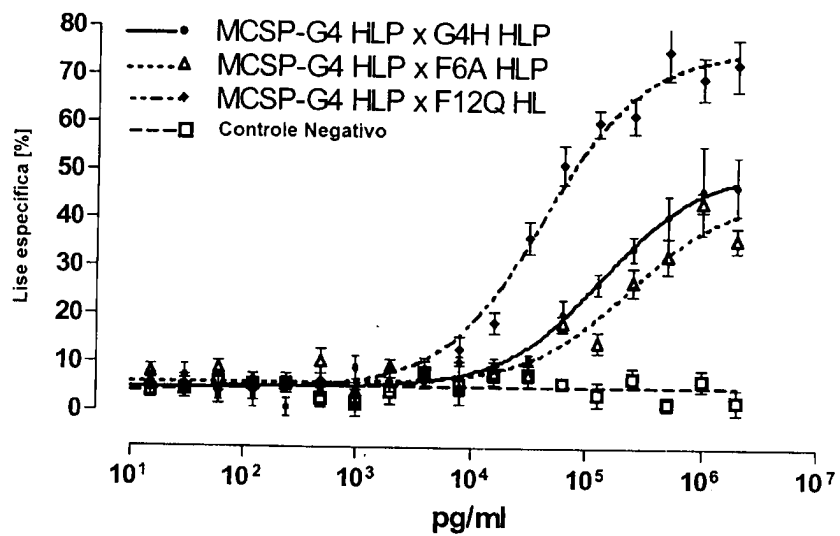
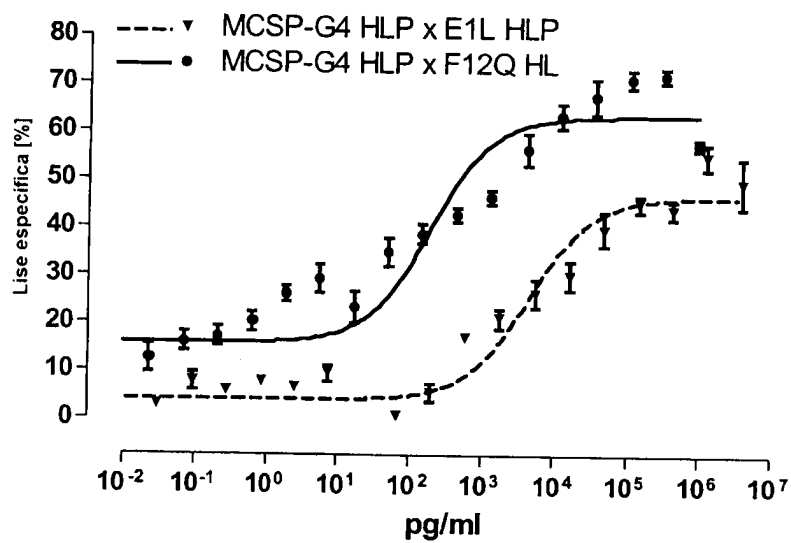


Figura 16

A)

Células efectoras: PBMC humano esgotado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx de linhagem de célula T simia
Células alvo: CHO transfectado com D de MCSP cinomolgo

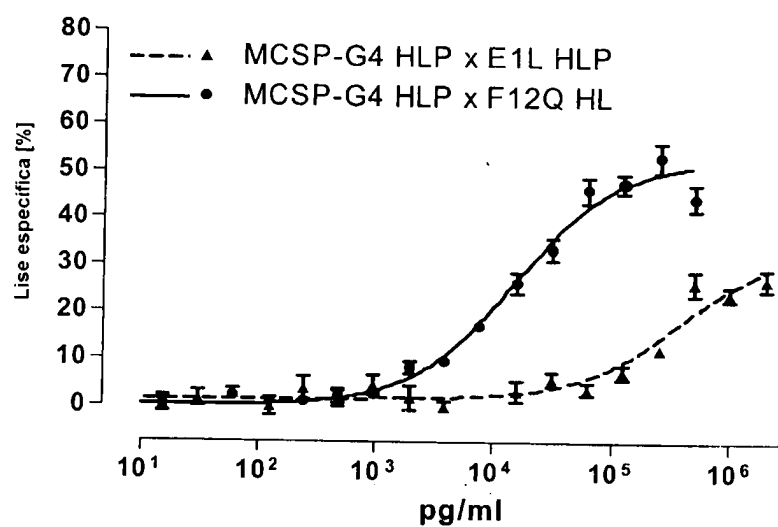
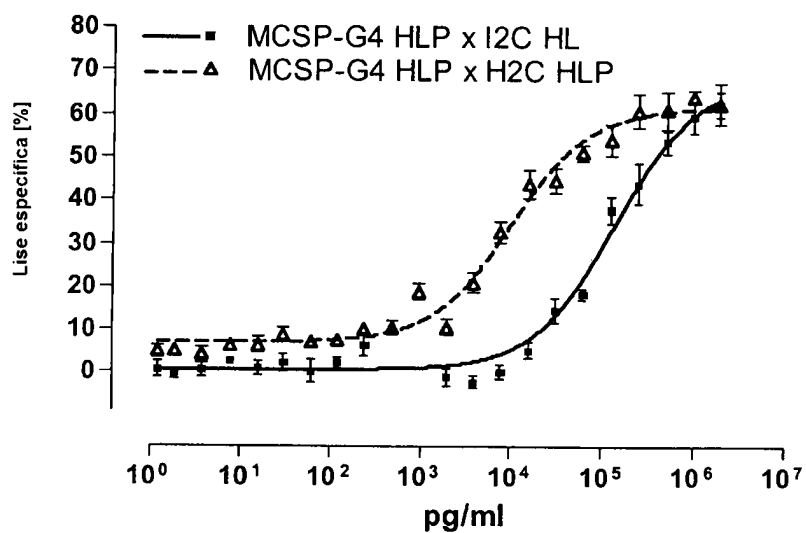


Figura 17

A)

Células efectoras: PBMC humano esgotado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com D3 de MCSP humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx de linhagem de célula T símia
Células alvo: CHO transfectado com D de MCSP cinomolgo

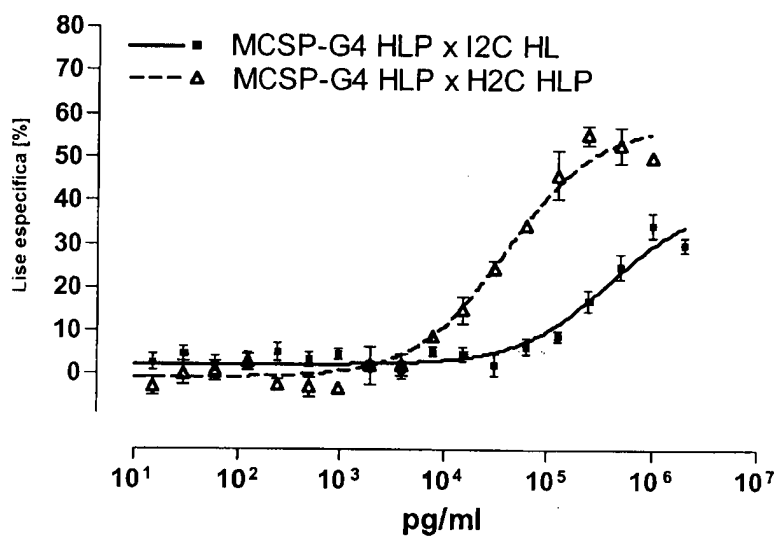


Figura 18(1)

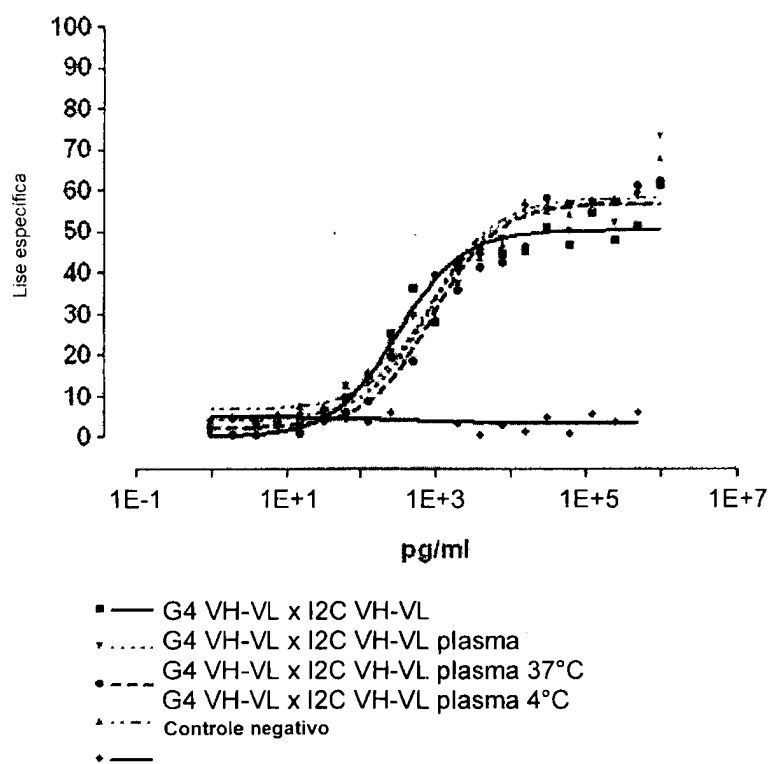


Figura 18(2)

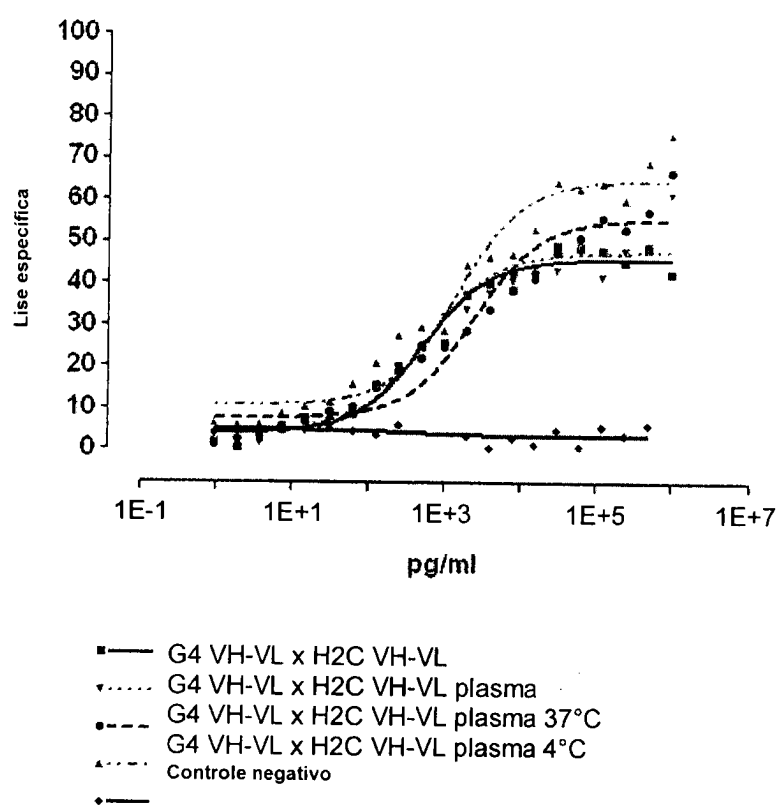


Figura 18(3)

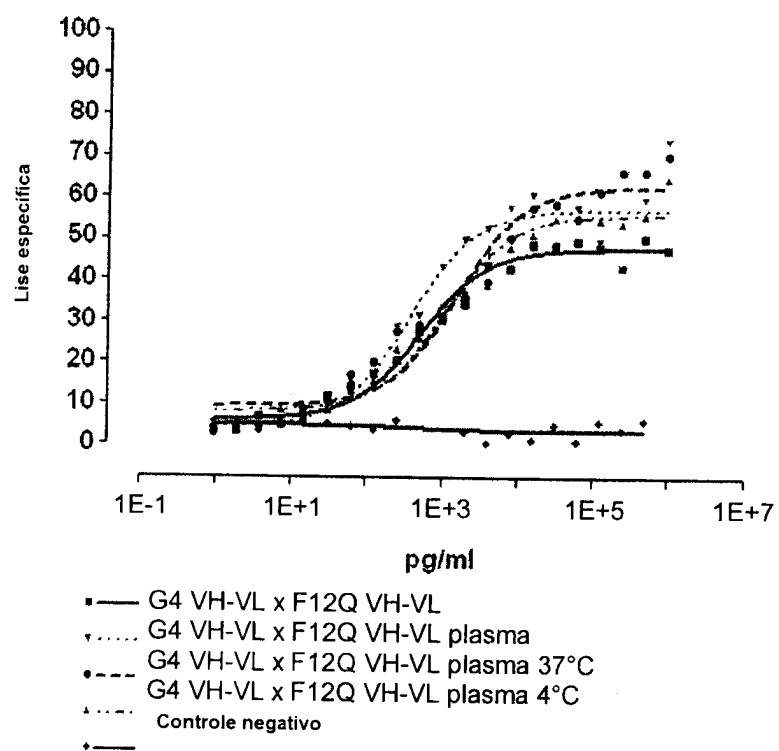


Figura 19a

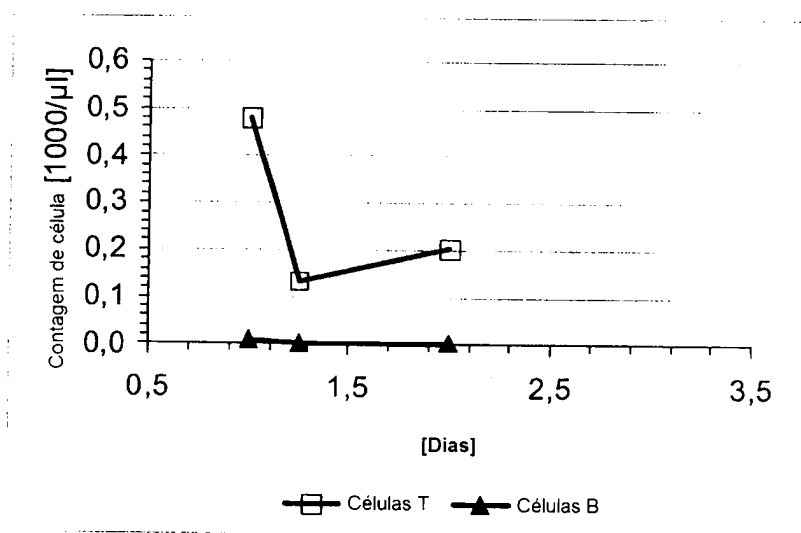
Pat. 1 ($0,5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 19b

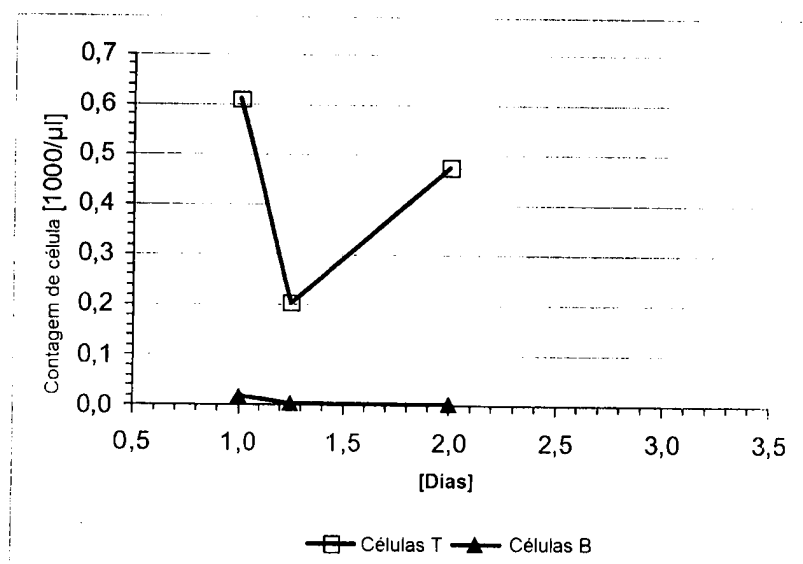
Pat. 7 ($1,5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 19c

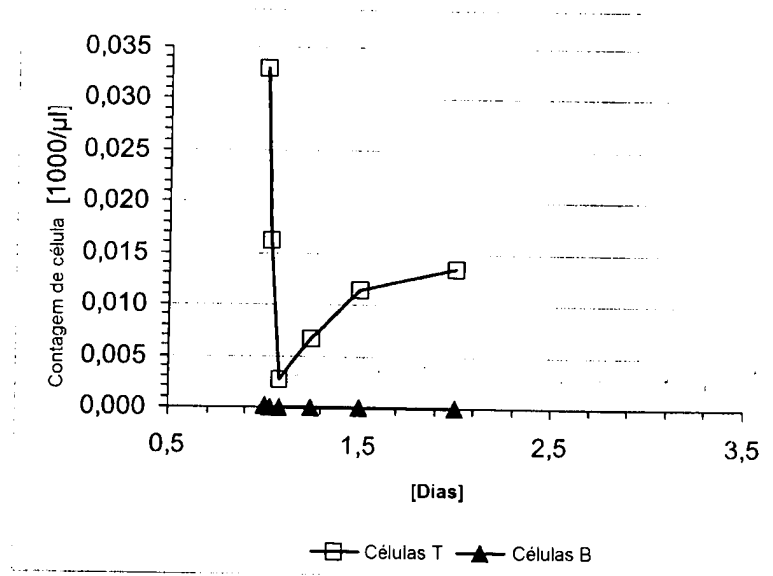
Pat. 23 ($15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 19d

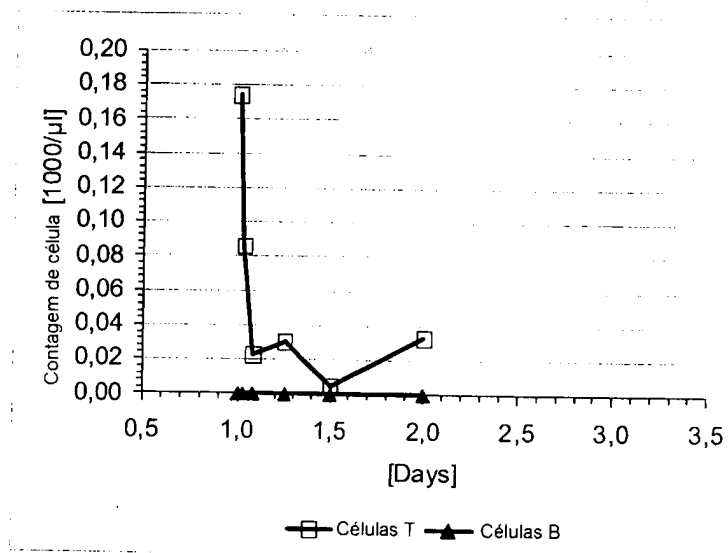
Pat. 30 ($30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 19e

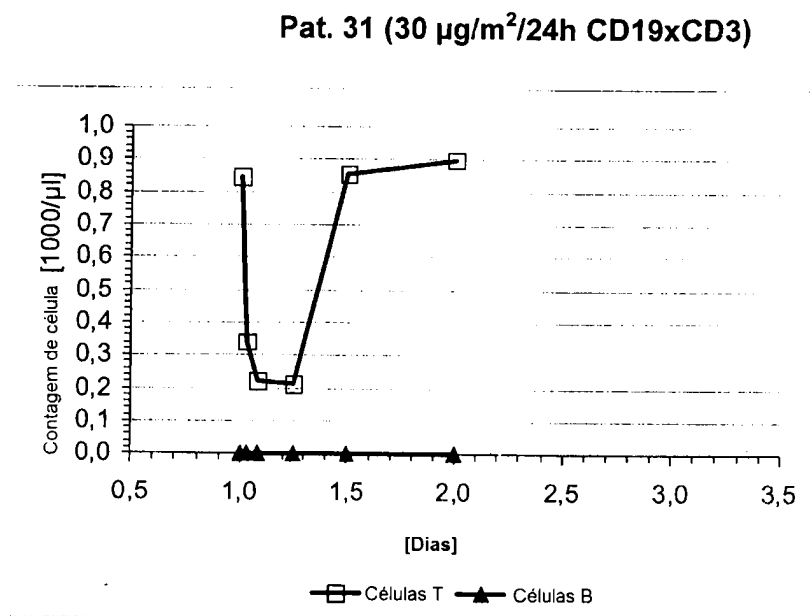


Figura 19f

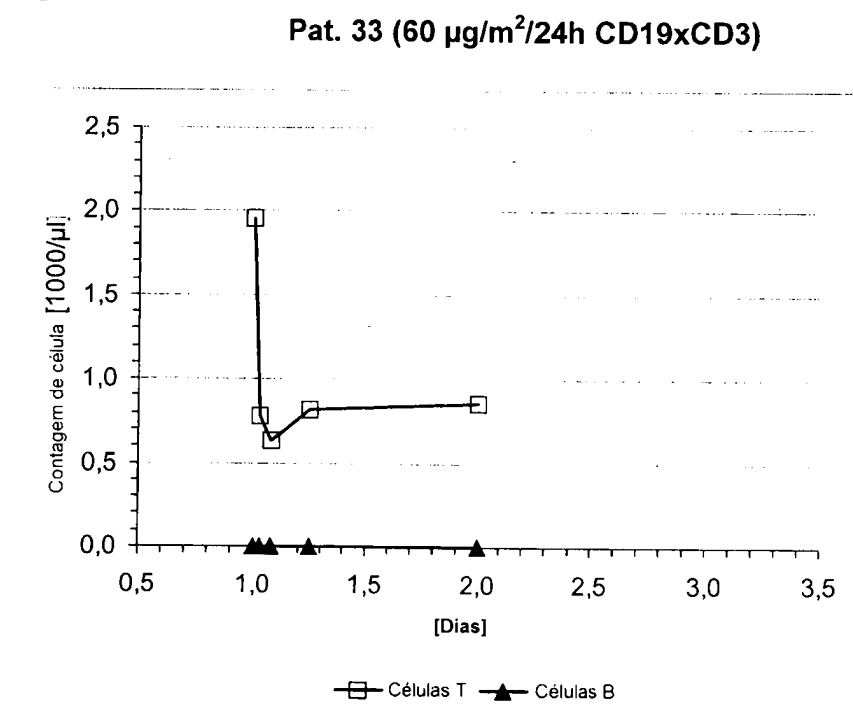
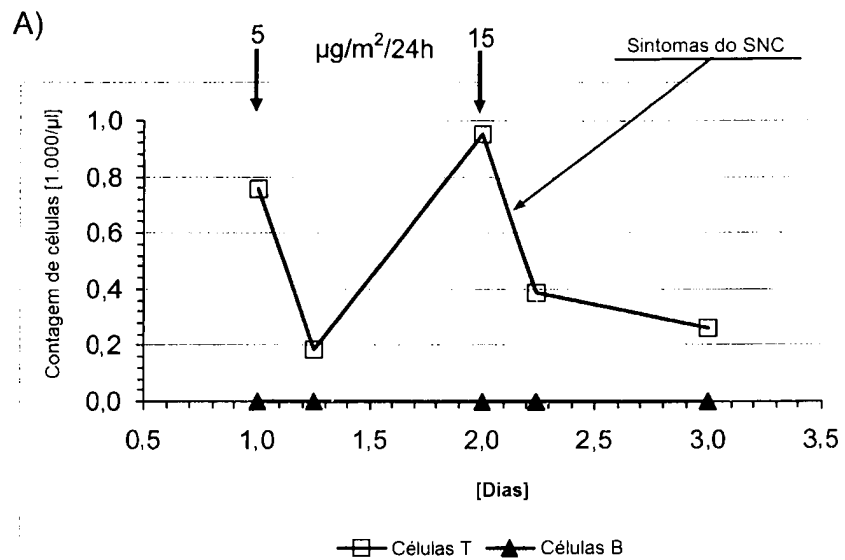
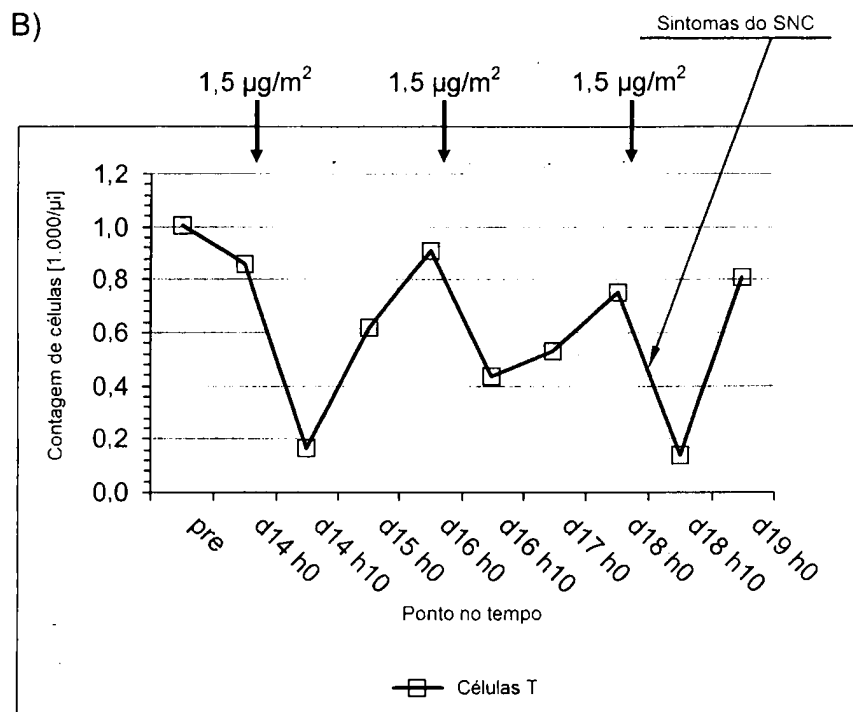


Figura 20



Pat. 19 (infusão contínua: 5 μ g/m²/24h por 1 dia, seguido pela manutenção de CD19xCD3 a 15 μ g/m²/24h)



Pat. 003002 (exame de infusão em bólus)

Figura 21

Pat. 20 ($15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)
Iniciação de rampa

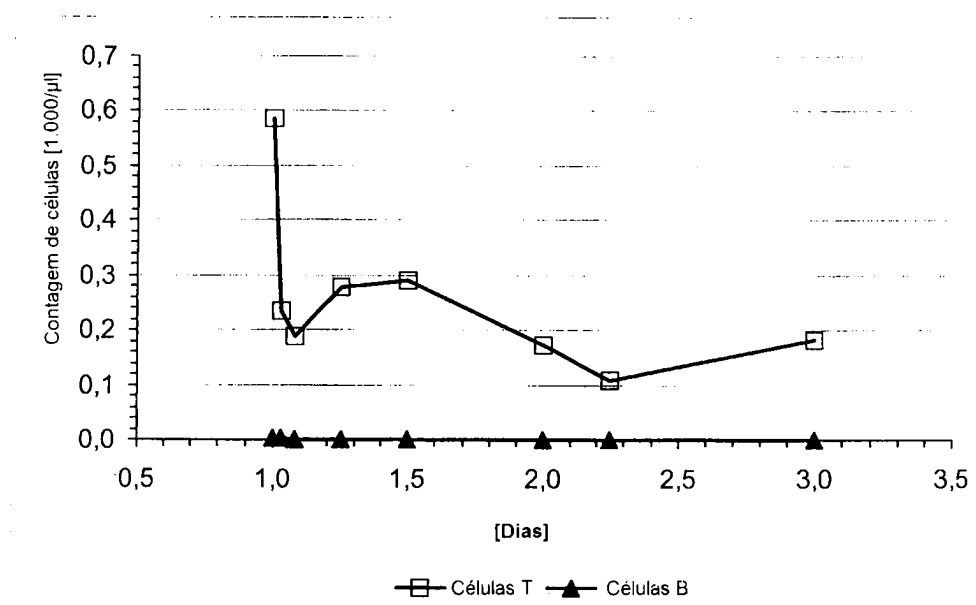


Figura 22

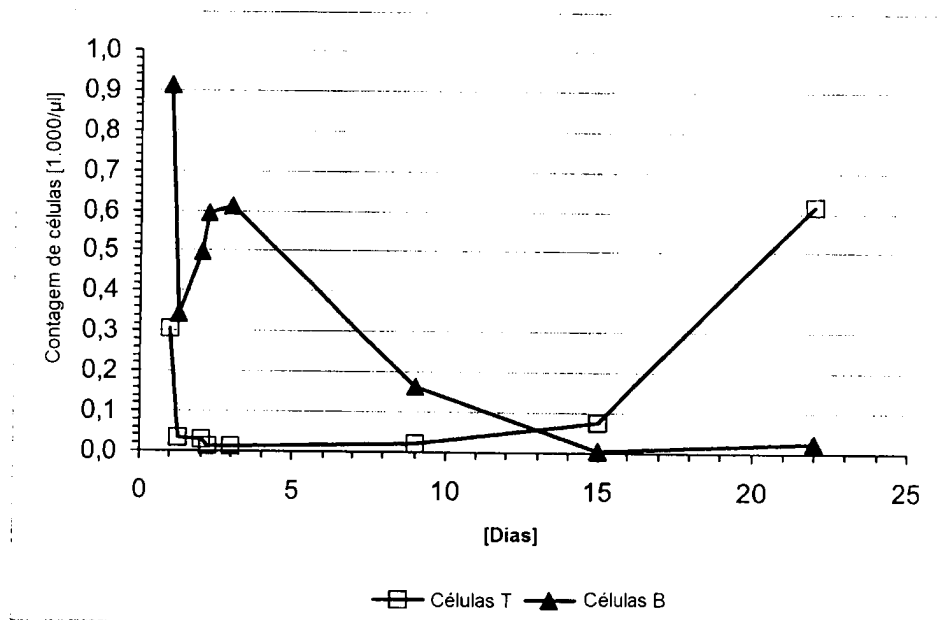
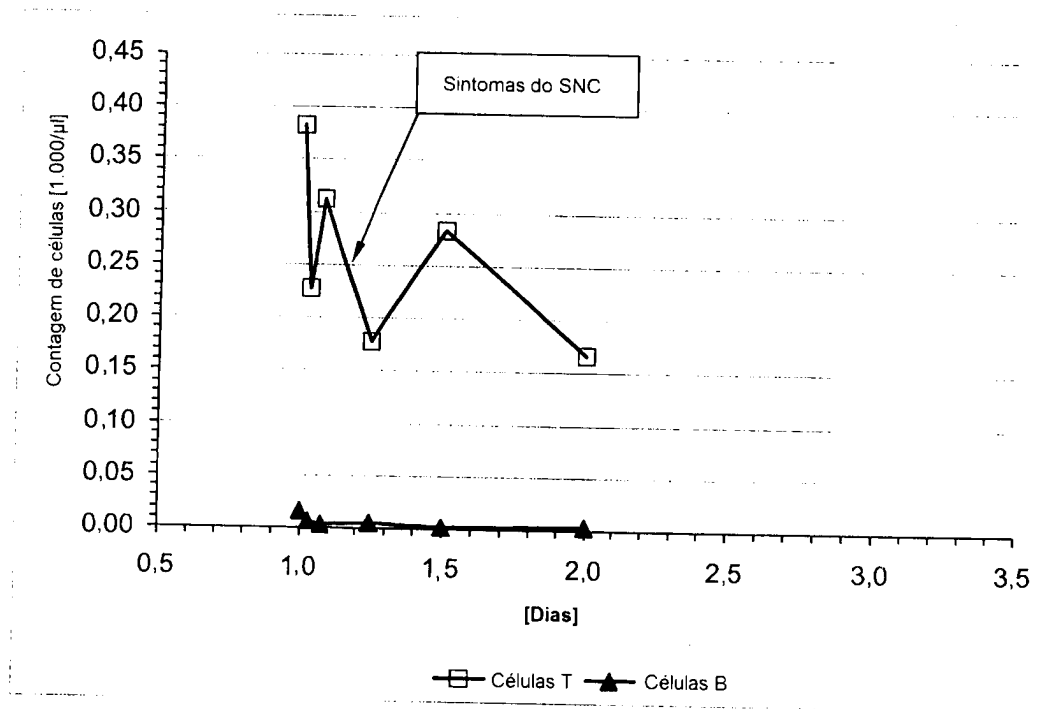
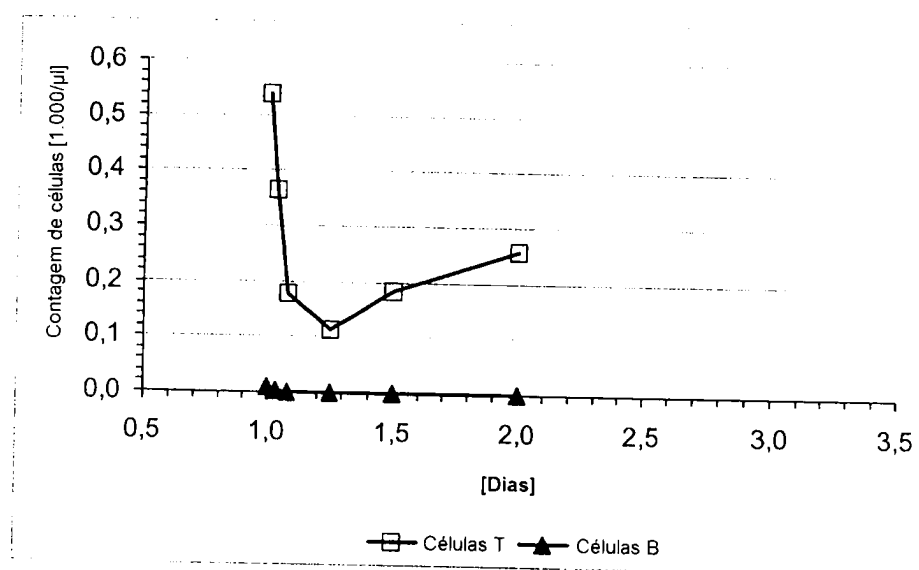
Pat. 13 ($15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 23

Pat. 24 (CD19xCD3 a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ sem HSA)
Início do 1º tratamento



Pat. 24 (CD19xCD3 a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ com HSA)
Início do 2º tratamento



Modelo de adesão de células T a células endoteliais induzidas por aglutinação monovalente a epítopos CD3 dependentes de contexto

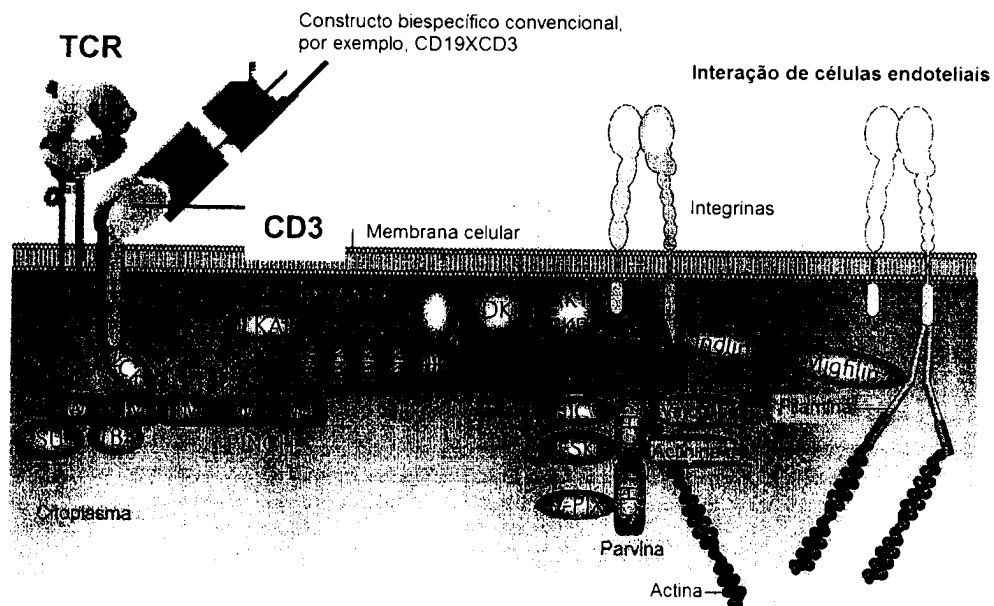


Figura 24

Figura 25

Atividade citotóxica do material de teste com cynomolgus
CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL

Células-alvo: CHO CD33 cino; células efectoras: 4119 LnPx com
razão E:T de 10:1; duração do ensaio: 18 h

EC50: 2,7 ng/ml

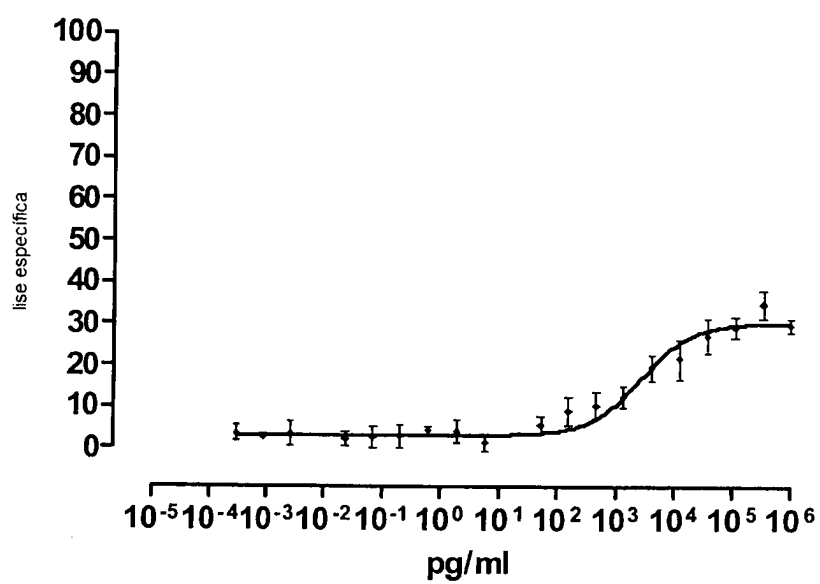


Figura 26A

Depleção dependente de dose e tempo de monócitos CD33 do sangue via
CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL

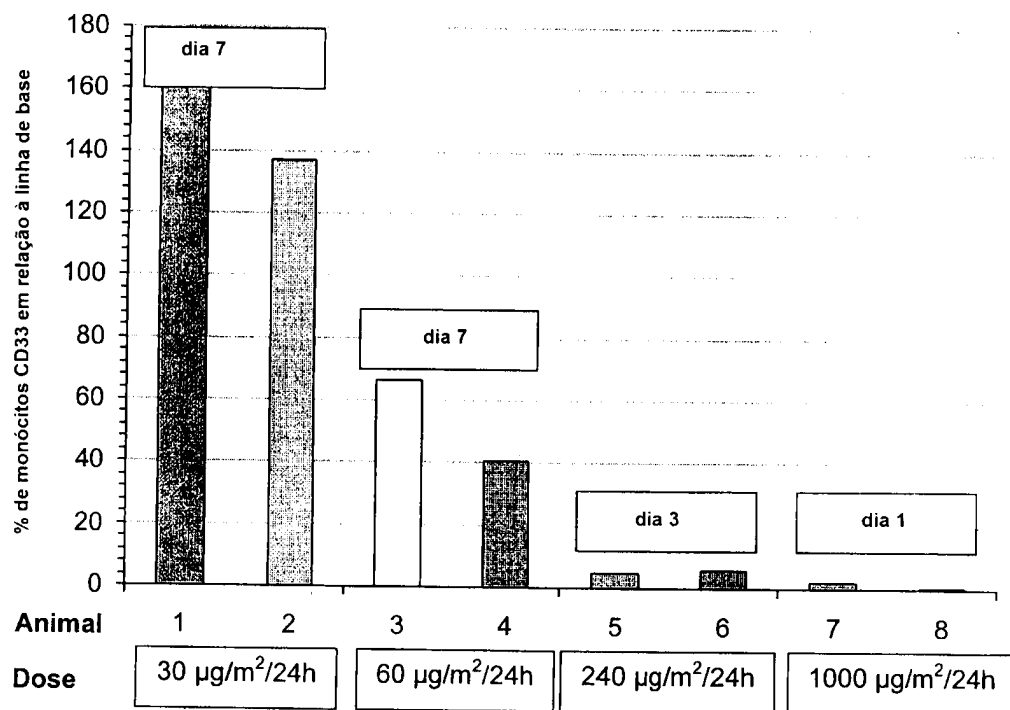


Figura 26B (1)

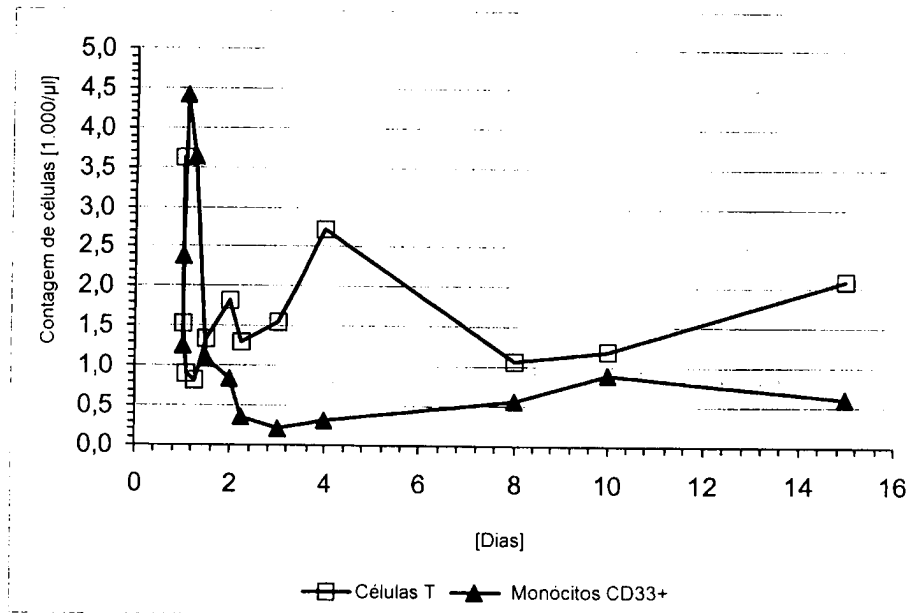
Animal 9 ($120 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD33xCD3)

Figura 26B (2)

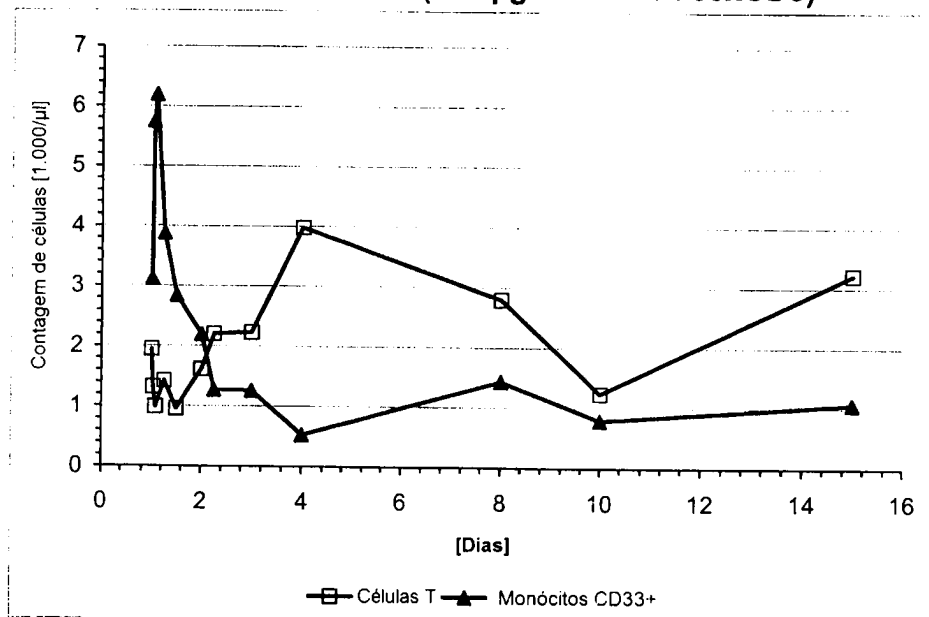
Animal 10 ($120 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD33xCD3)

Figura 27

Atividade citotóxica do material de teste com cynomolgus

MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL

Células-alvo: CHO MCSP cino; células efectoras: 4119 LnPx
com razão E:T de 10:1; duração do ensaio: 18 h

EC50: 1,9 ng/ml

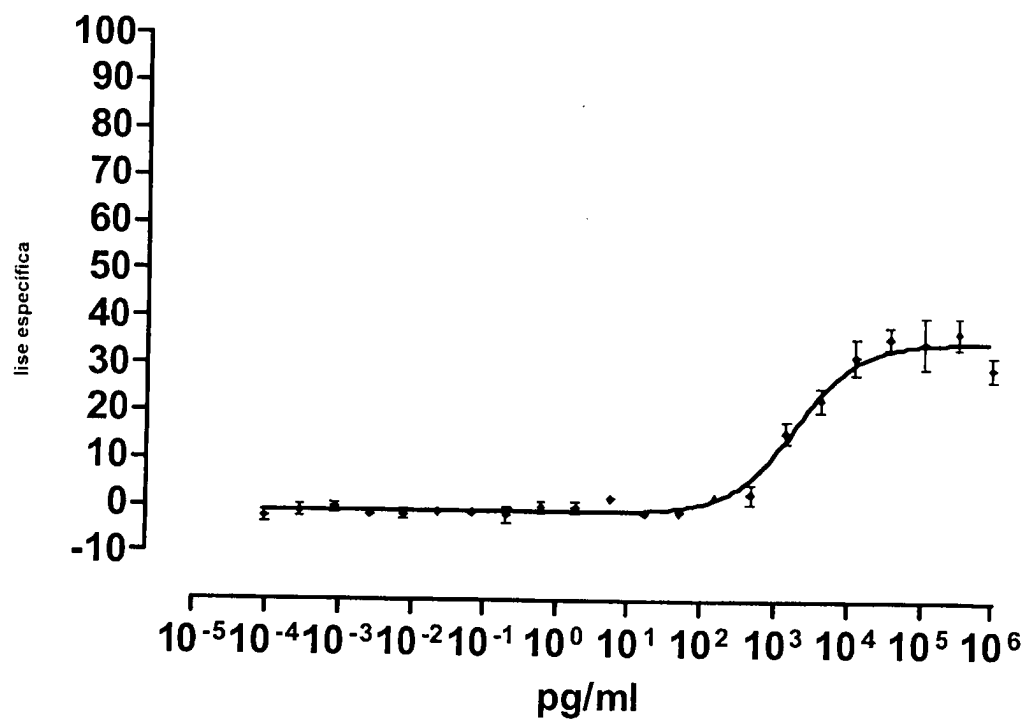


Figura 28 (1)

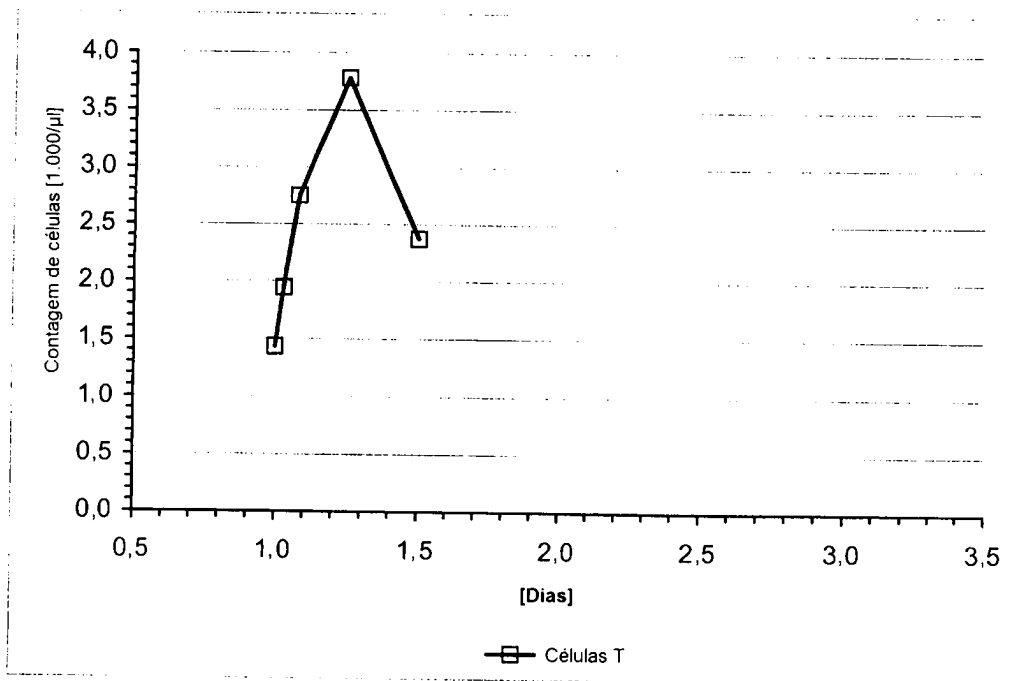
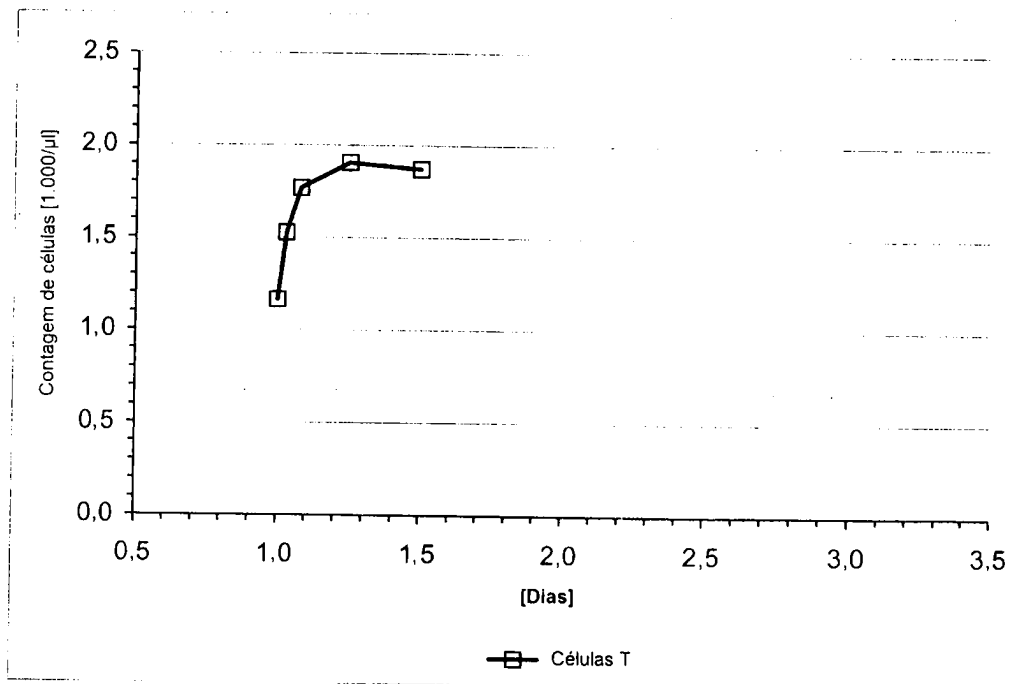
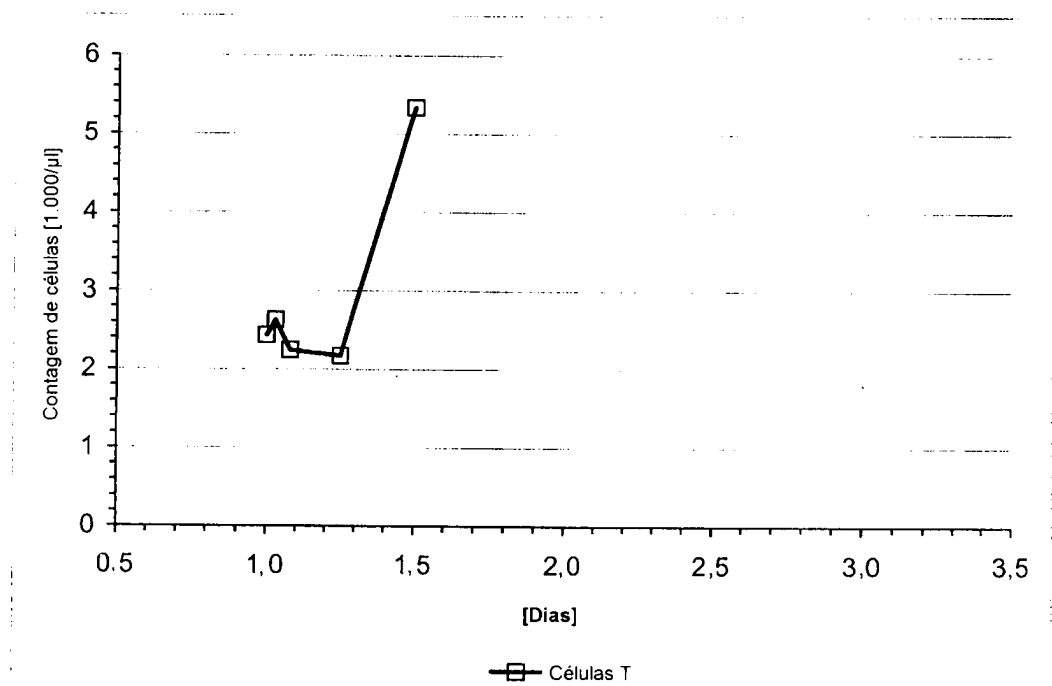
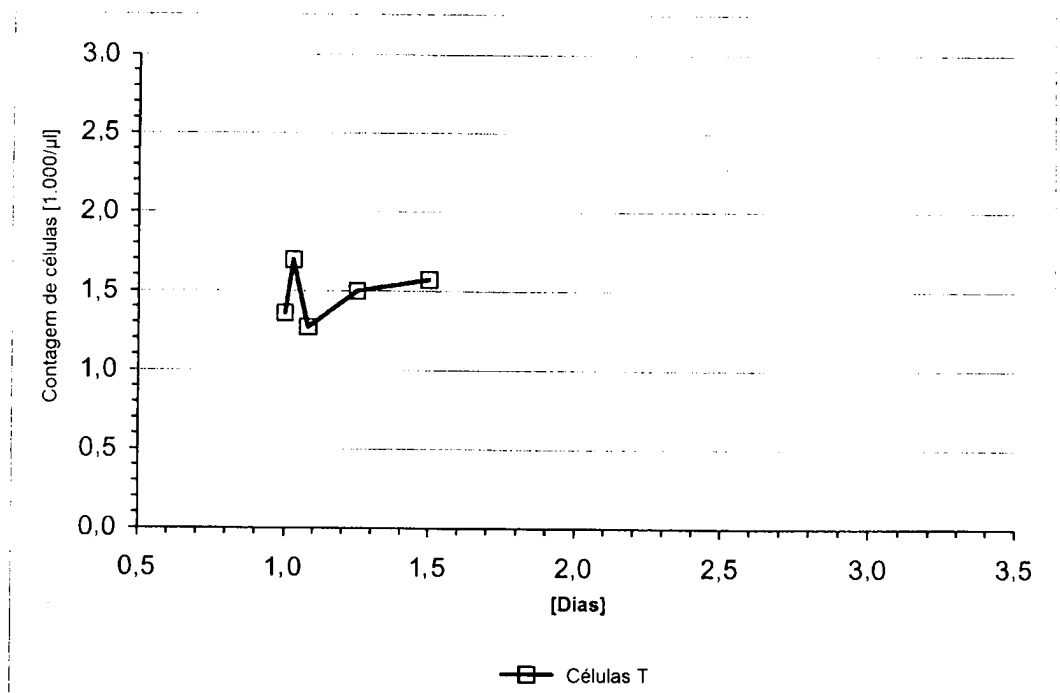
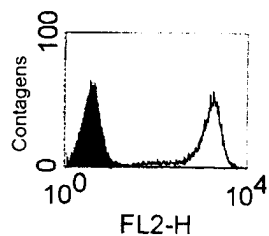
Animal 1 (60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)**Animal 2 (240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)**

Figura 28 (2)

Animal 3 (240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)**Animal 4 (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)**

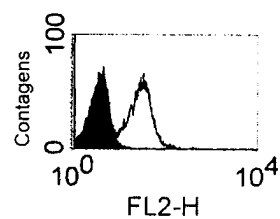
CHO transfectadas com CD33 humano

AH11HLxF12QHL



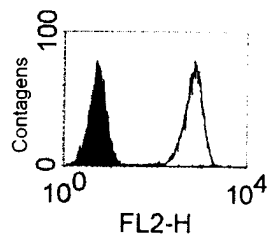
HPB-ALL

AH11HLxF12QHL



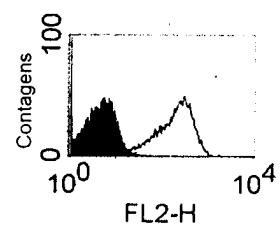
CHO transfectadas com CD33 símio

AH11HLxF12QHL



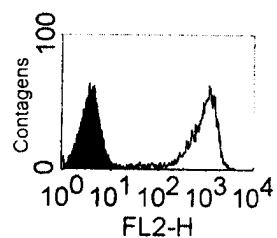
PBMC símio

AH11HLxF12QHL



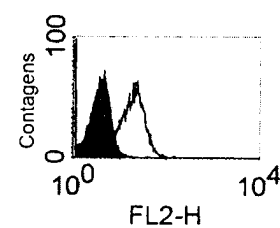
CHO transfectadas com CD33 humano

AH11HLxH2CHL



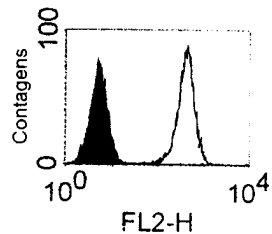
HPB-ALL

AH11HLxH2CHL



CHO transfectadas com CD33 símio

AH11HLxH2CHL



PBMC símio

AH11HLxH2CHL

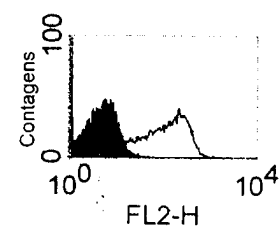


Figura 29 (1)

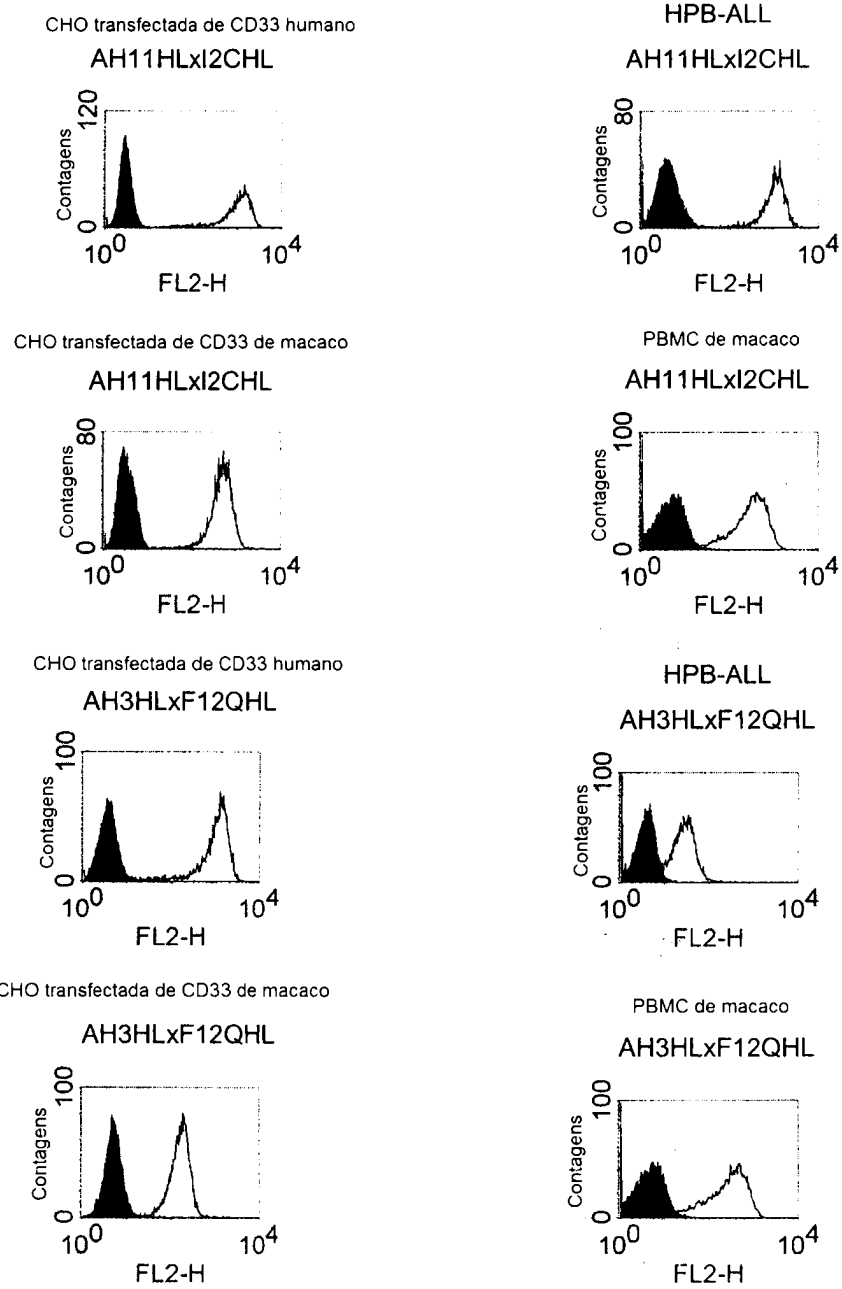


Figura 29 (2)

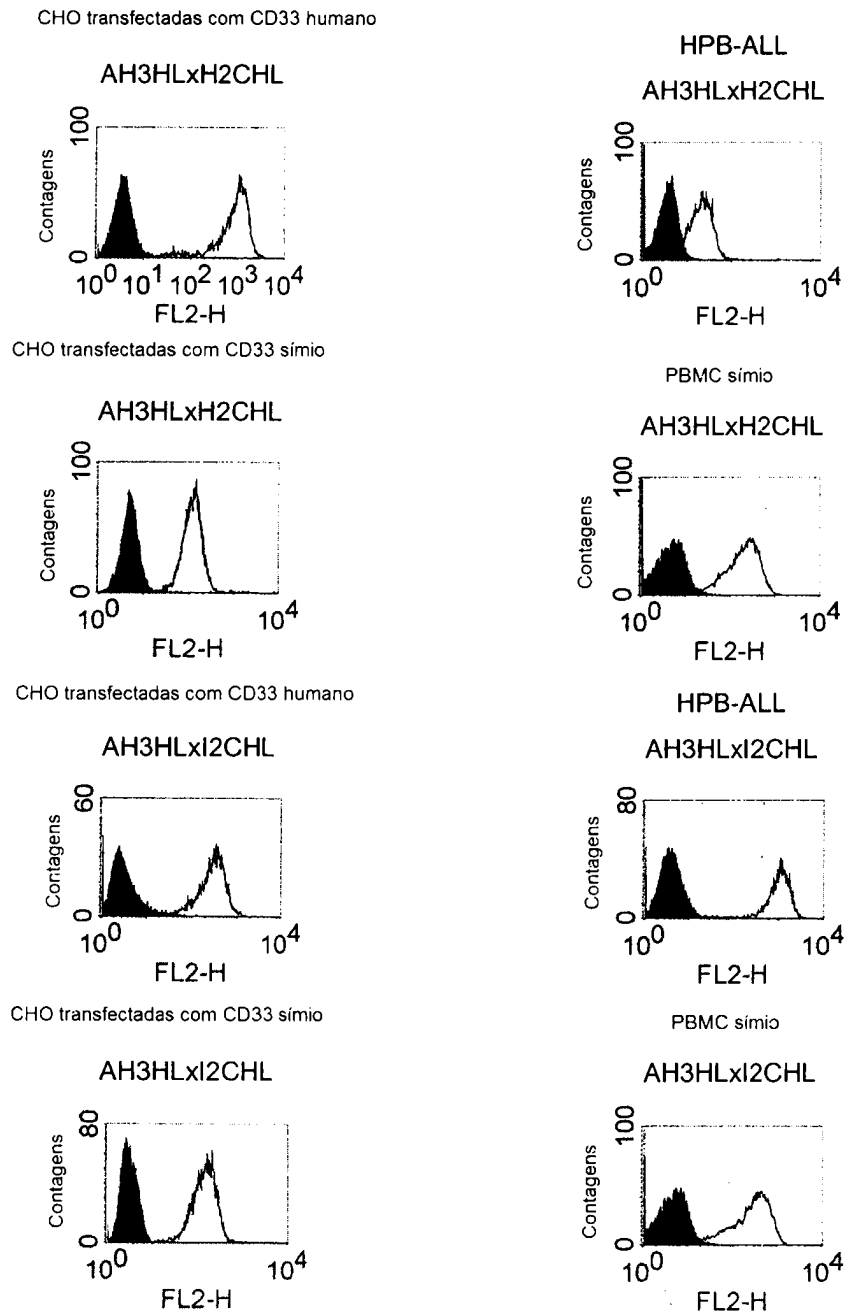
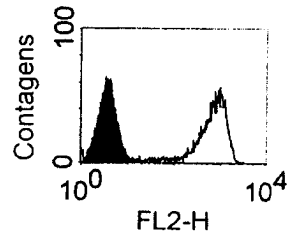


Figura 29 (3)

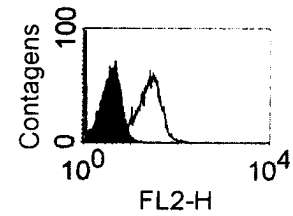
CHO transfectada de CD33 humano

AC8HLxF12QHL



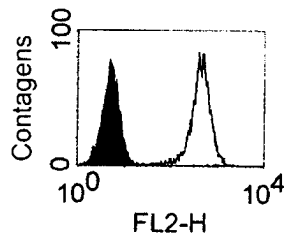
HPB-ALL

AC8HLxF12QHL



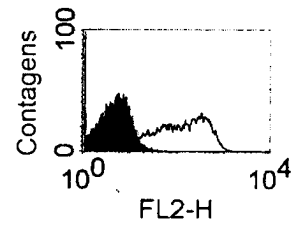
CHO transfectada de CD33 de macaco

AC8HLxF12QHL



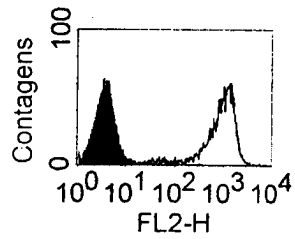
PBMC de macaco

AC8HLxF12QHL



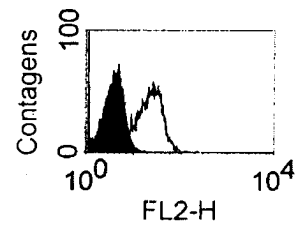
CHO transfectada de CD33 humano

AC8HLxH2CHL



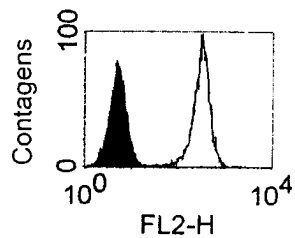
HPB-ALL

AC8HLxH2CHL



CHO transfectada de CD33 de macaco

AC8HLxH2CHL



PBMC de macaco

AC8HLxH2CHL

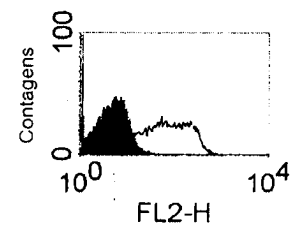


Figura 29 (4)

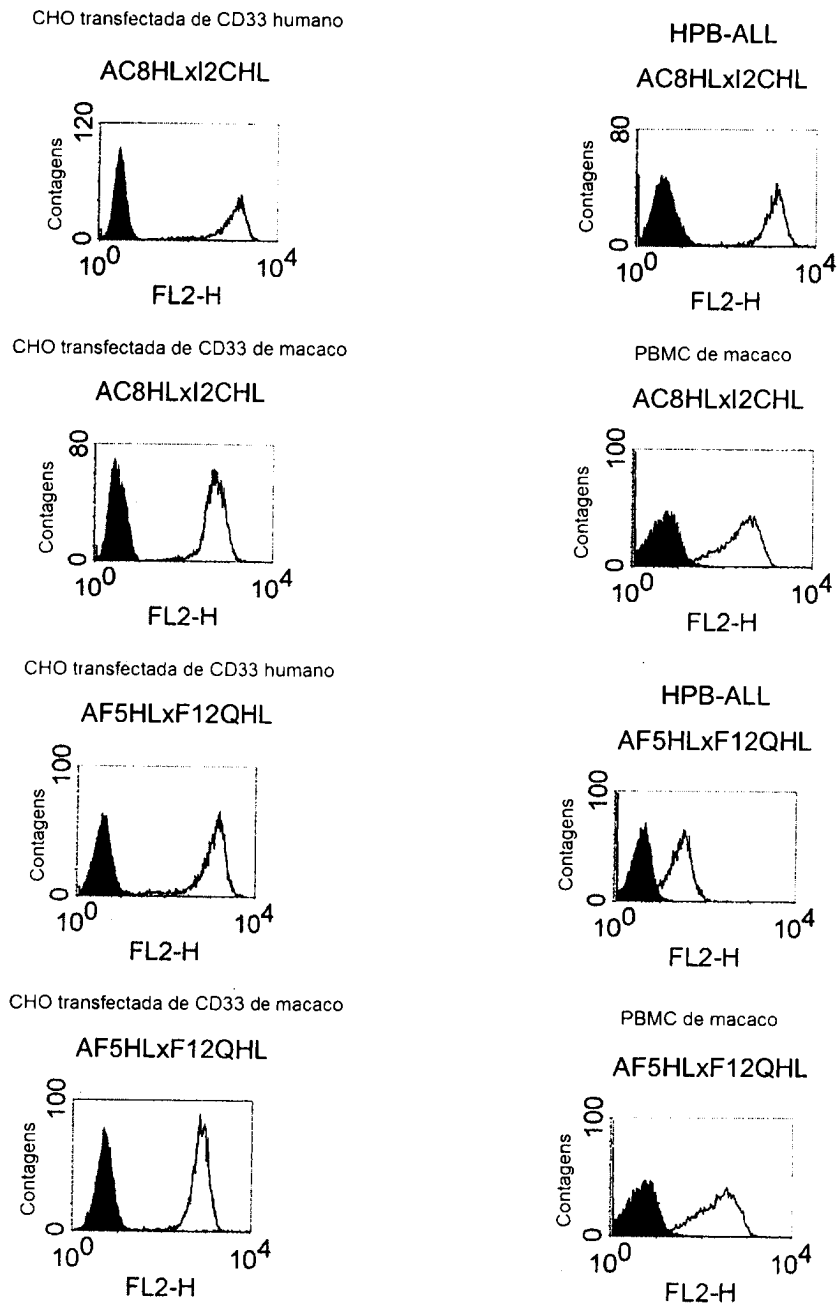
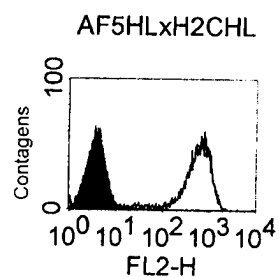
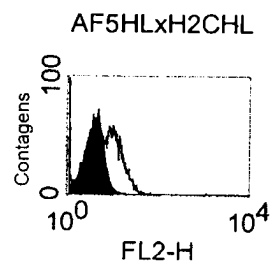


Figura 29 (5)

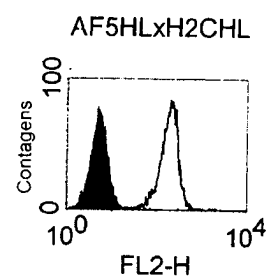
CHO transfectada de CD33 humano



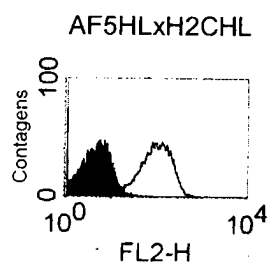
HPB-ALL



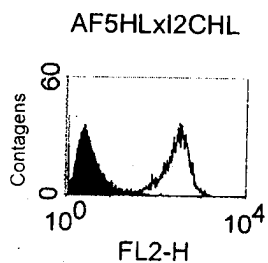
CHO transfectada de CD33 de macaco



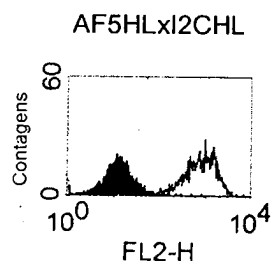
PBMC de macaco



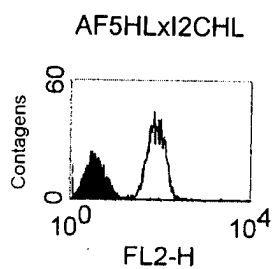
CHO transfectada de CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectada de CD33 de macaco



PBMC de macaco

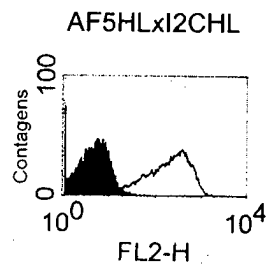
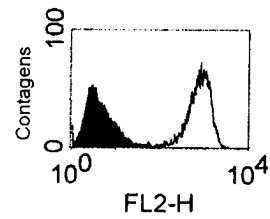


Figura 26 (6)

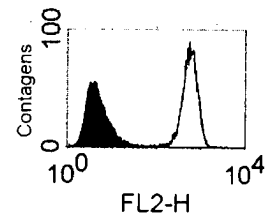
CHO transfectada de CD33 humano

B10HLxF12QHL



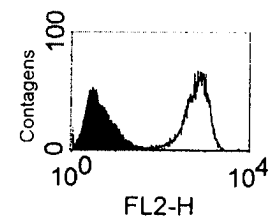
CHO transfectada de CD33 de macaco

B10HLxF12QHL



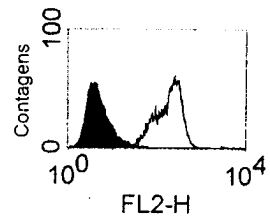
CHO transfectada de CD33 humano

B10HLxH2CHL



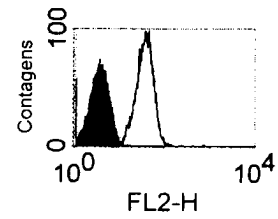
CHO transfectada de CD33 de macaco

B10HLxH2CHL



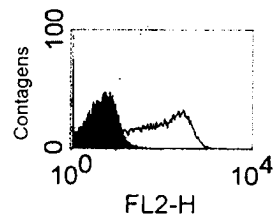
HPB-ALL

B10HLxF12QHL



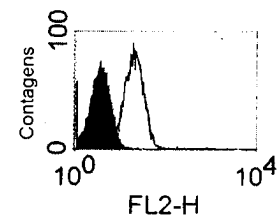
PBMC de macaco

B10HLxF12QHL



HPB-ALL

B10HLxH2CHL



PBMC de macaco

B10HLxH2CHL

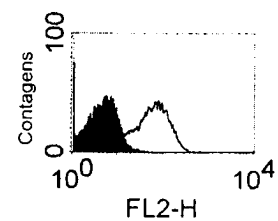


Figura 29 (7)

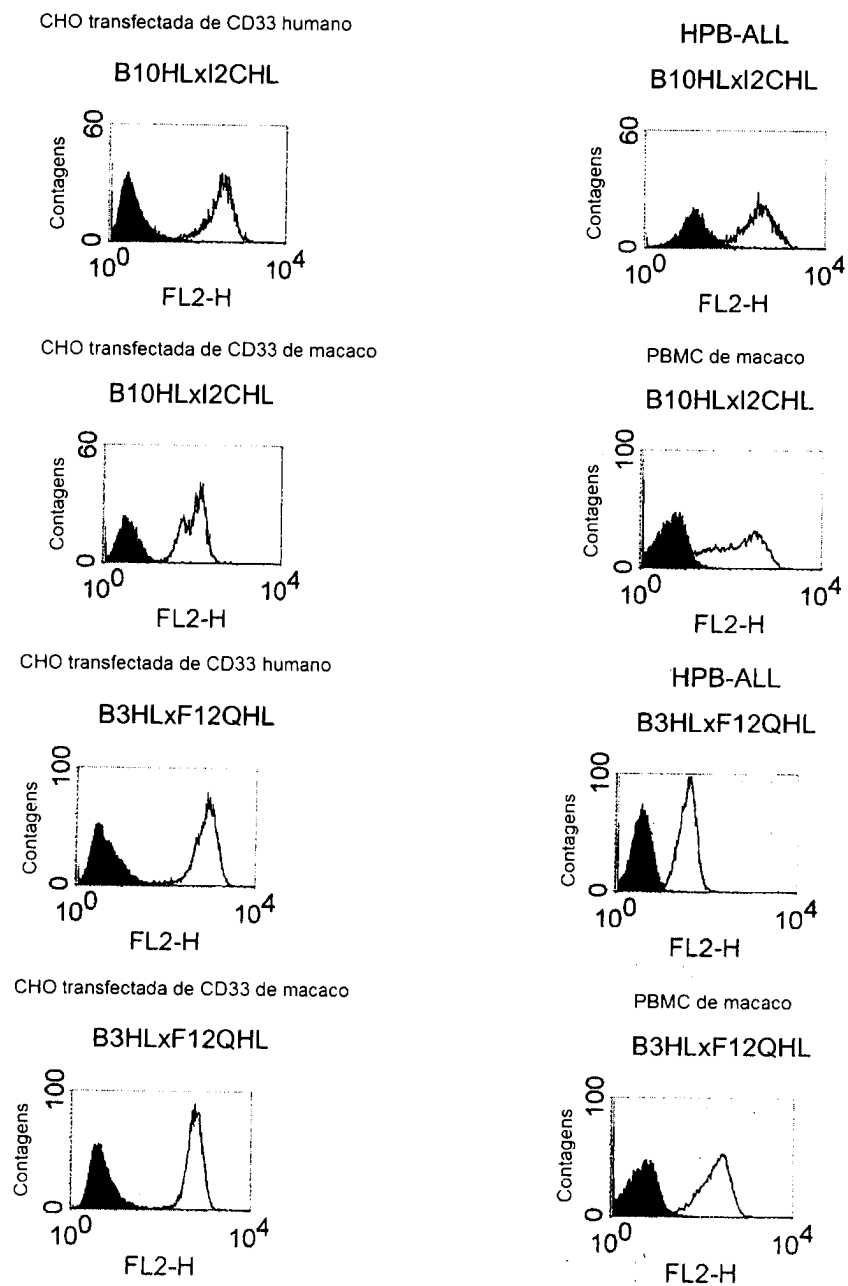


Figura 29 (8)

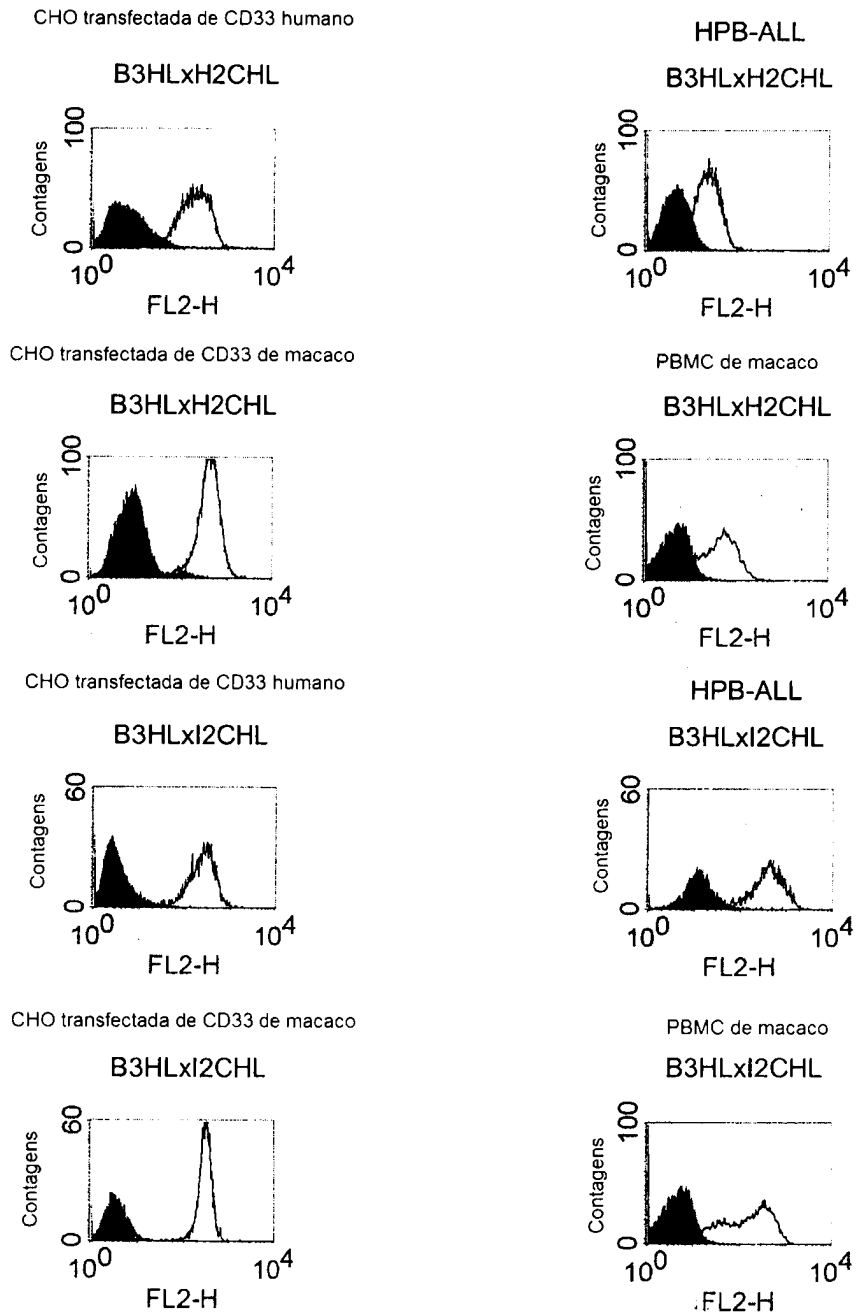


Figura 29 (9)

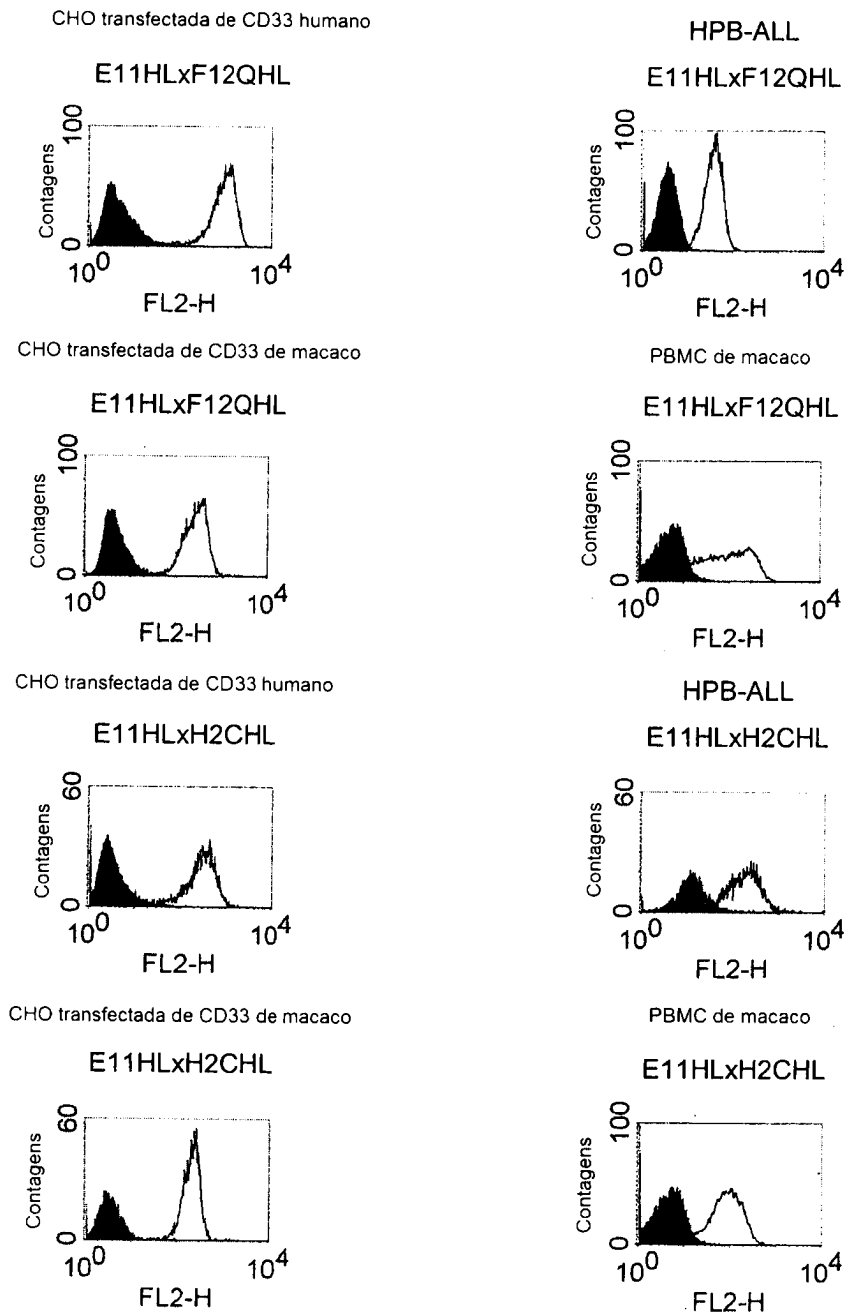


Figura 29 (10)

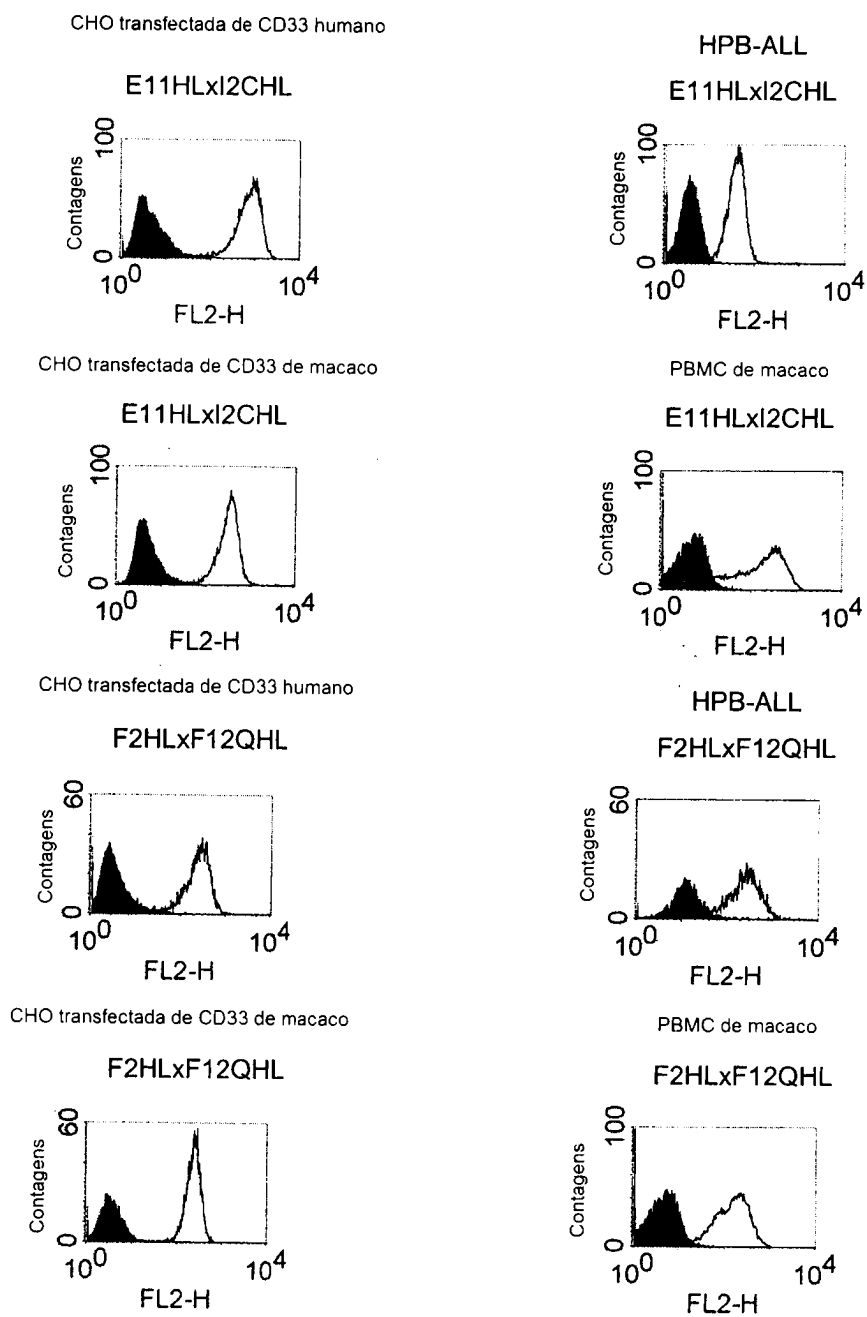


Figura 29 (11)

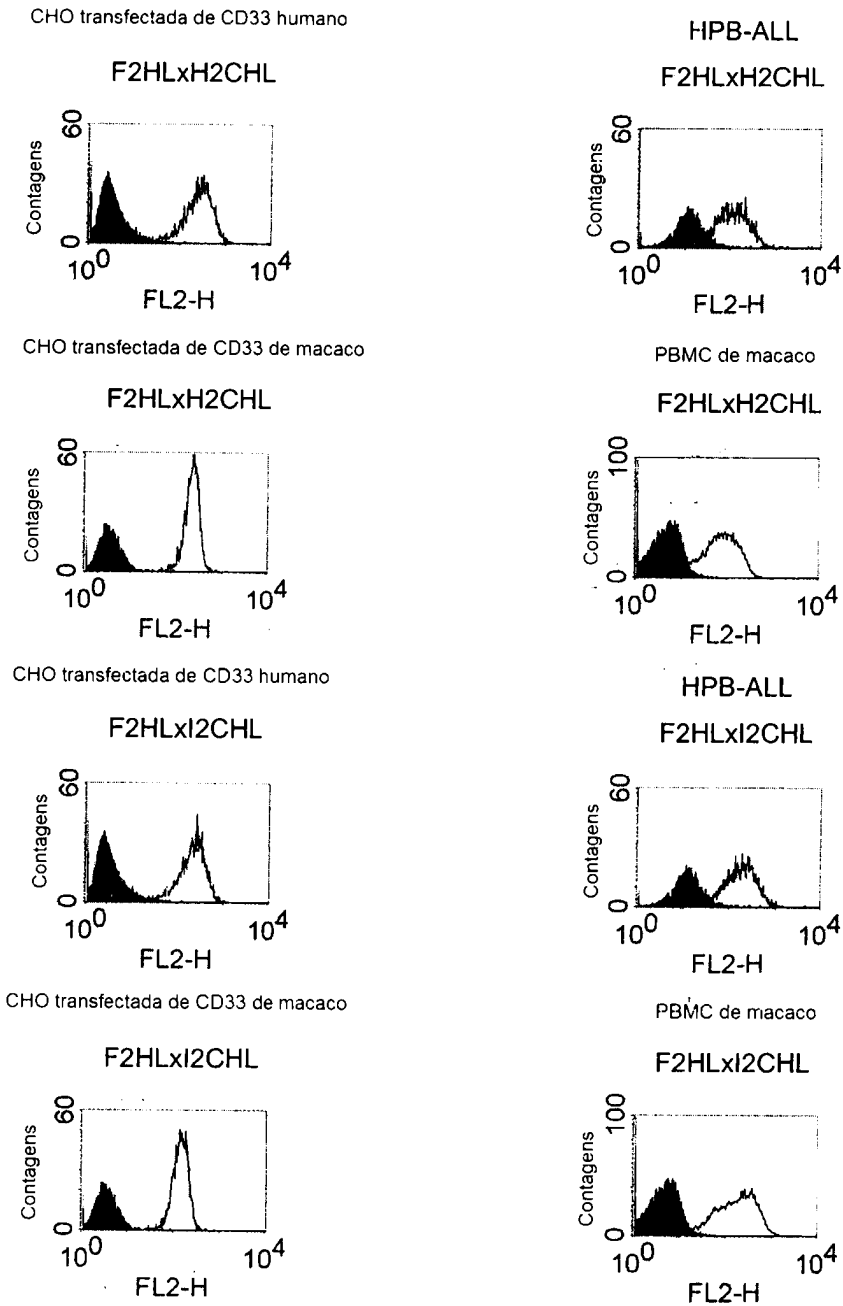
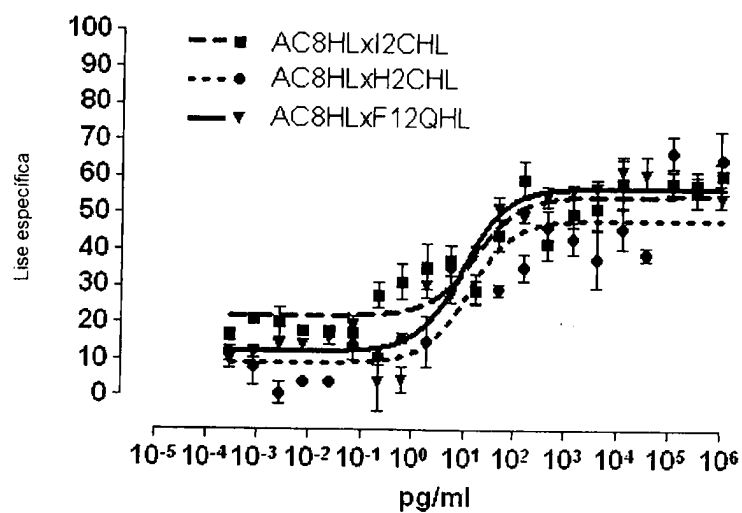


Figura 29 (12)

Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: Simio 4119 LnPx
 Células alvo: CHO transfectadas com CD33 de simio

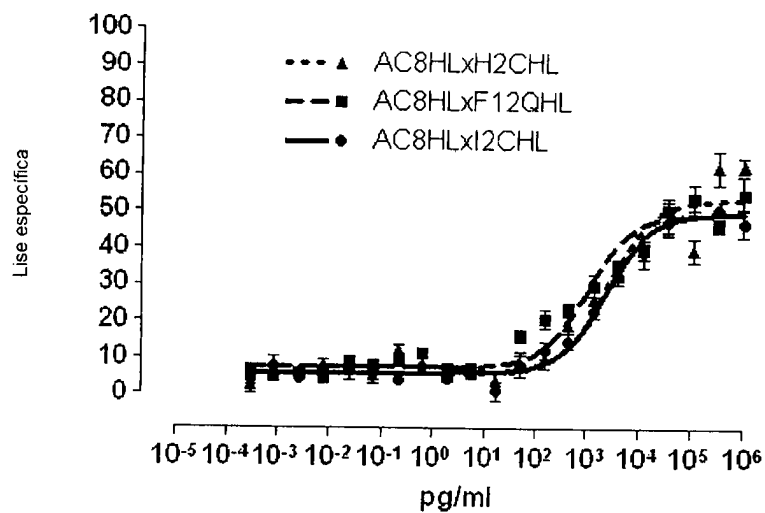
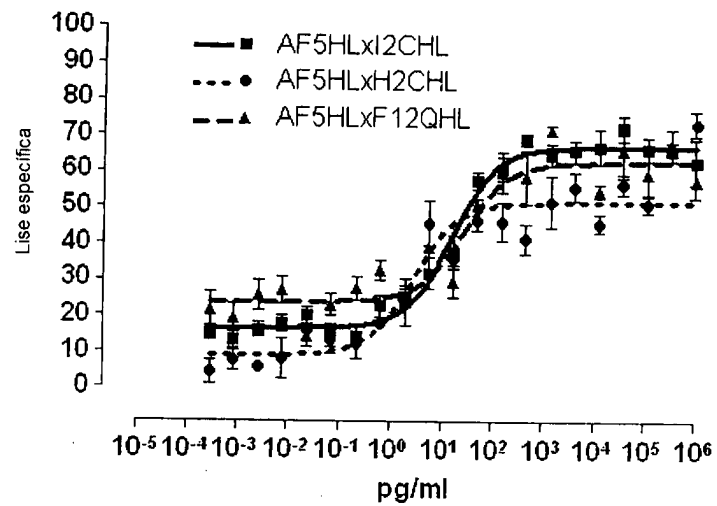


Figura 30 (1)

Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: Simio 4119 LnPx
 Células alvo: CHO transfectadas con CD33 de simio

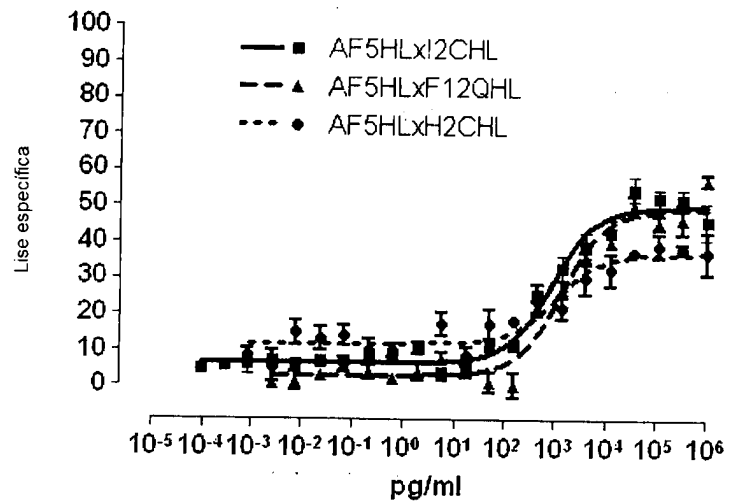
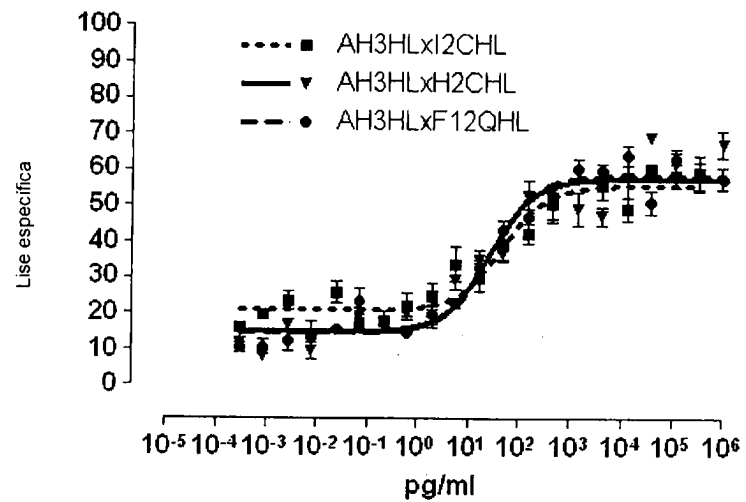


Figura 30 (2)

Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: Simio 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectadas com CD33 de simio

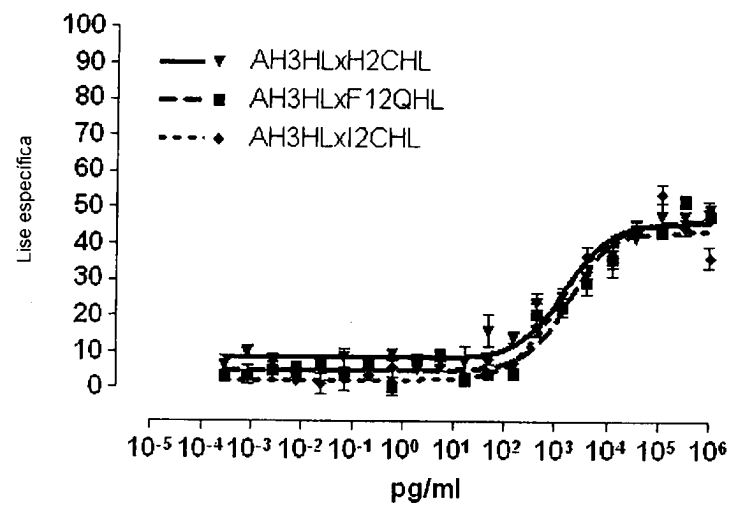
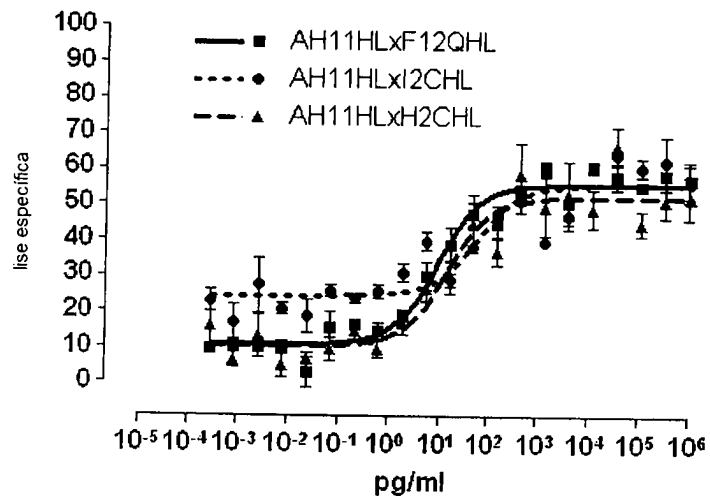


Figura 30 (3)

Células efectoras: PBMC humano depletado CD4/CD56 estimuladas
 Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
 Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 simio

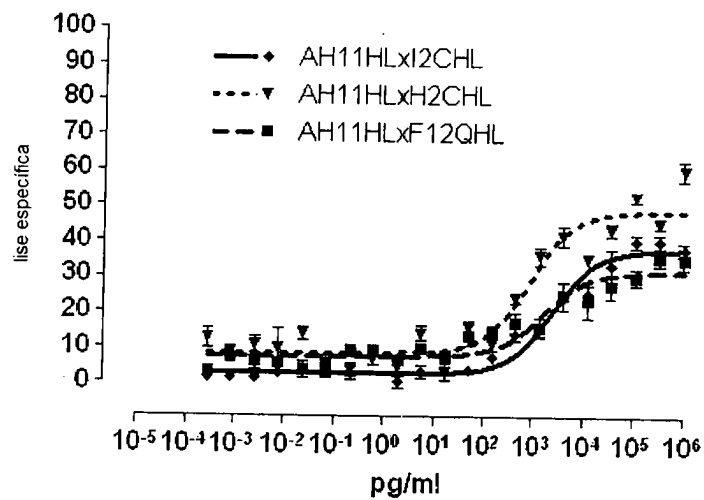
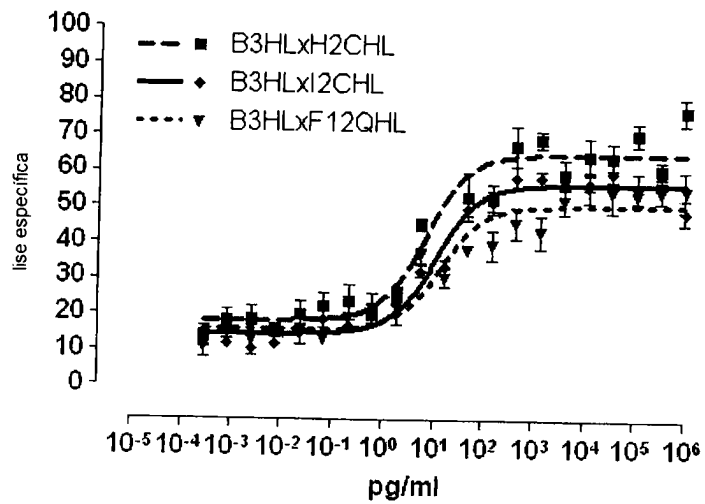


Figura 30 (4)

Células efectoras: PBMC humano depletado CD4/CD56 estimuladas
Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 simio

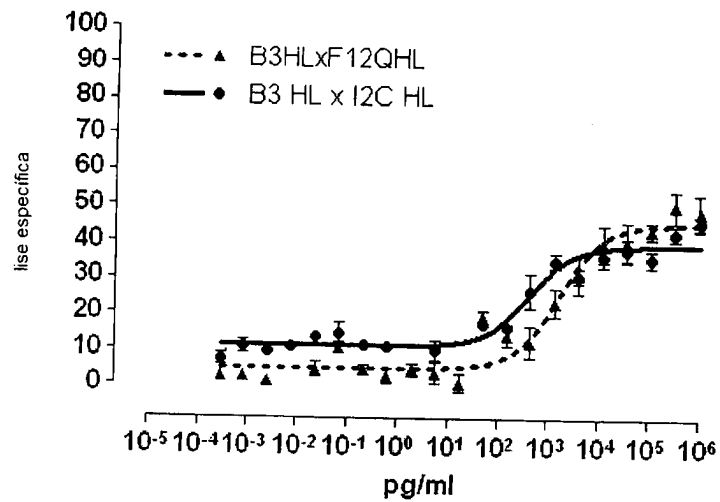
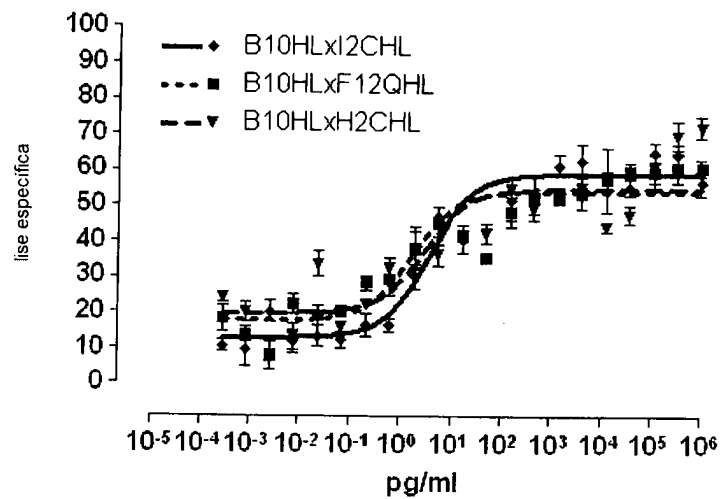


Figura 30 (5)

Células efectoras: PBMC humano depletado CD4/CD56 estimuladas
Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 simio

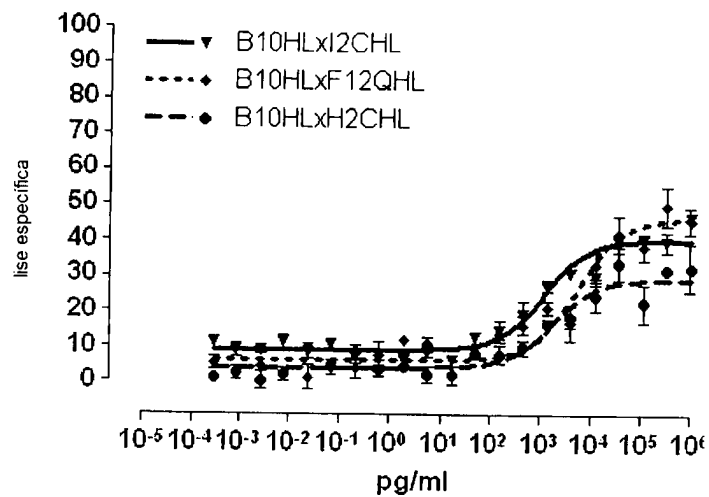
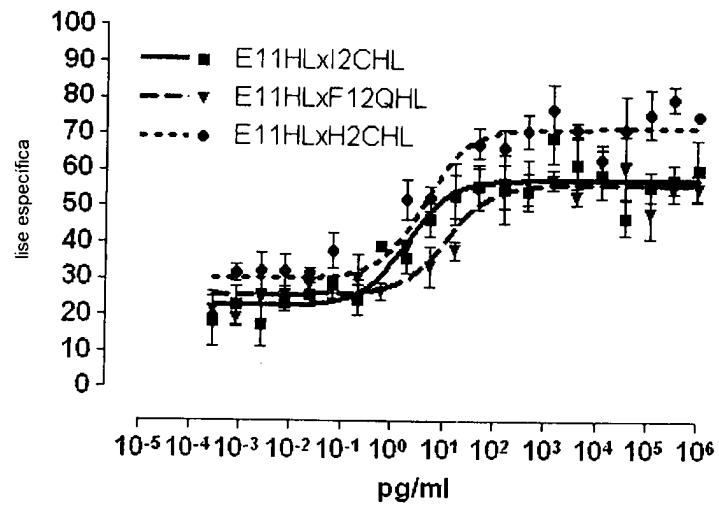


Figura 30 (6)

Células efectoras: PBMC humano depletado CD4/CD56 estimuladas
 Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
 Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 simio

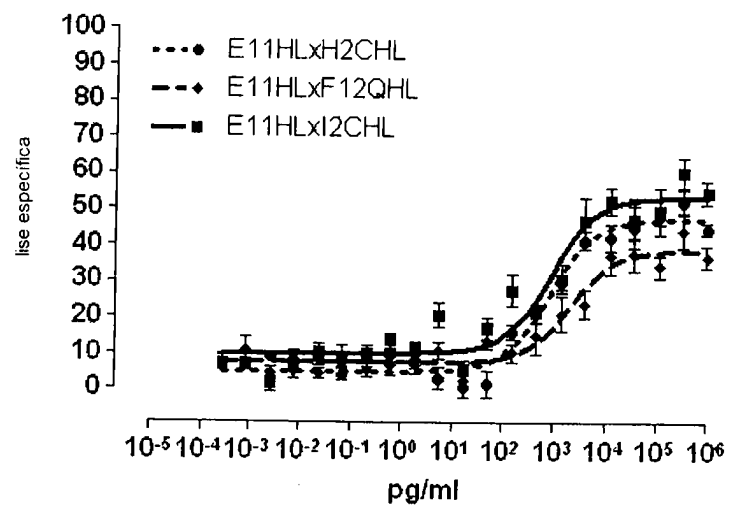
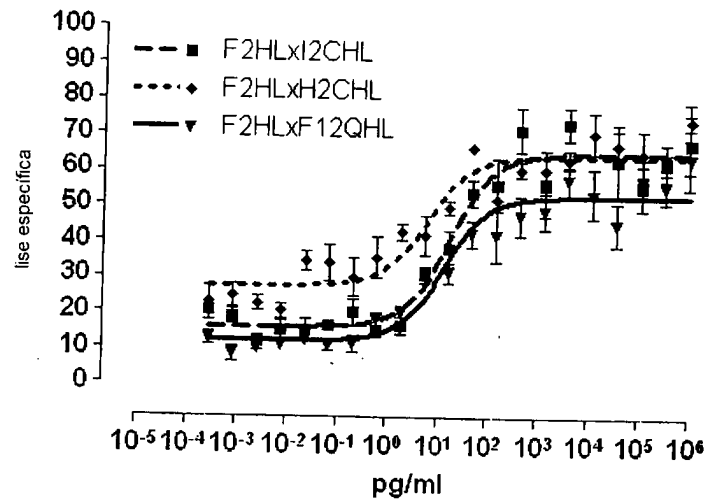


Figura 30 (7)

Células efectoras: PBMC humano depletado CD4/CD56 estimuladas
 Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
 Células-alvo: CHO transfectadas com CD33 simio

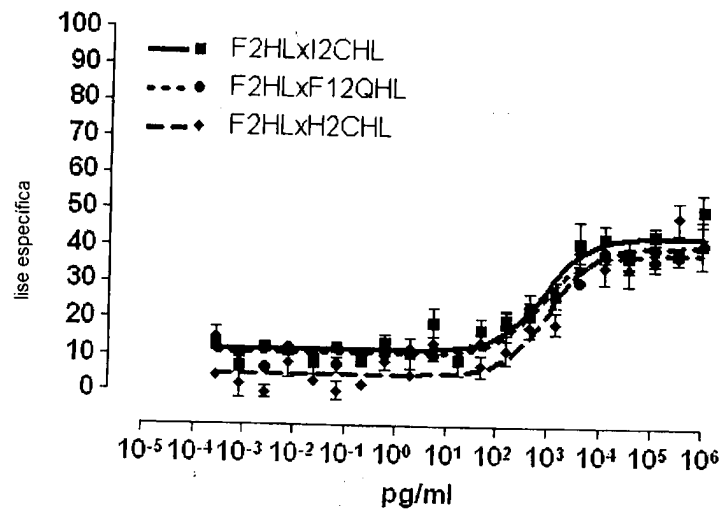


Figura 30 (8)

Figura 31

Página SDS da purificação de
E292F3 HLxI2C HL

Técnica Western blot correspondente de
purificação de E292F3 HLxI2C HL

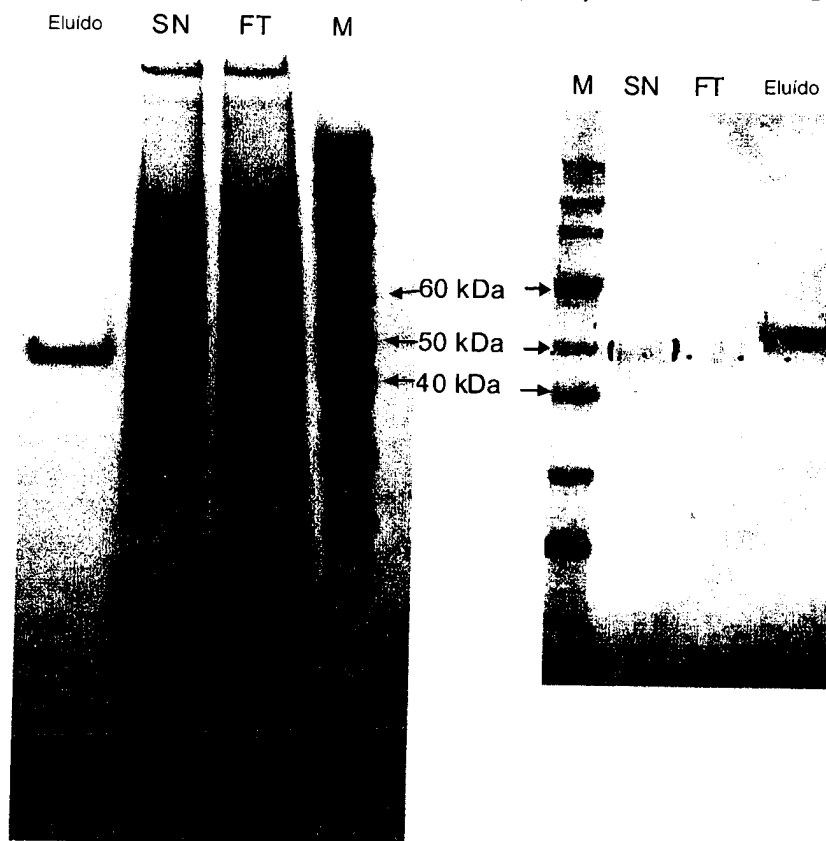


Figura 32

Página SDS da purificação de
V207C12 HLxH2C HL

Técnica Western blot correspondente de
purificação de V207C12 HLxH2C HL

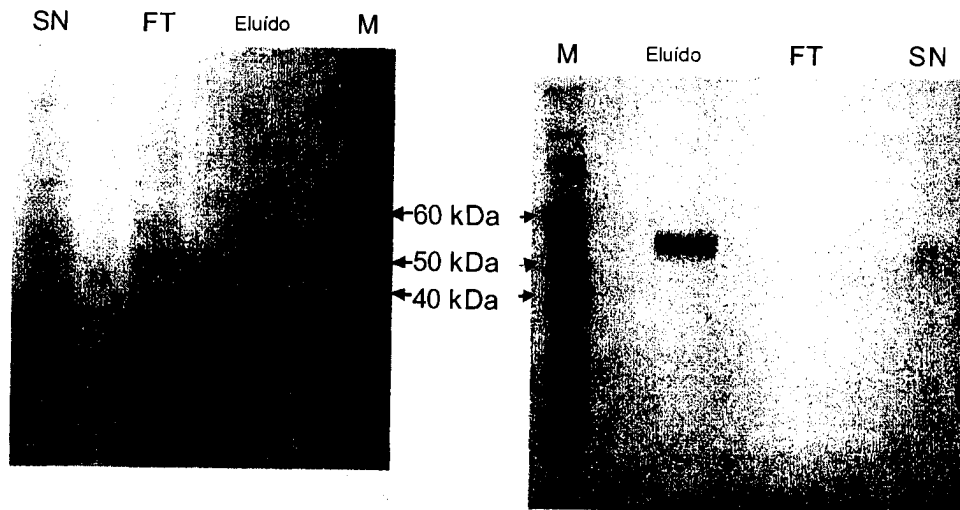


Figura 33

Página SDS da purificação de
AF5HLxF12QHL

Técnica Western blot correspondente de
purificação de AF5HLxF12QHL

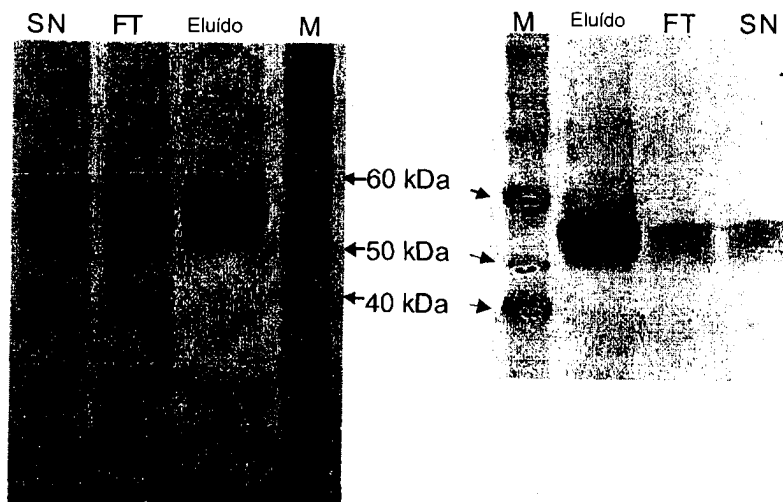


Figura 34

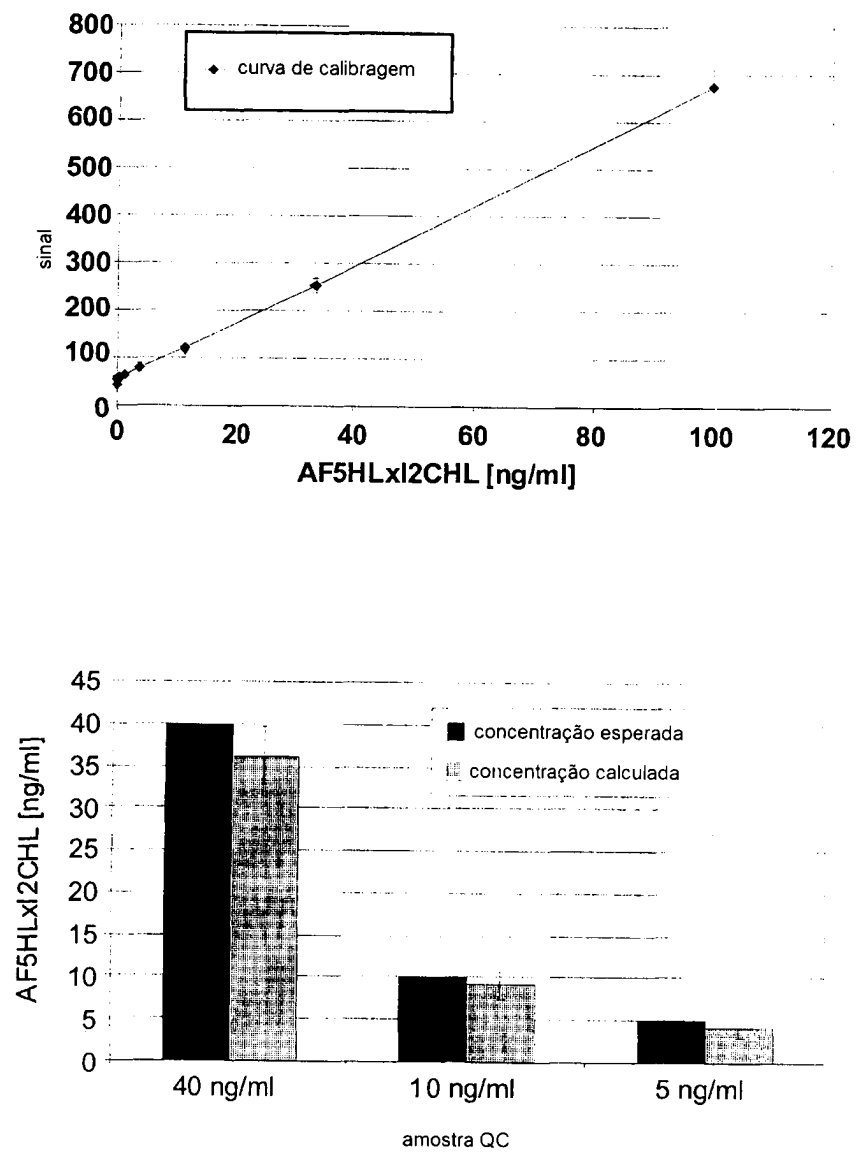


Figura 35

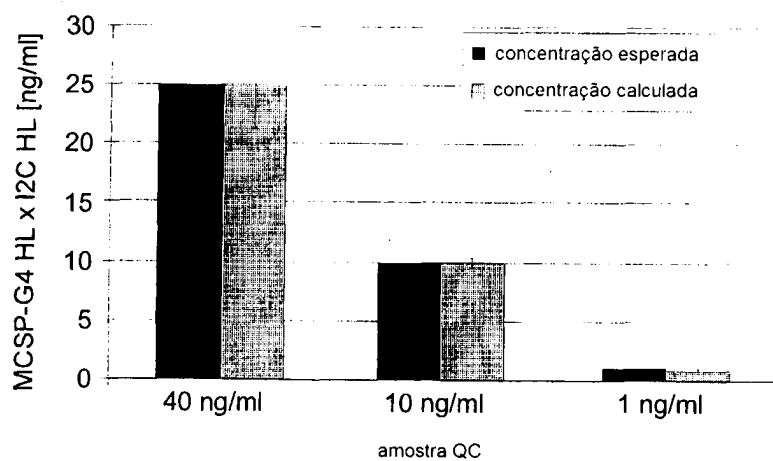
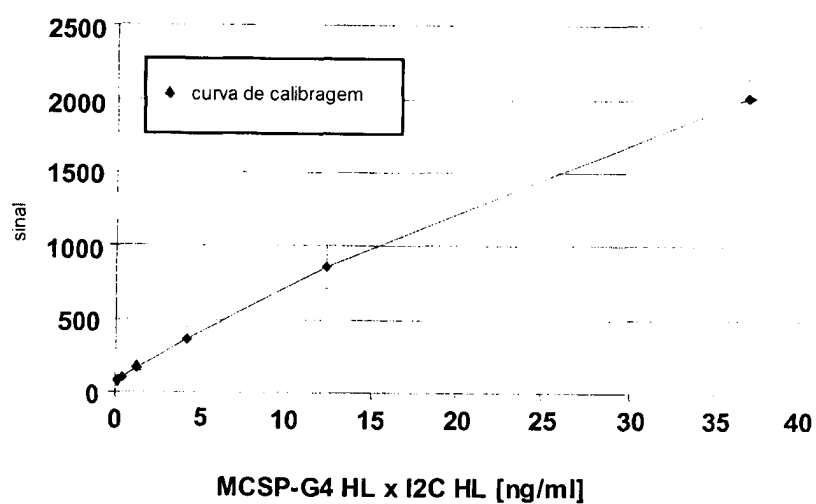


Figura 36

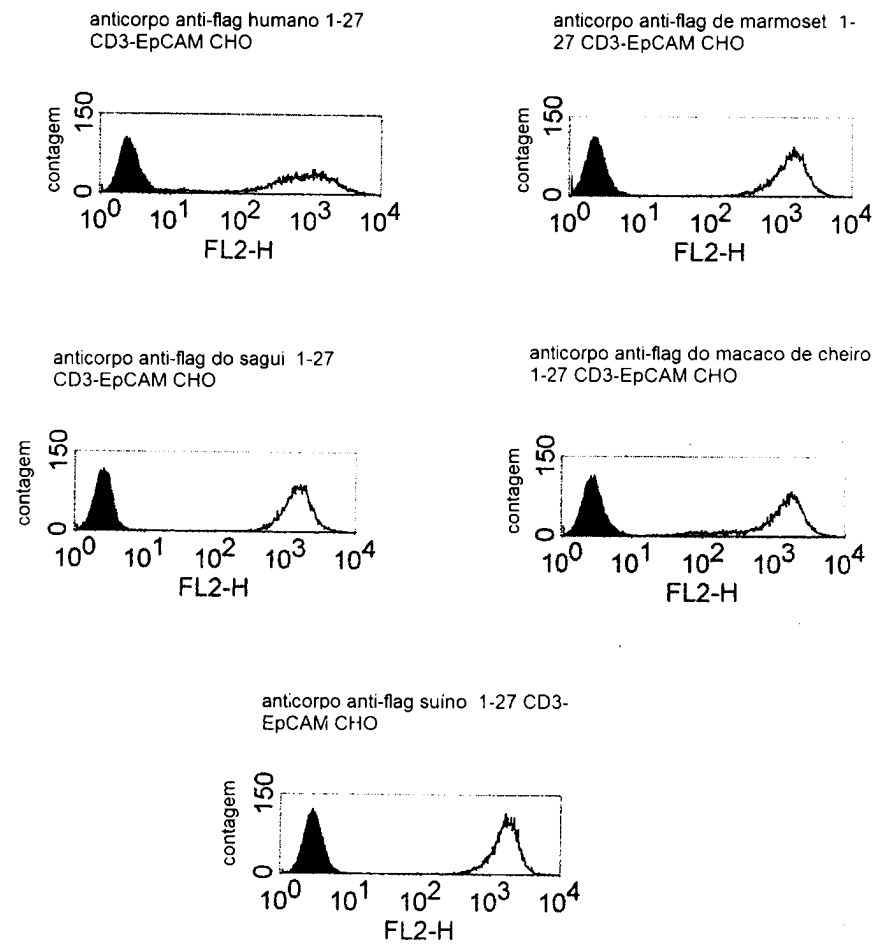


Figura 37

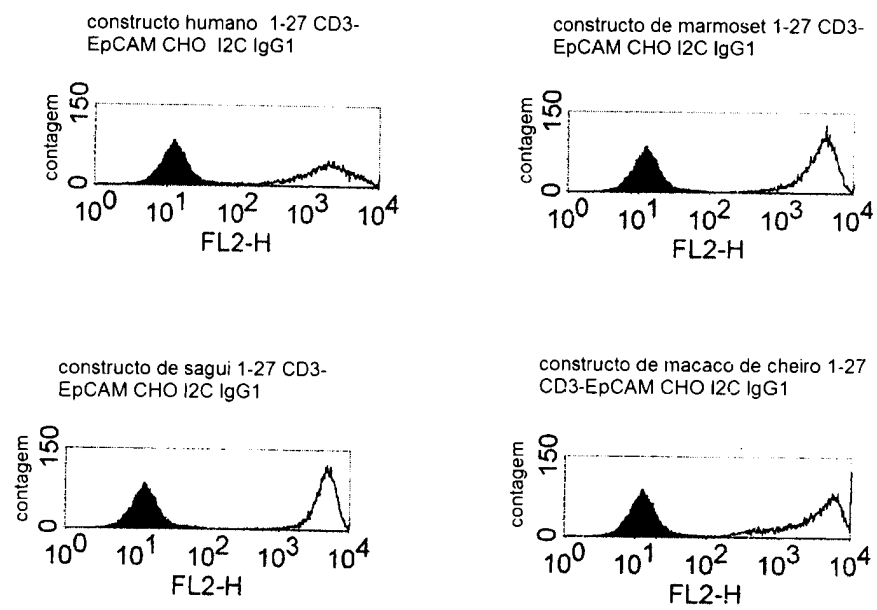
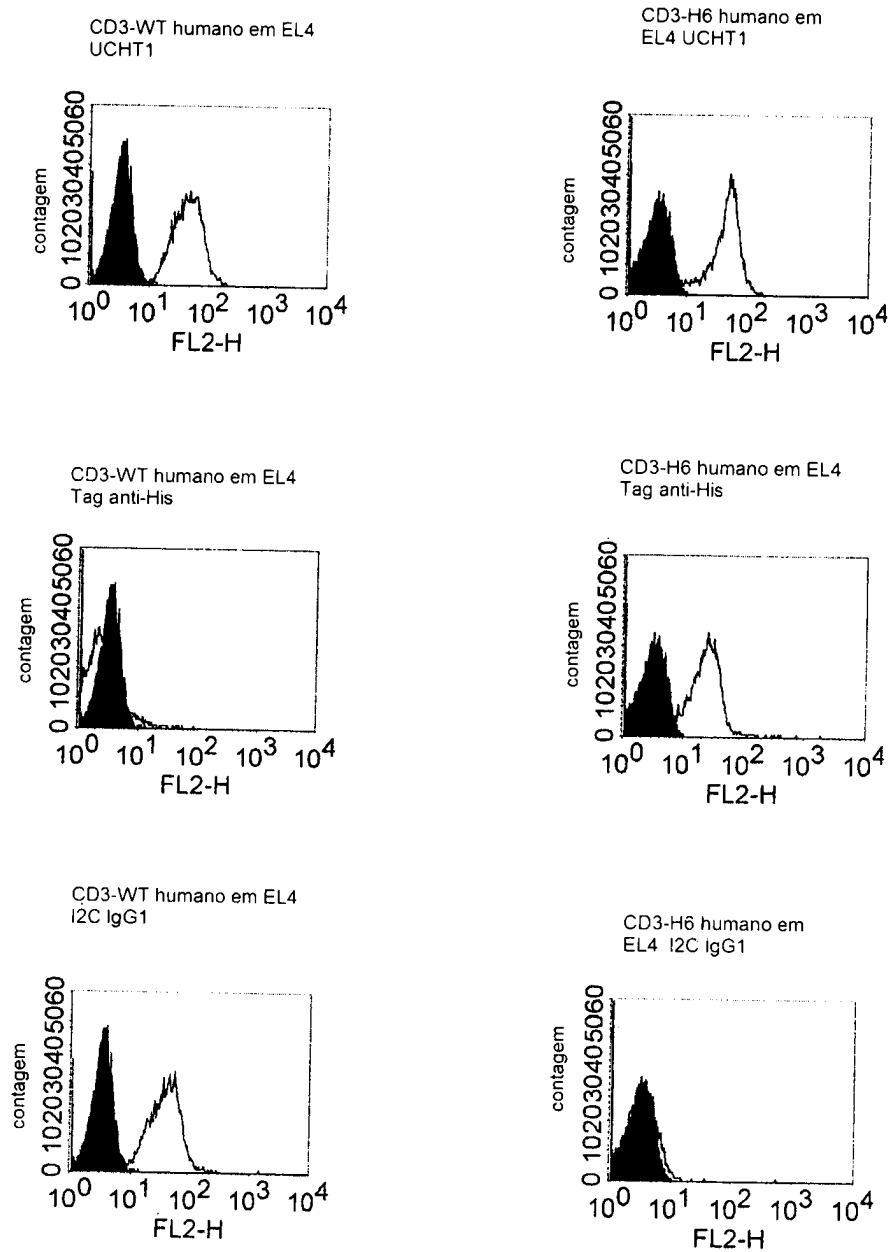


Figura 38



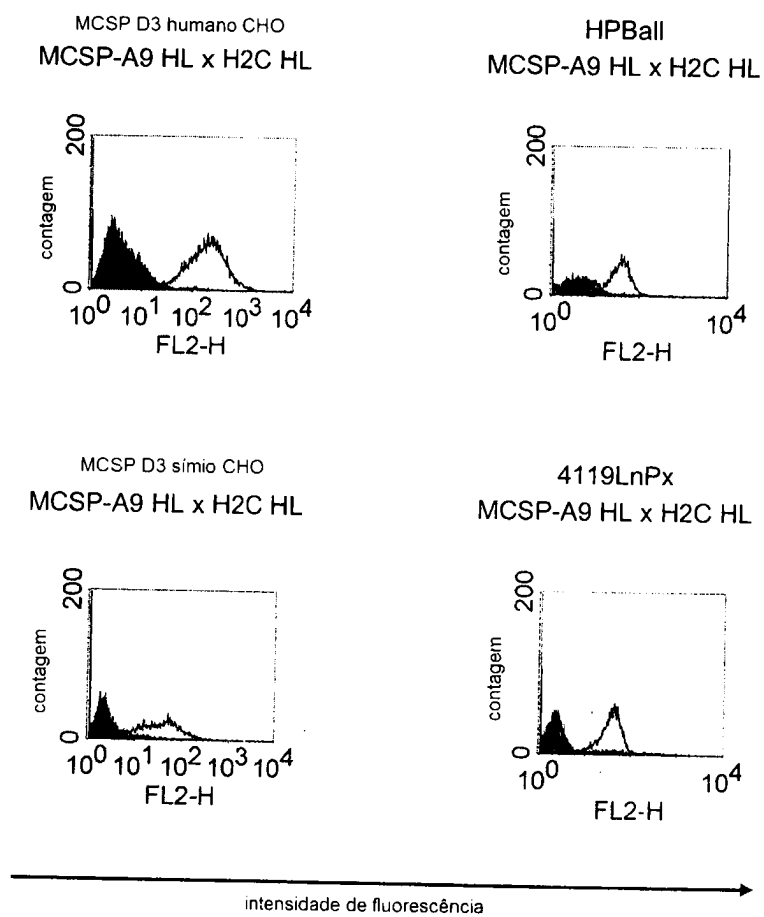
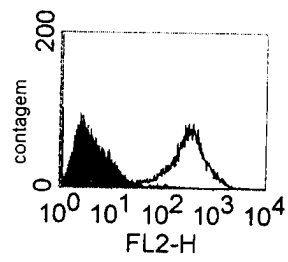
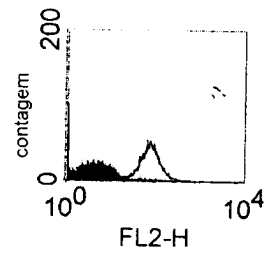


Figura 39a

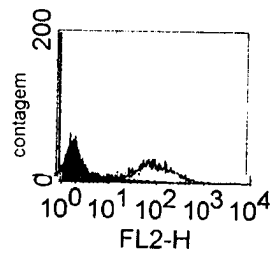
MCSP D3 humano CHO
MCSP-A9 HL x F12Q HL



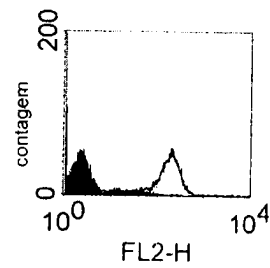
HPBall
MCSP-A9 HL x F12Q HL



MCSP D3 simio CHO
MCSP-A9 HL x F12Q HL



4119LnPx
MCSP-A9 HL x F12Q HL



intensidade de fluorescência

Figura 39b

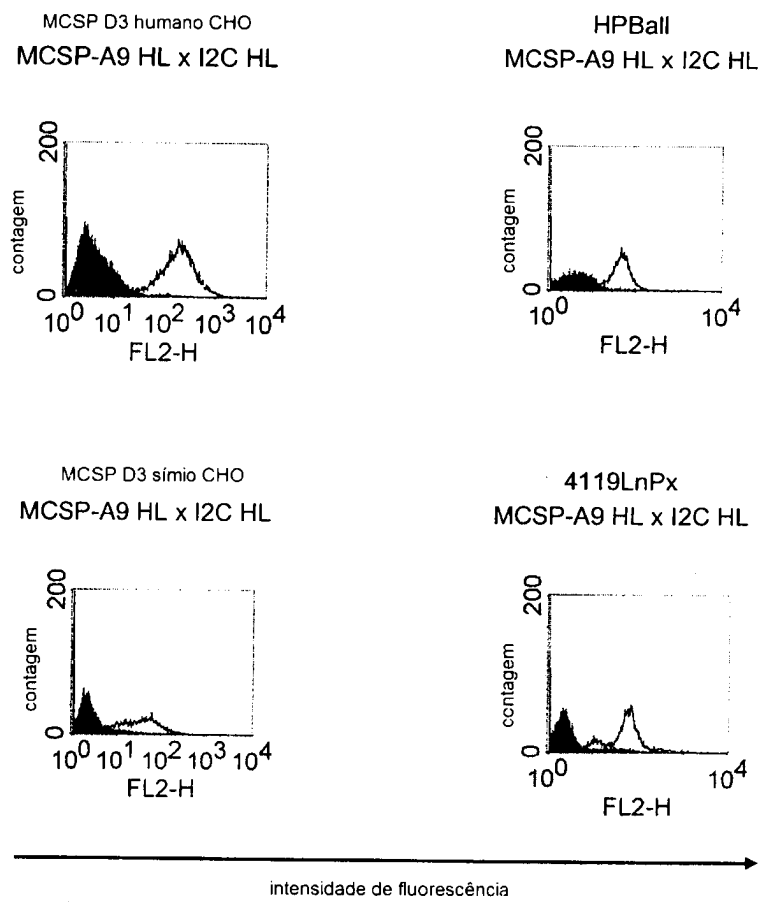


Figura 39c

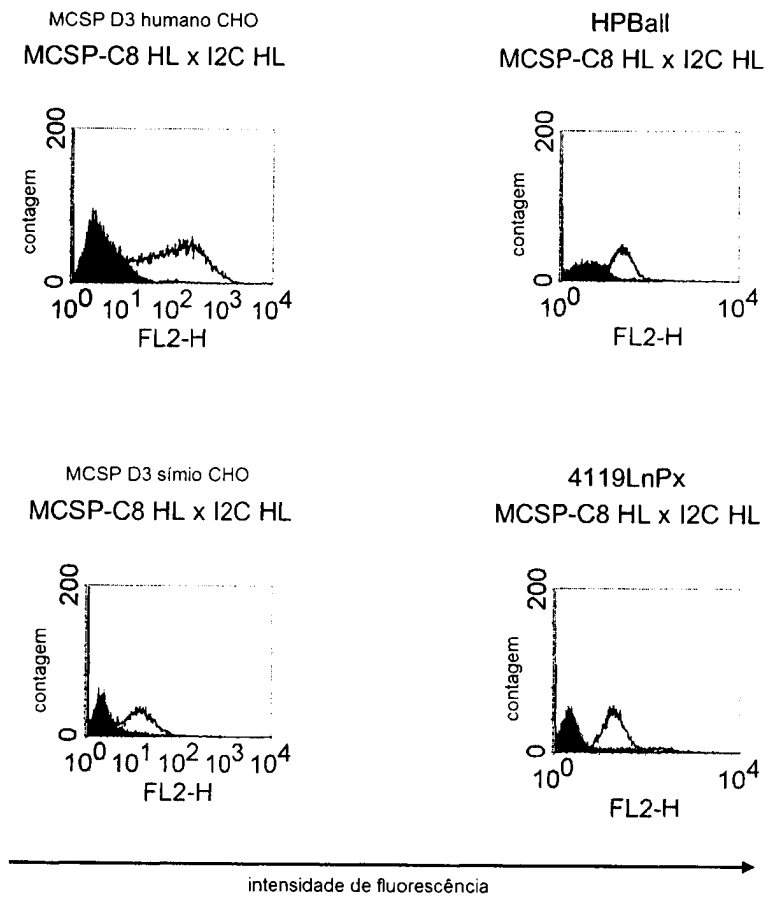


Figura 39d

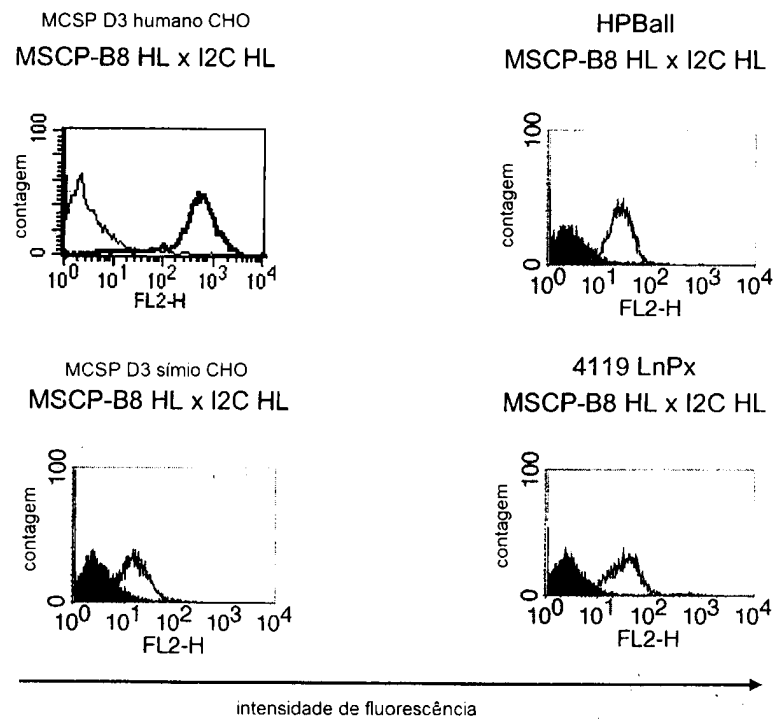


Figura 39e

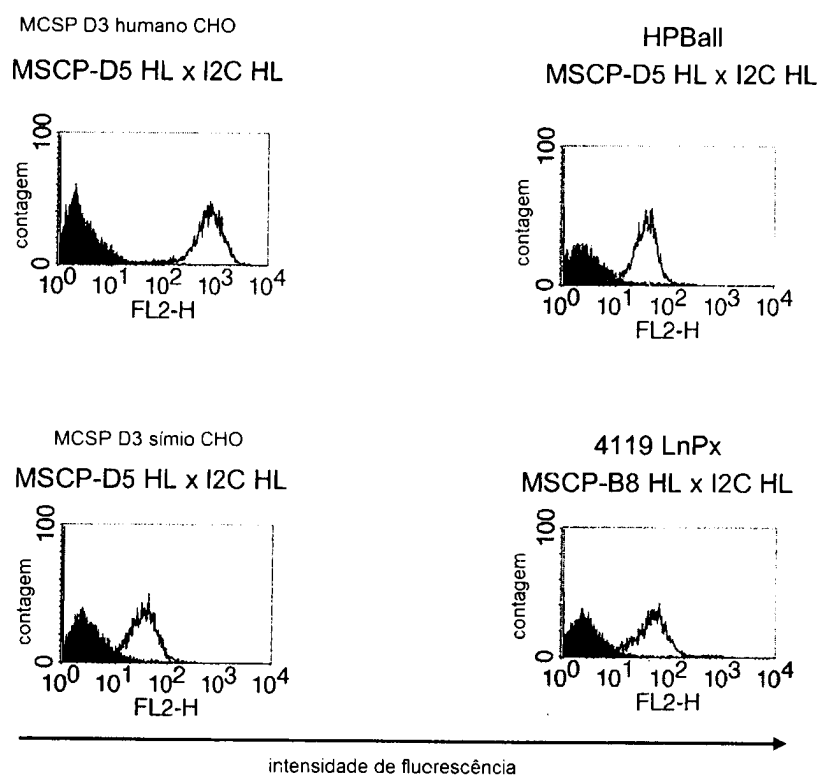


Figura 39f

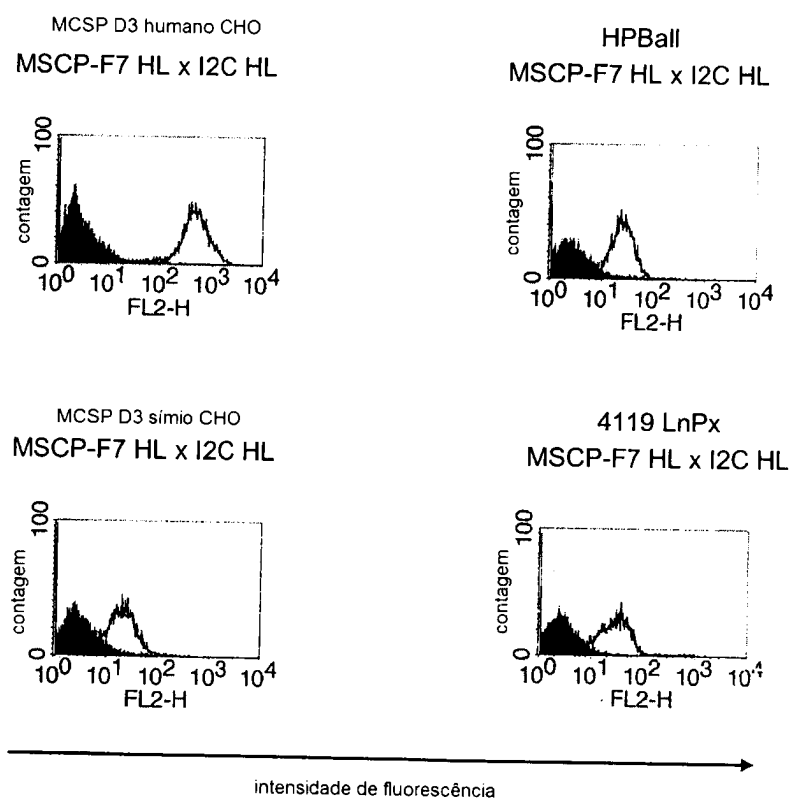
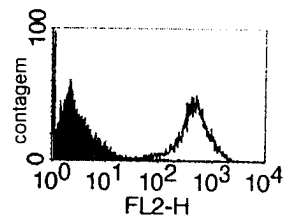
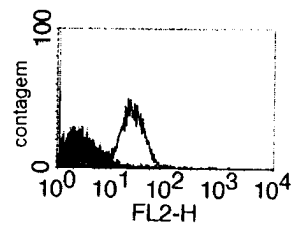


Figura 39g

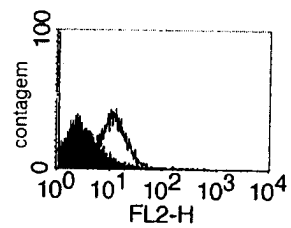
MCSP D3 humano CHO
MSCP-F8 HL x I2C HL



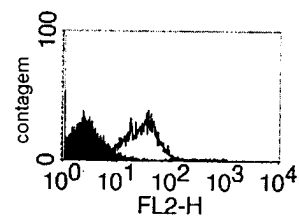
HPBall
MSCP-F8 HL x I2C HL



MCSP D3 simio CHO
MSCP-F8 HL x I2C HL



4119 LnPx
MSCP-F8 HL x I2C HL



intensidade de fluorescência →

Figura 39h

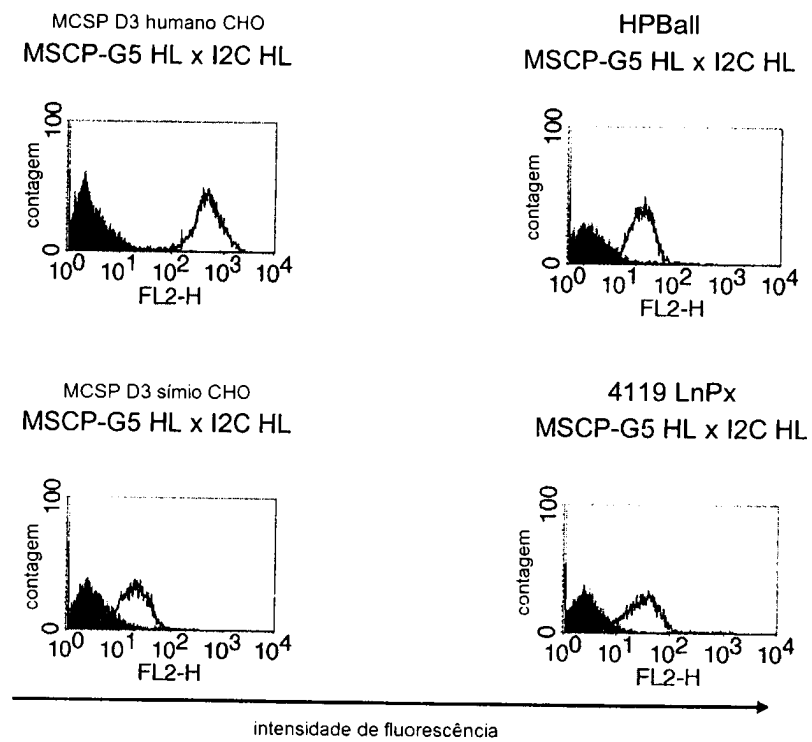


Figura 39i

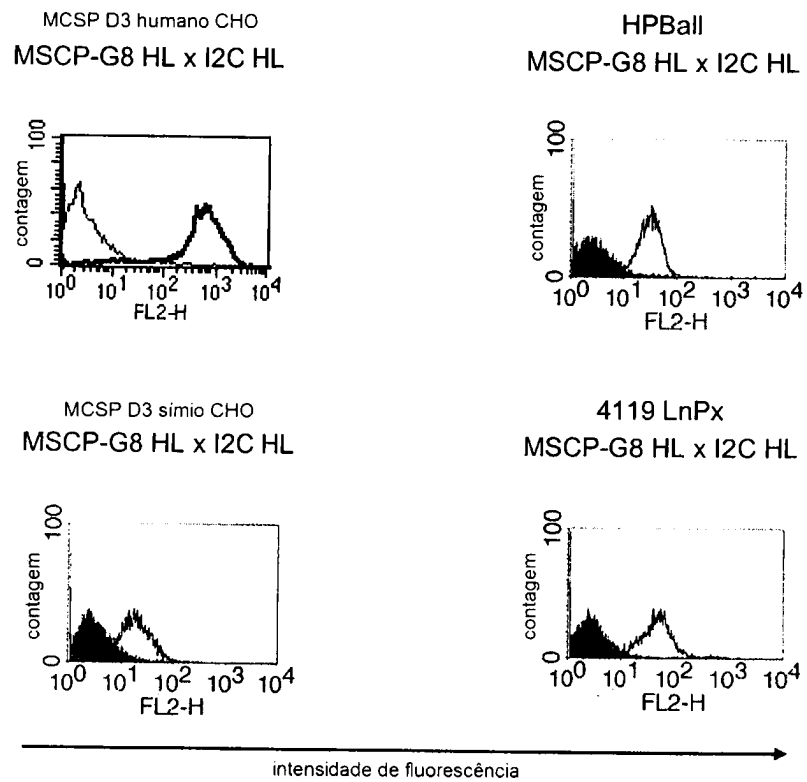


Figura 39j

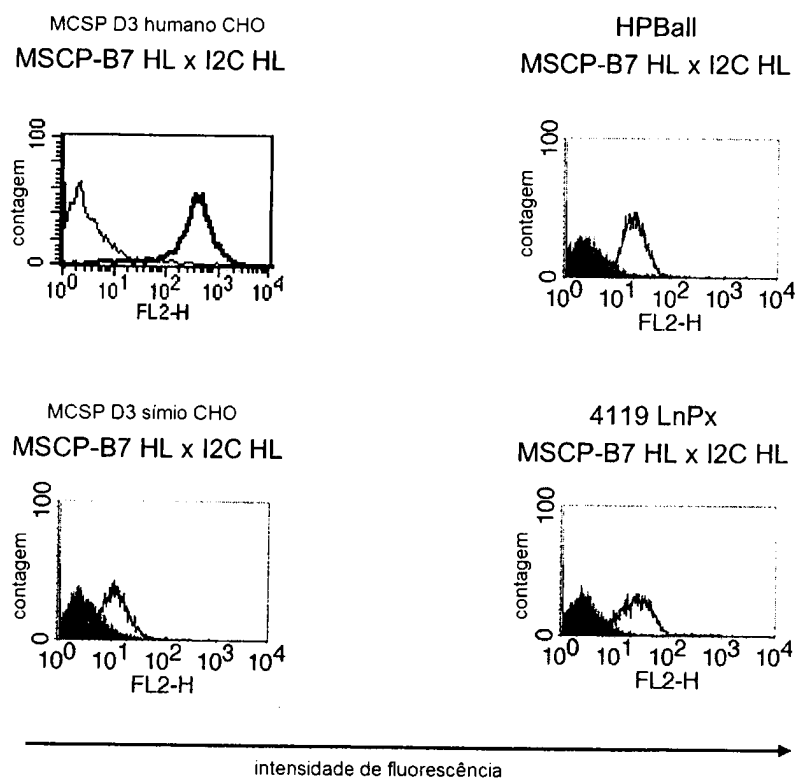


Figura 39k

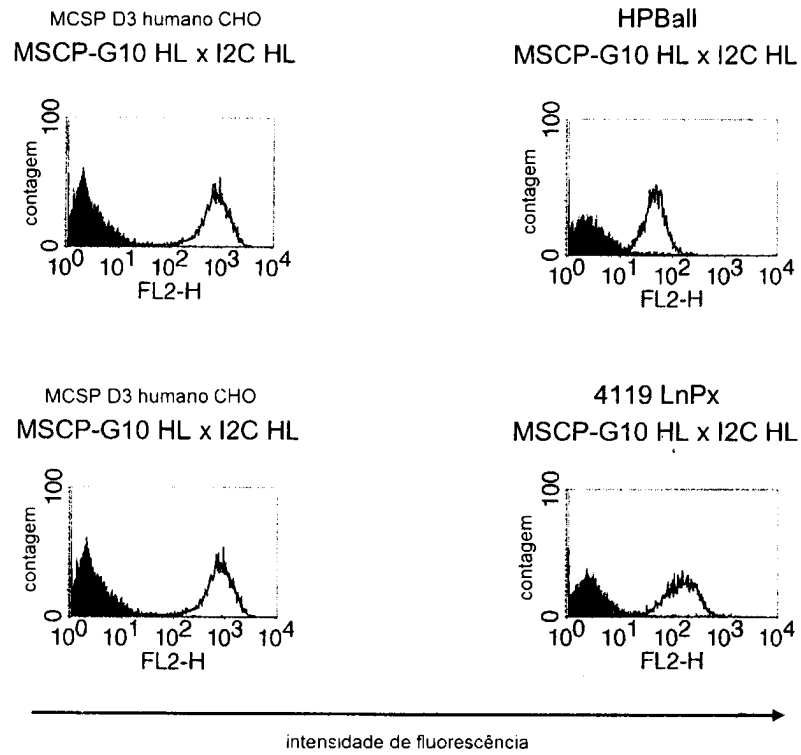
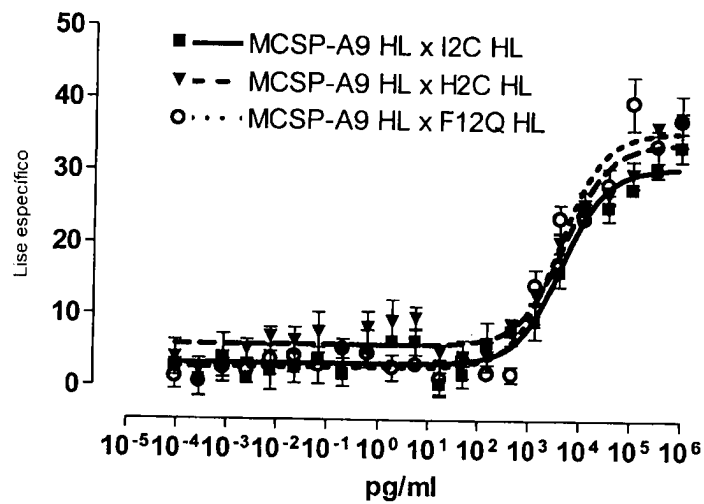


Figura 39I

Figura 40a

Células efetoras: PBMC de humanos depletadas CD4/CD56 de humanos estimuladas
 Células alvo: CHO transfectado com MCSP D3 humano
 E: razão T: 10:1



Células efetoras: 4119 LnPx
 Células Alvo: CHO transfectado com simio MCSP D3
 E: razão T: 10:1

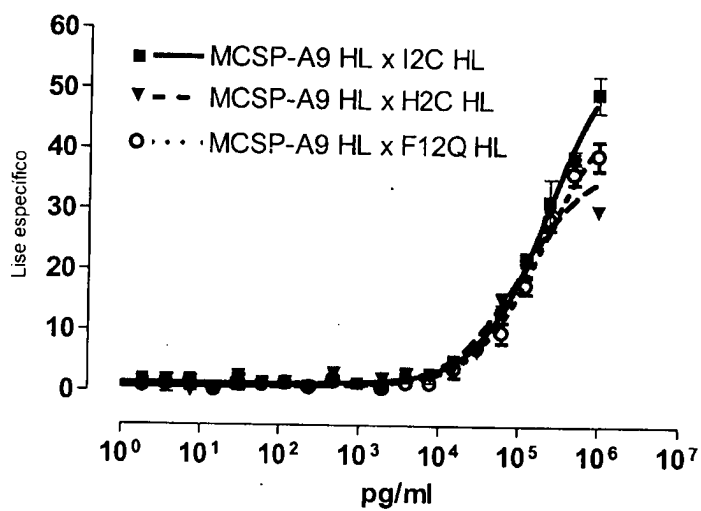
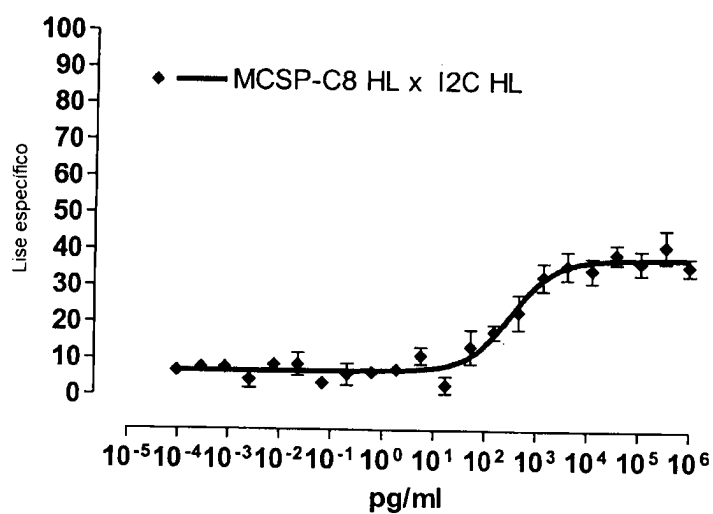


Figura 40b

Células efectoras: PBMC de humanos depletadas CD4/CD56 de humanos estimuladas
 Células alvo: CHO transfectado com MCSP D3 humano
 E: razão T: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx
 Células Alvo: CHO transfectado com simio MCSP D3
 E: razão T: 10:1

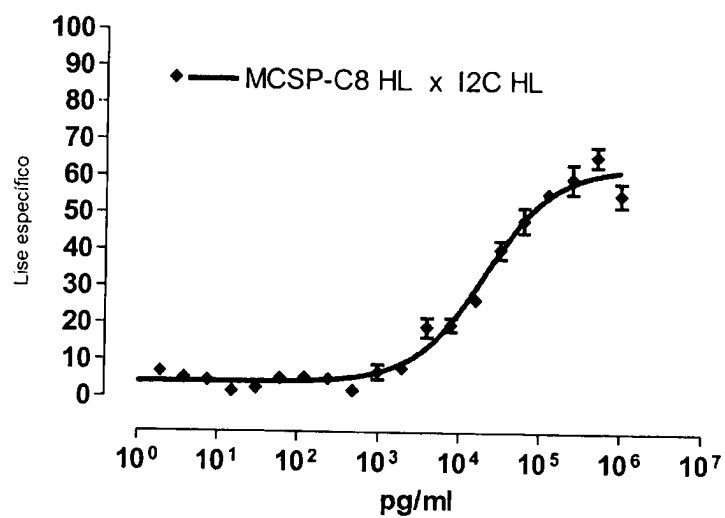
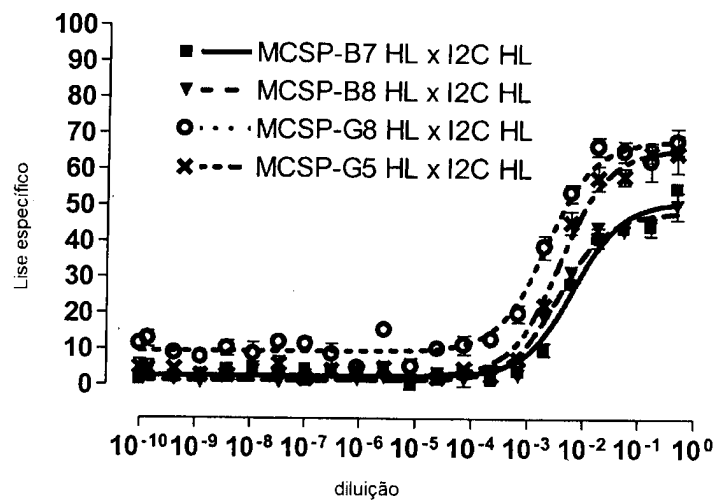


Figura 40c

Células efectoras: PBMC de humanos depletadas CD4/CD56 de humanos estimuladas
 células alvo: CHO transfectado com MCSP D3 humano
 E: razão T: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx
 Células Alvo: CHO transfectado com símio MCSP D3
 E: razão T: 10:1

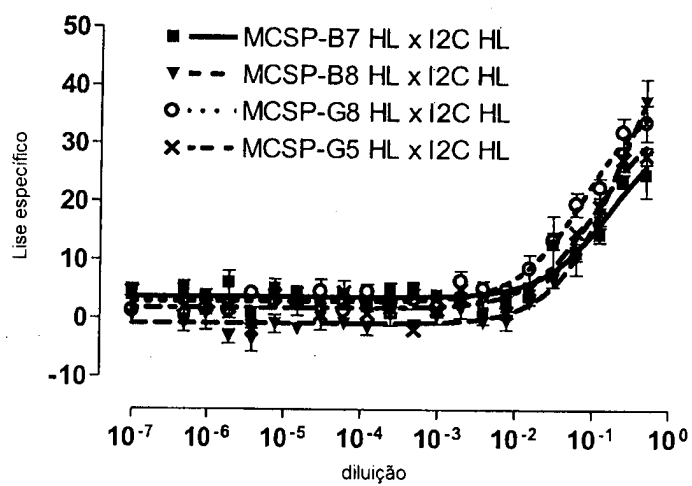
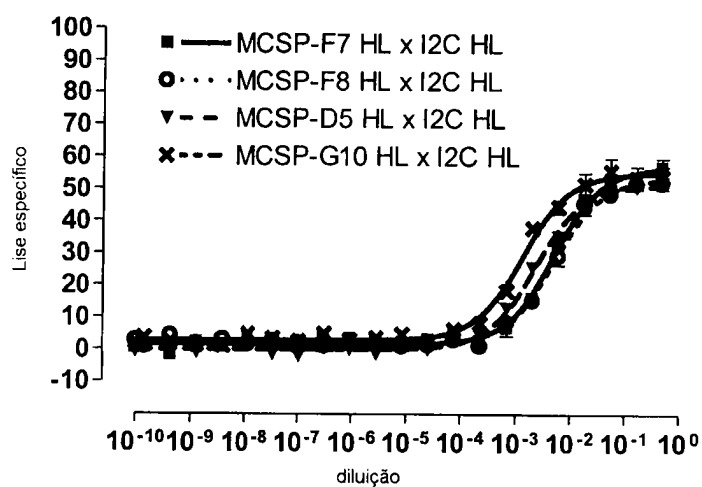


Figura 40d

Células efectoras: PBMC de humanos depletadas CD4/CD56 de humanos estimuladas
 células alvo: CHO transfectado com MCSP D3 humano
 E: razão T: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx
 Células Alvo: CHO transfectado com simio MCSP D3
 E: razão T: 10:1

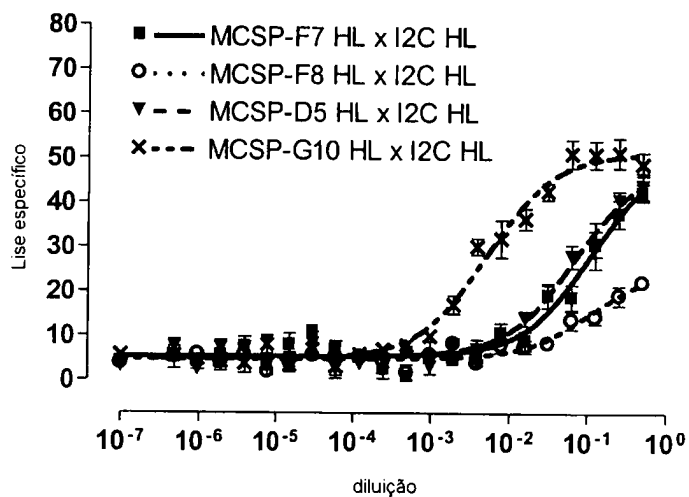
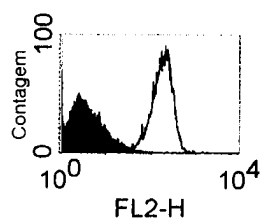


Figura 41a

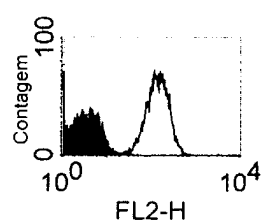
CHO transfectado de CD33 humano

I2CHLxAF5HL



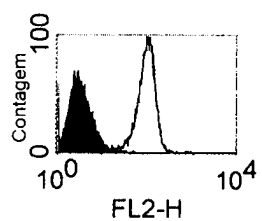
HPB-ALL

I2CHLxAF5HL



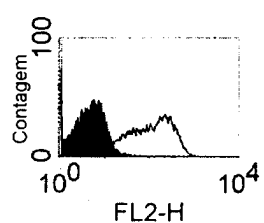
CHO transfectado de CD33 de símio

I2CHLxAF5HL



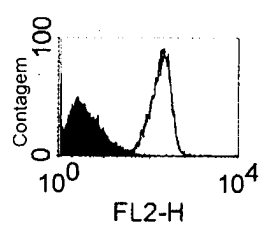
PBMC de símio

I2CHLxAF5HL



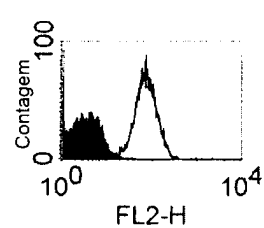
CHO transfectado de CD33 humano

H2CHLxAF5HL



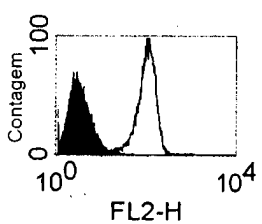
HPB-ALL

H2CHLxAF5HL



CHO transfectado de CD33 de símio

H2CHLxAF5HL



PBMC de símio

H2CHLxAF5HL

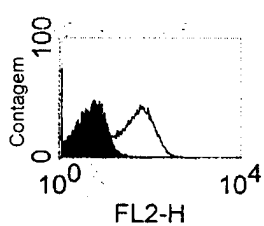
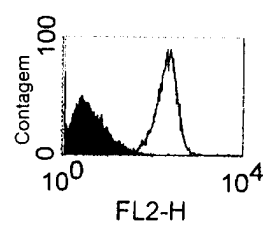


Figura 41b

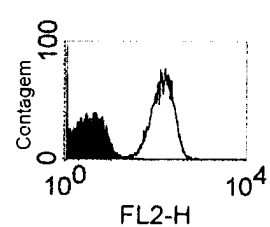
CHO transfectado de CD33 humano

F12QHLxAF5HL



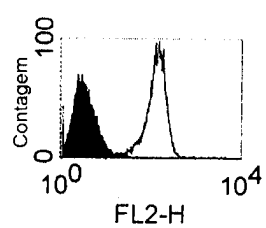
HPB-ALL

F12QHLxAF5HL



CHO transfectado de CD33 de simio

F12QHLxAF5HL



PBMC de simio

F12QHLxAF5HL

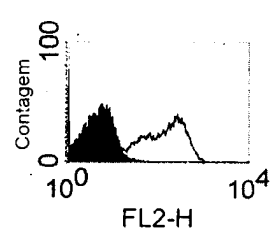
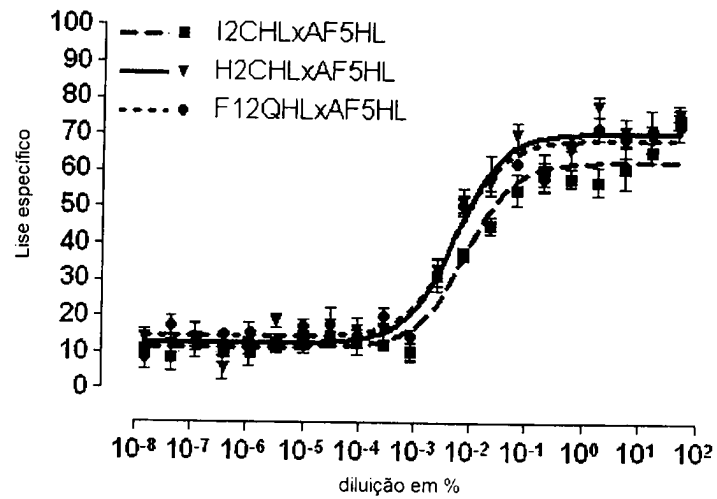


Figura 42

Células efectoras: PBMC de humanos depletado CD4/CD56
estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD33 humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
Células Alvo: CHO transfectado com simio CD33

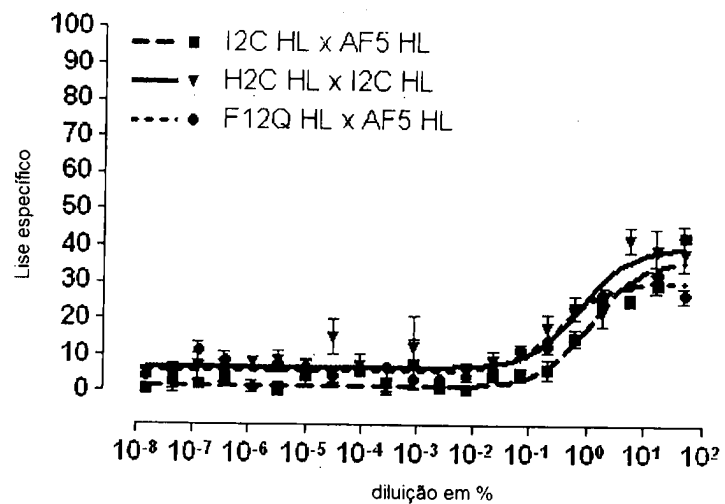


Figura 43

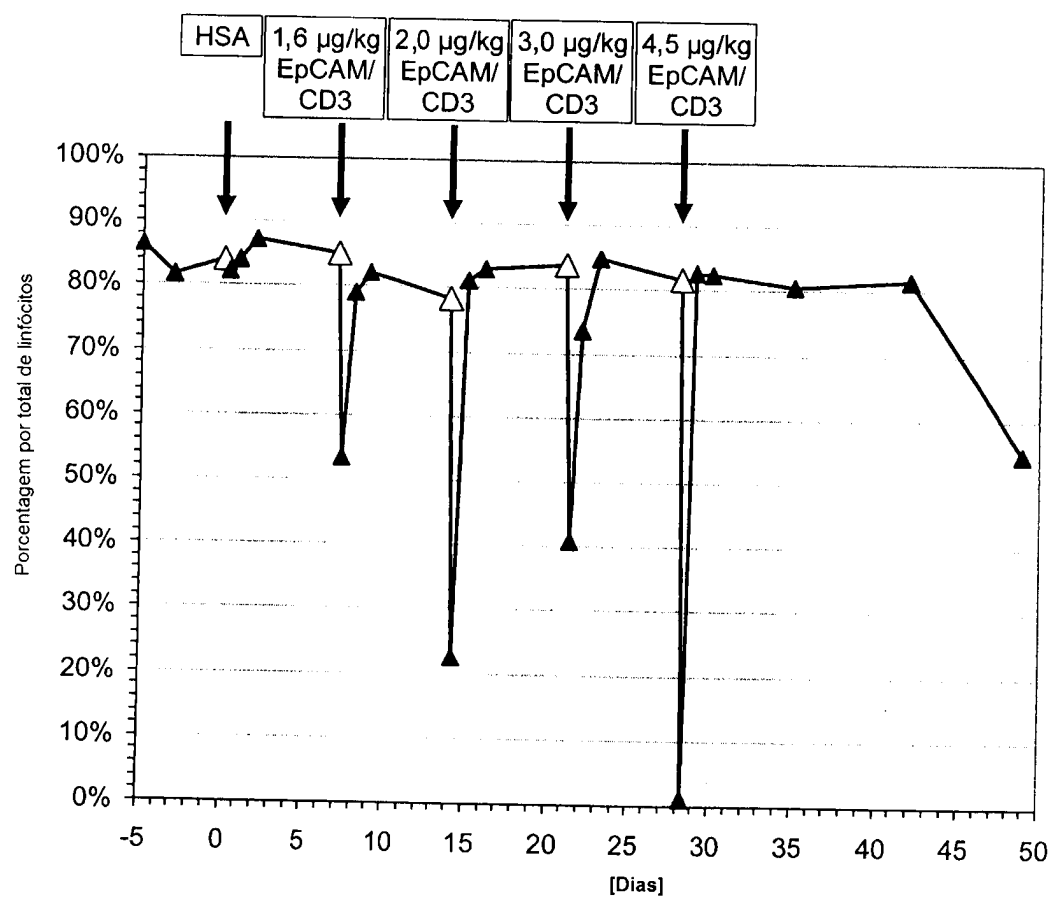


Figura 44

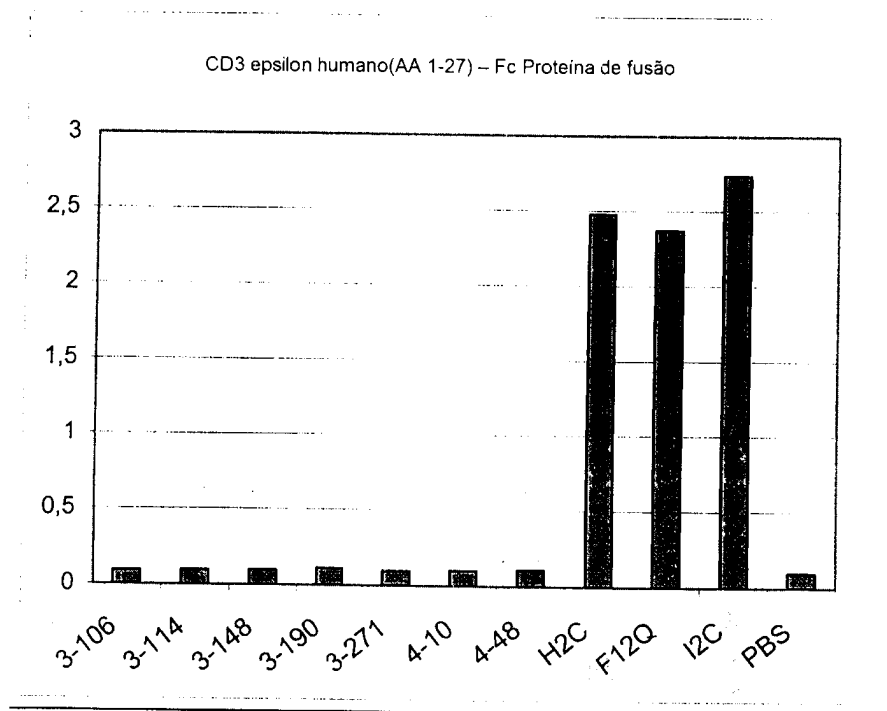


Figura 45

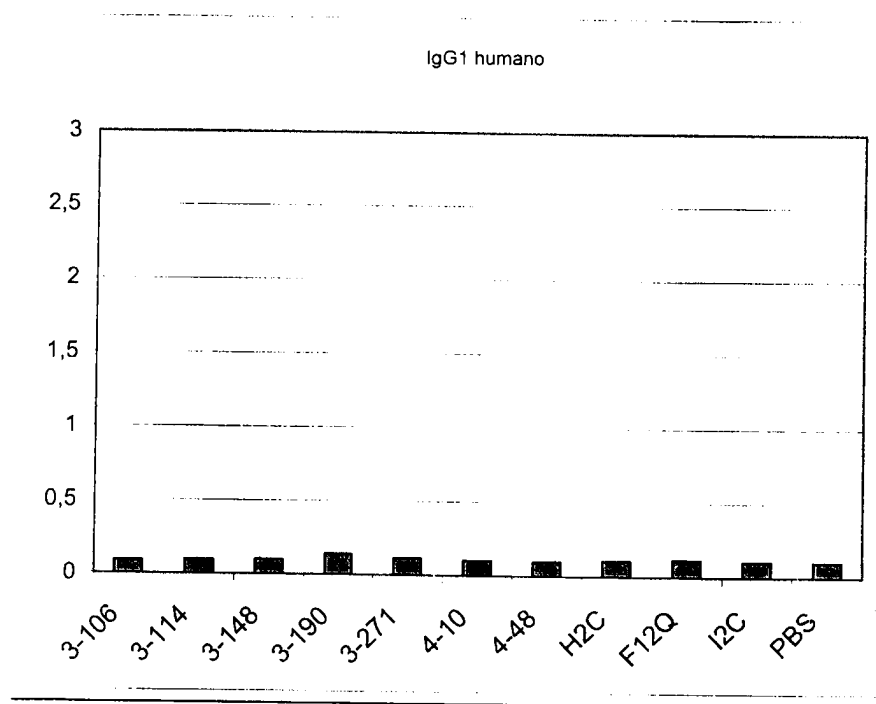


Figura 46A

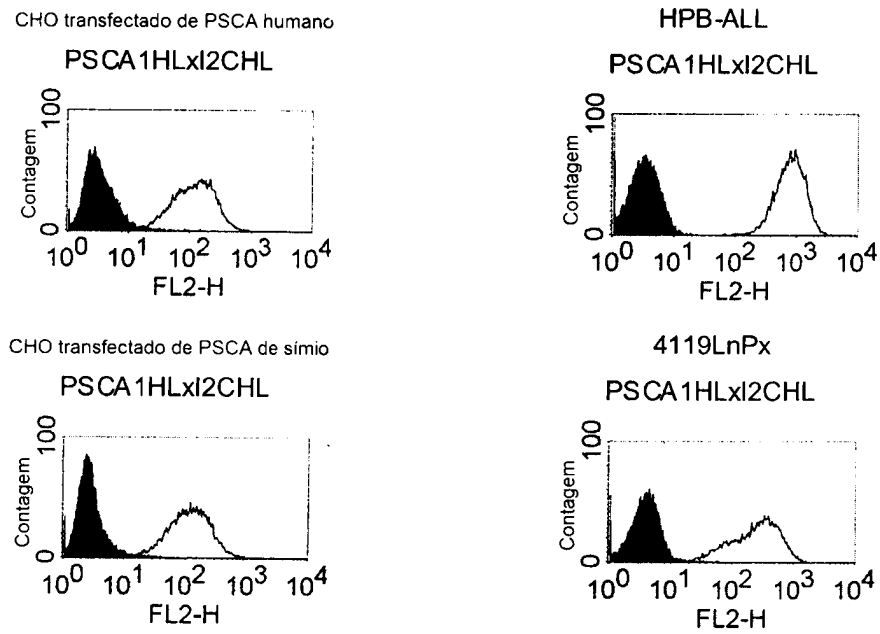


Figura 46B

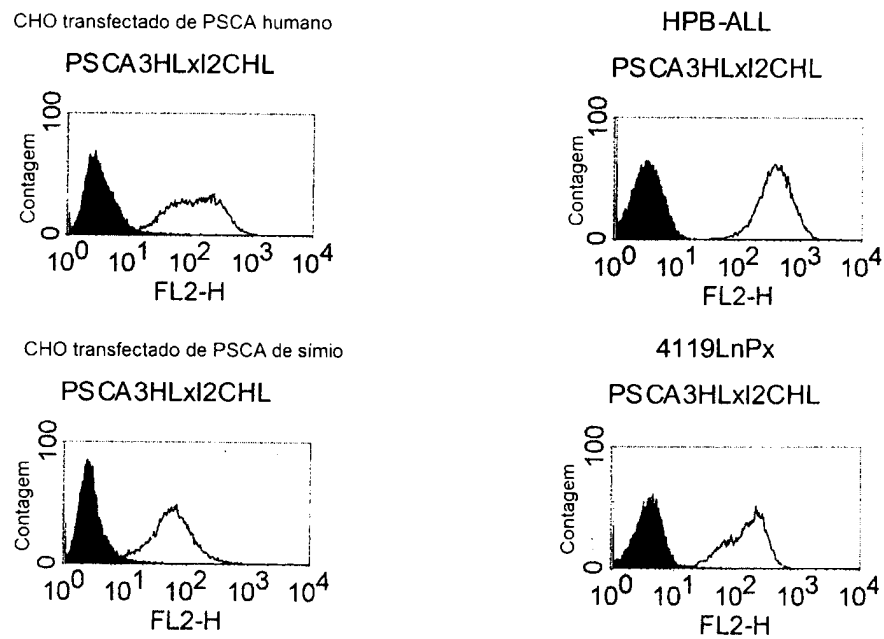
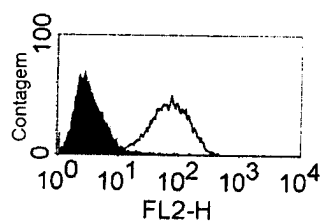


Figura 46C

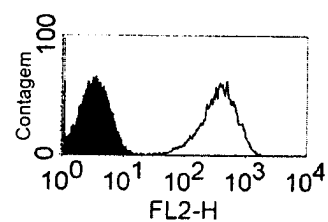
CHO transfectado de PSCA humano

PSCA4HLxI2CHL



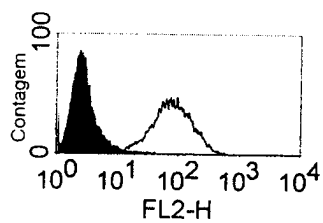
HPB-ALL

PSCA4HLxI2CHL



CHO transfectado de PSCA de símio

PSCA4HLxI2CHL



4119LnPx

PSCA4HLxI2CHL

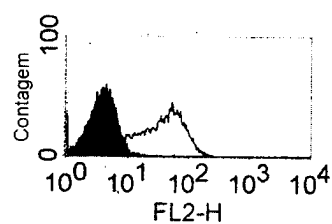
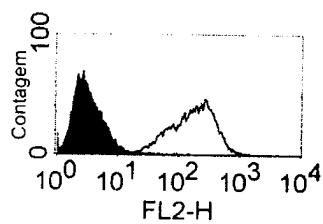


Figura 46D

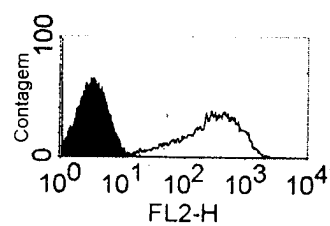
CHO transfectado de PSCA humano

PSCA1LHxI2CHL



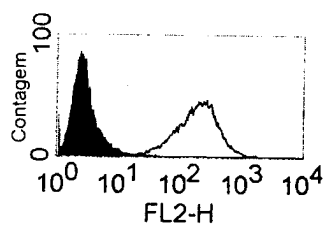
HPB-ALL

PSCA1LHxI2CHL



CHO transfectado de PSCA de símio

PSCA1LHxI2CHL



4119LnPx

PSCA1LHxI2CHL

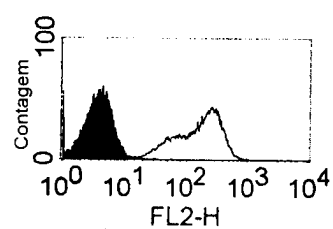


Figura 46E

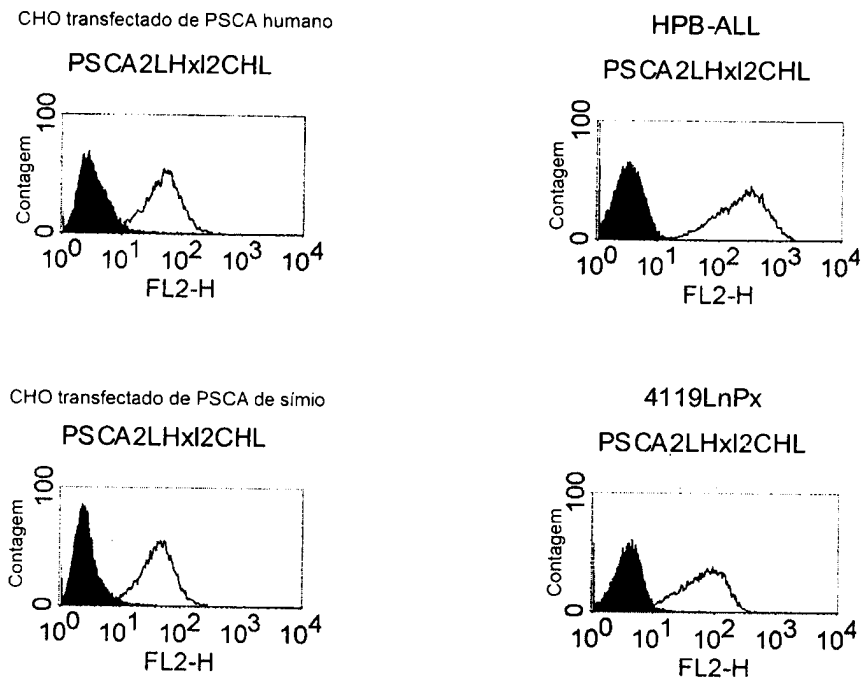


Figura 46F

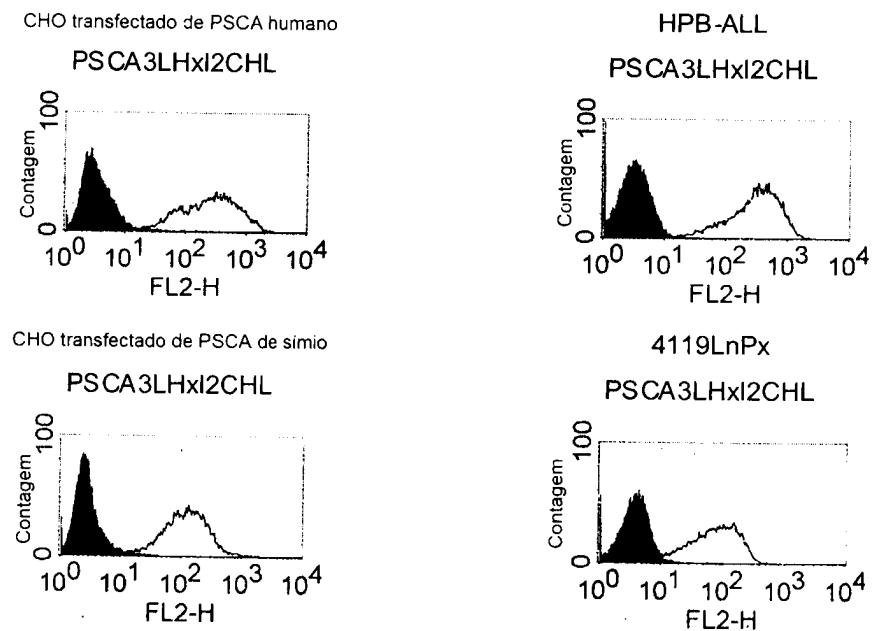
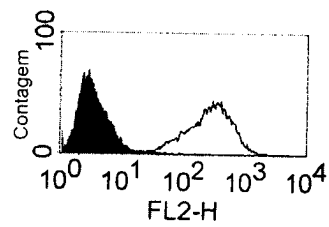


Figura 46G

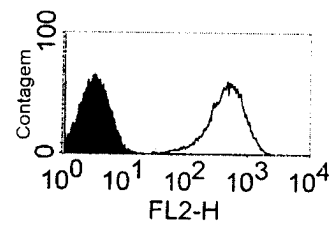
CHO transfectado de PSCA humano

PSCA4LHxI2CHL



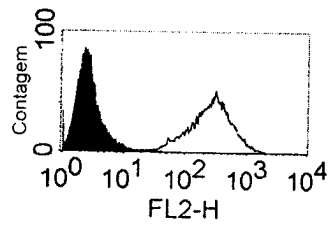
HPB-ALL

PSCA4LHxI2CHL



CHO transfectado de PSCA de simio

PSCA4LHxI2CHL



4119LnPx

PSCA4LHxI2CHL

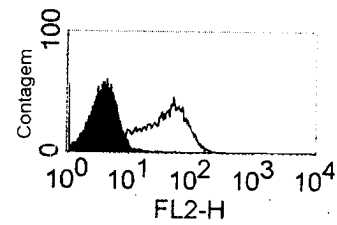
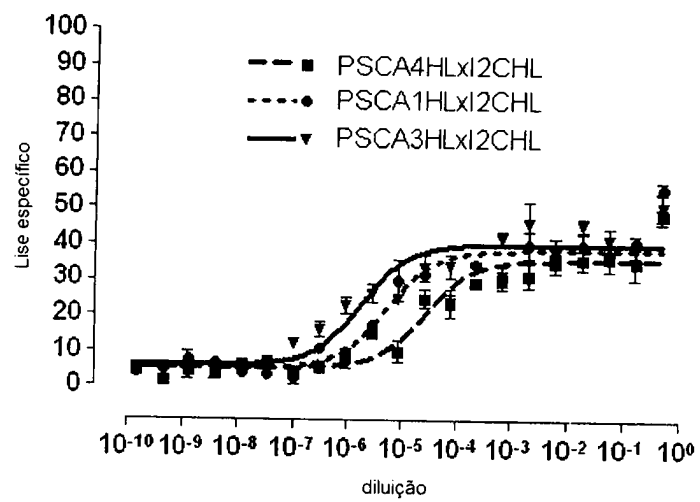


Figura 47A

Células efectoras: PBMC de humanos depletado CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com PSCA humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
Células Alvo: CHO transfectado com simio PSCA

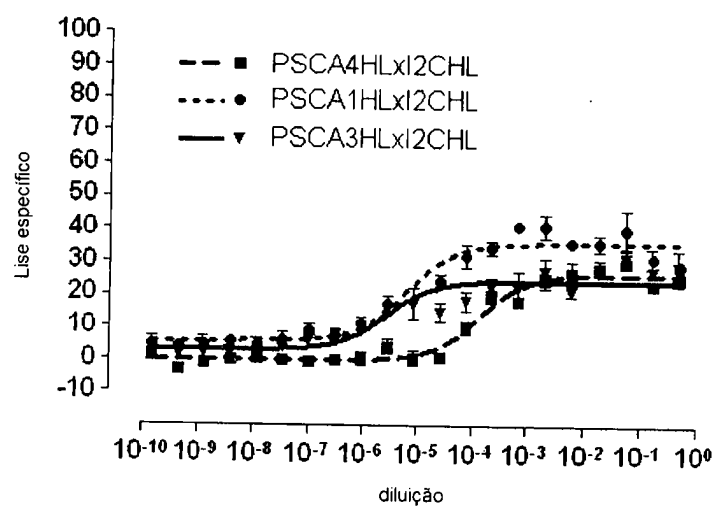
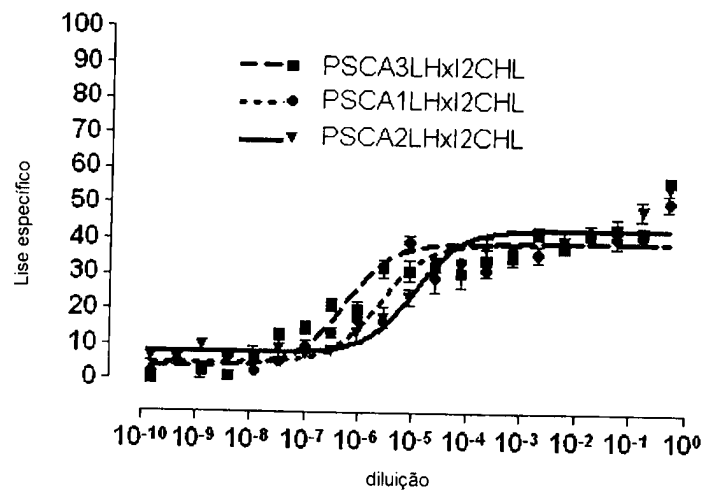


Figura 47B

Células efectoras: PBMC de humanos depletado CD4/CD56
estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com PSCA humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
Células Alvo: CHO transfectado com simio PSCA

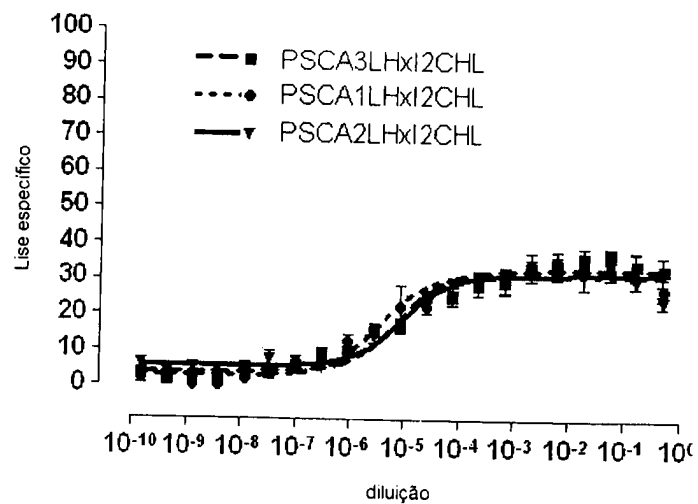
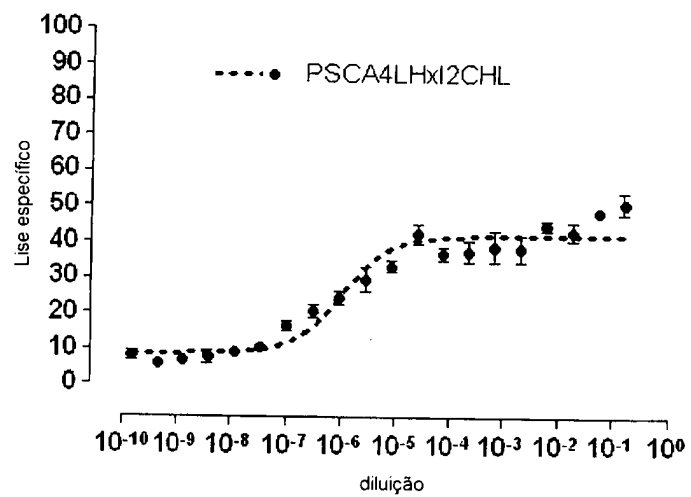
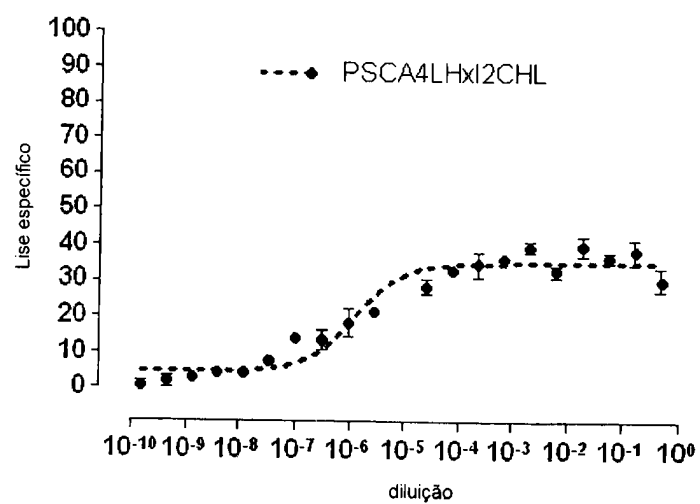


Figura 47C

Células efectoras: PBMC de humanos depletado CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com PSCA humano



Células efectoras: simio 4119 LnPx
Células Alvo: CHO transfectado com simio PSCA



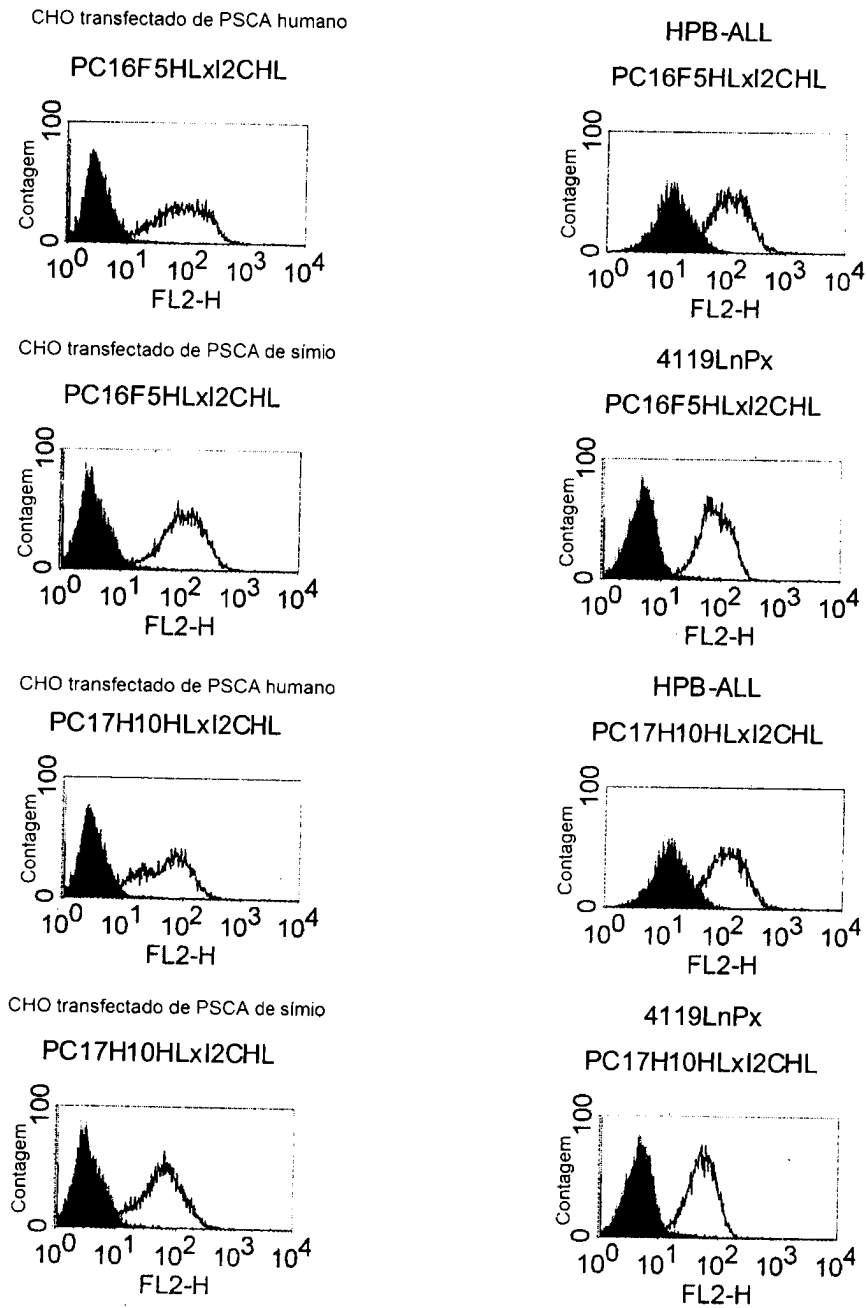


Figura 48a

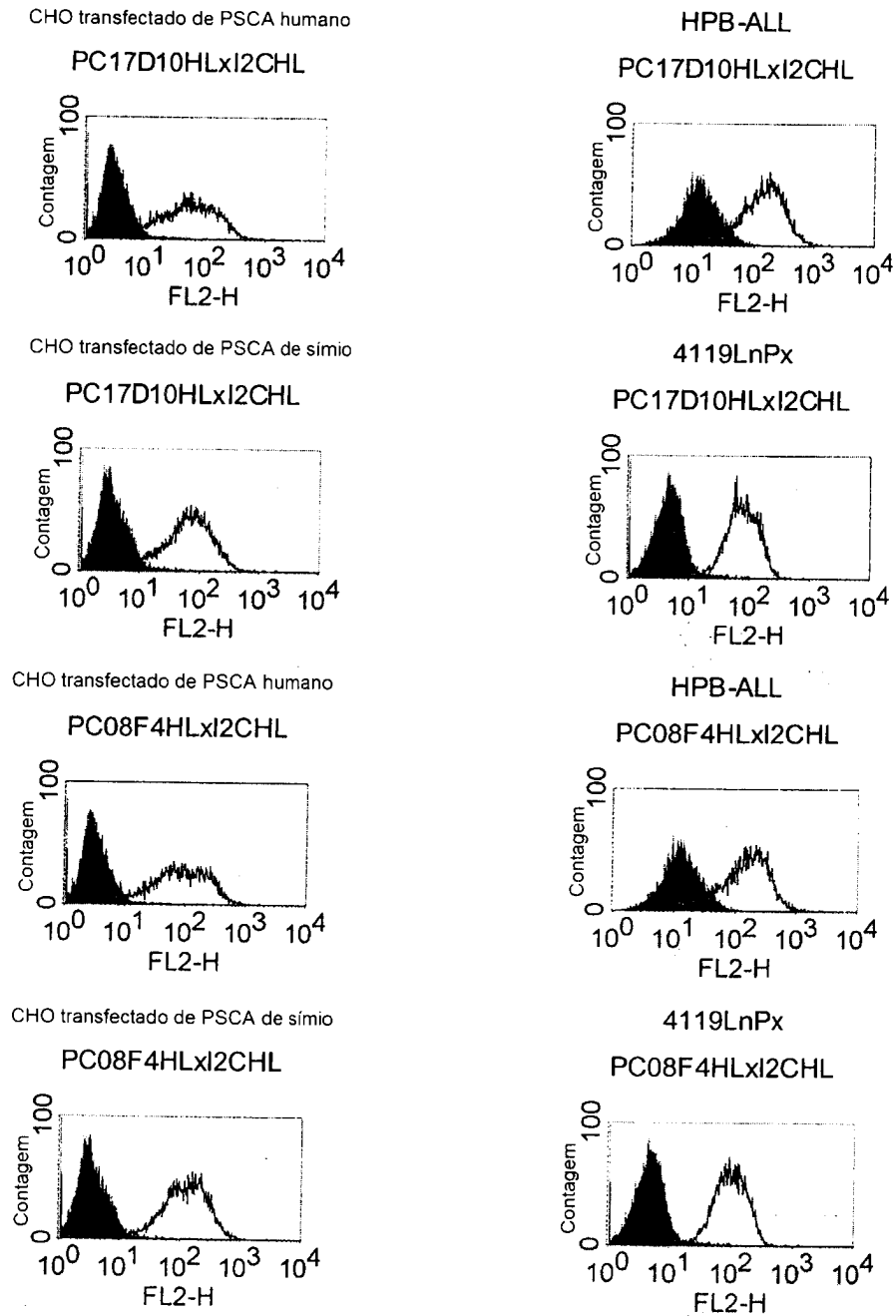


Figura 48b

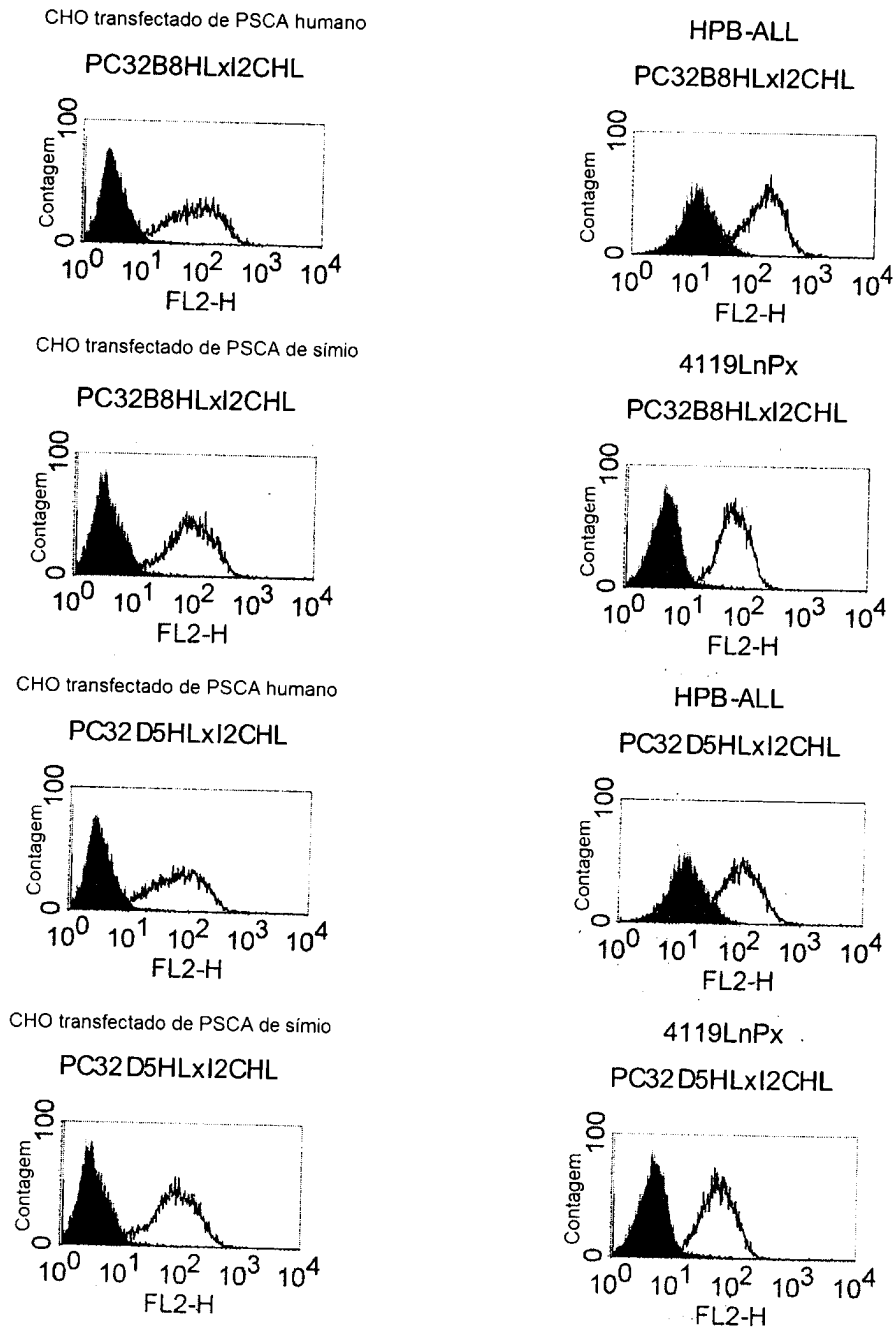


Figura 48c

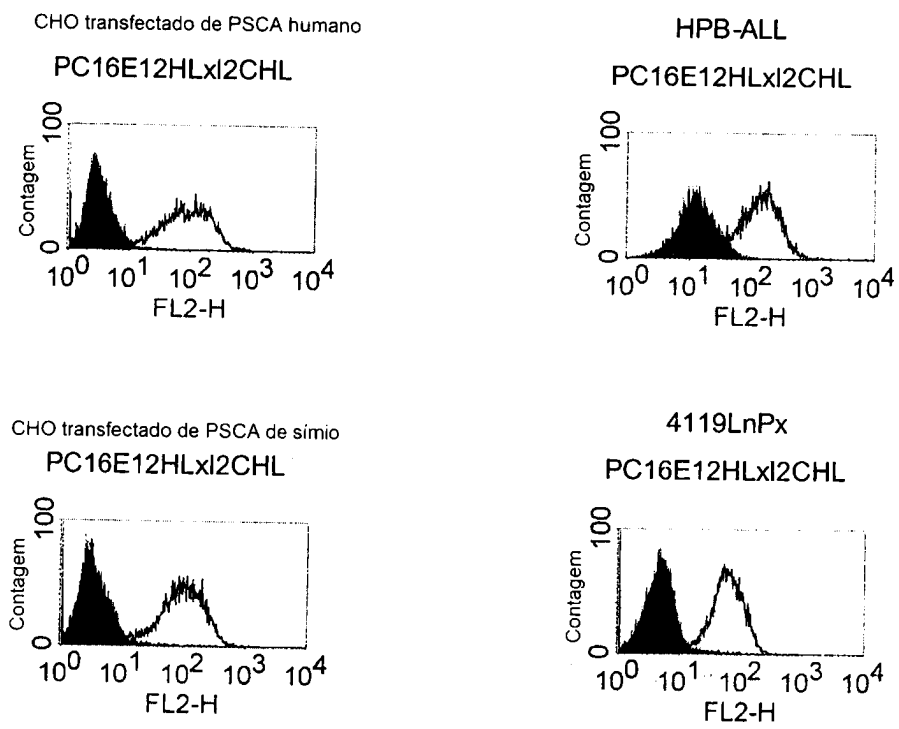
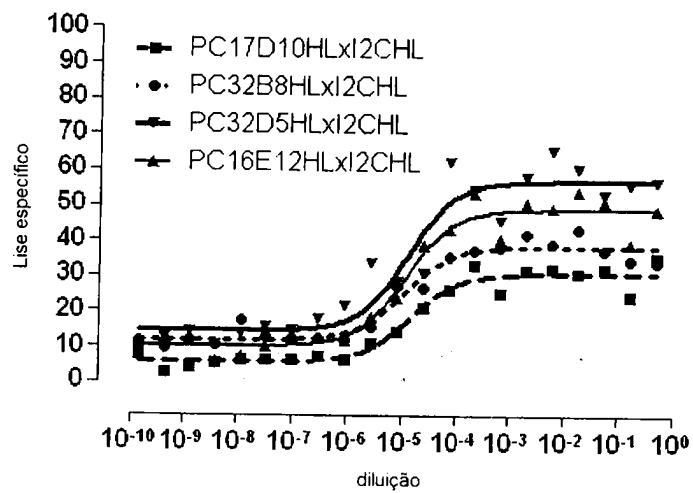


Figura 48d

Células T efetoras: PBMC de humanos depletado CD4/CD56 estimulado
 Células Alvo: CHO transfectado com PSCA humano



Células T efetoras: simio 4119 LnPx
 Células Alvo: CHO transfectado com simio PSCA

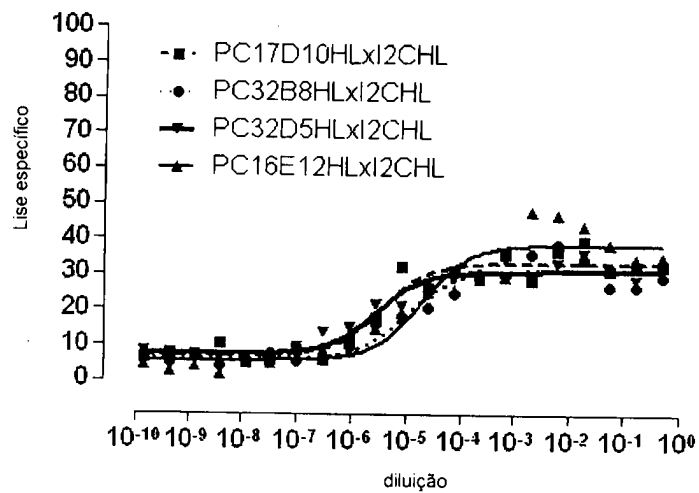
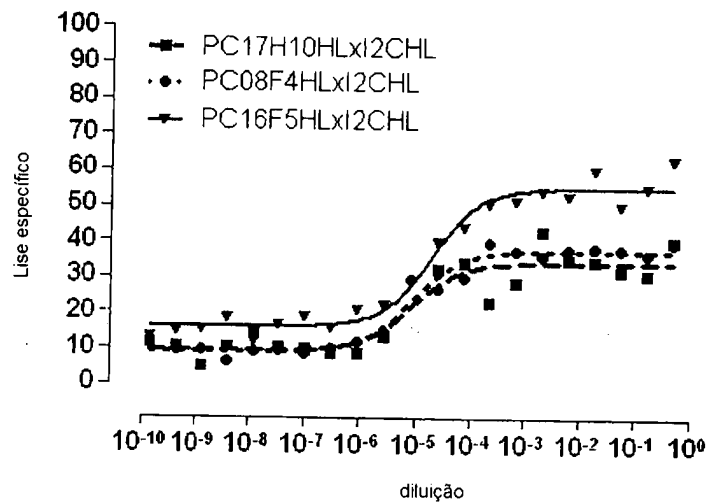


Figura 49a

Células T efetoras: PBMC de humanos depletado CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com PSCA humano



Células T efetoras: simio 4119 LnPx
Células Alvo: CHO transfectado com simio PSCA

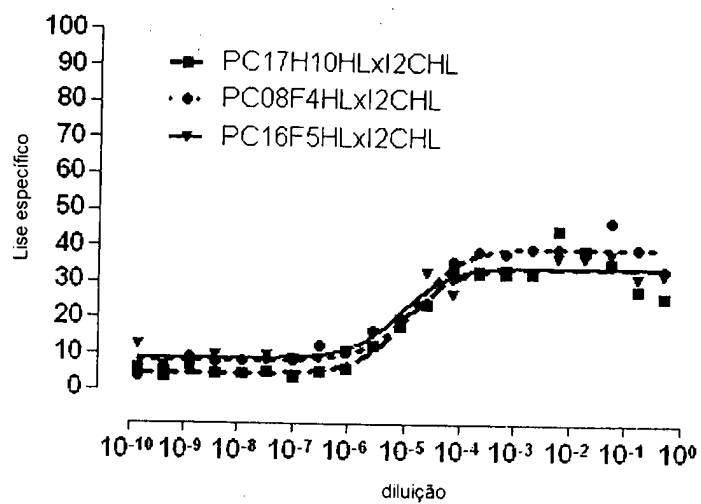


Figura 49b

Figura 50a

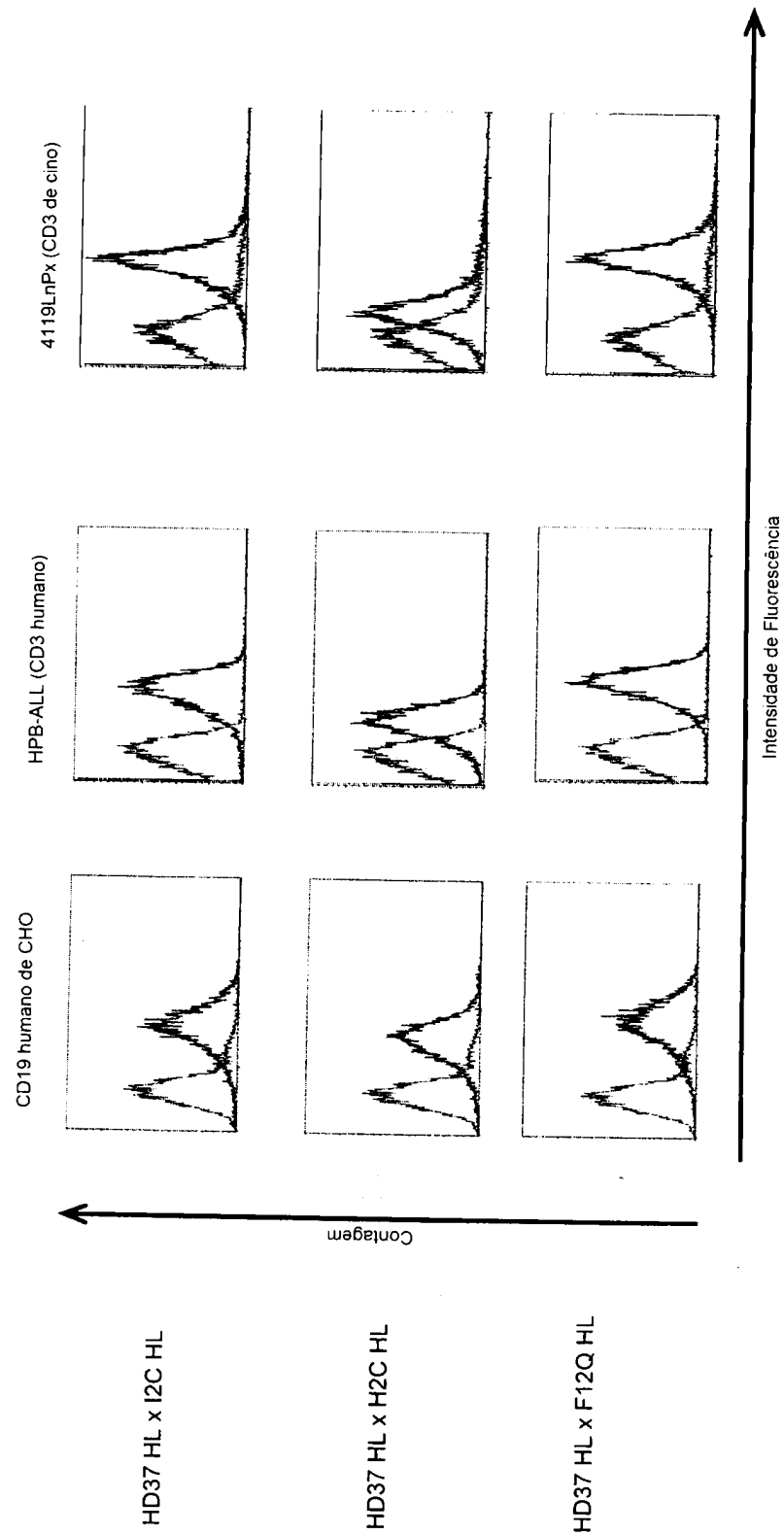


Figura 50b

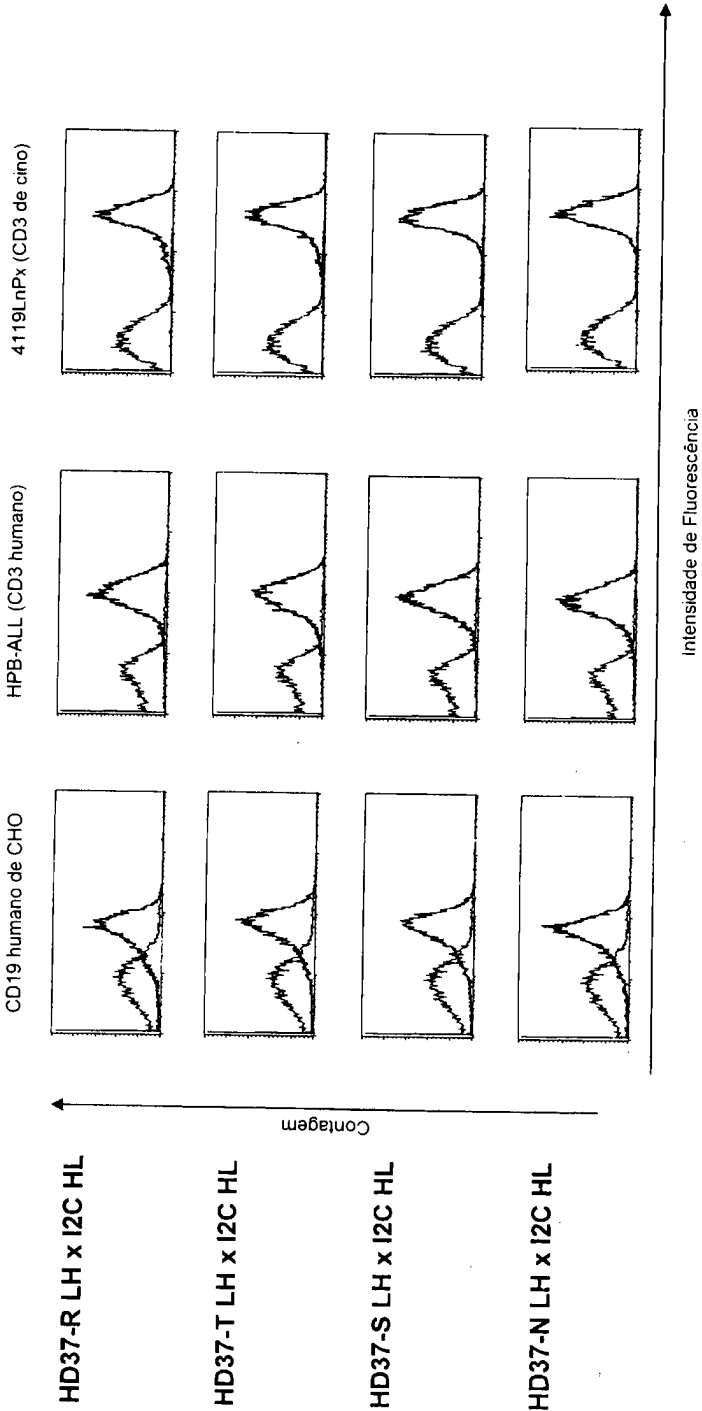


Figura 50c

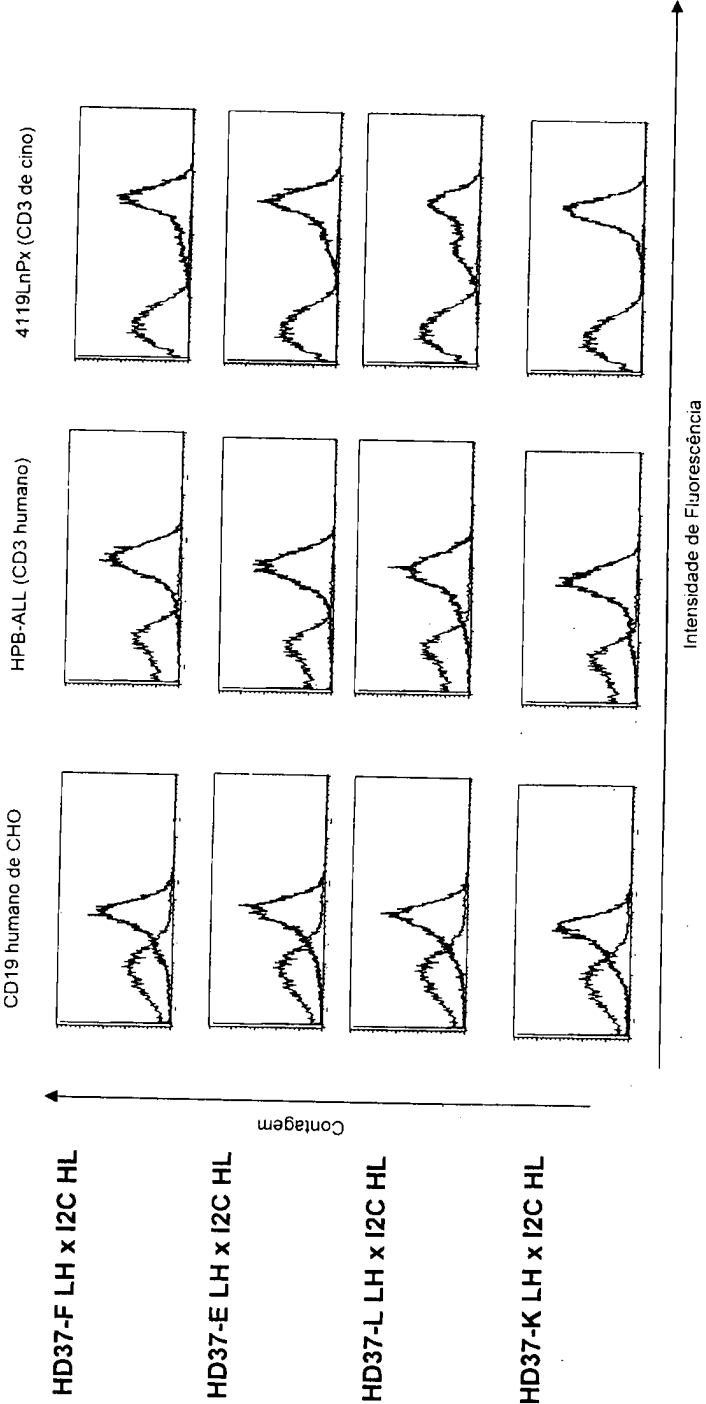


Figura 50d

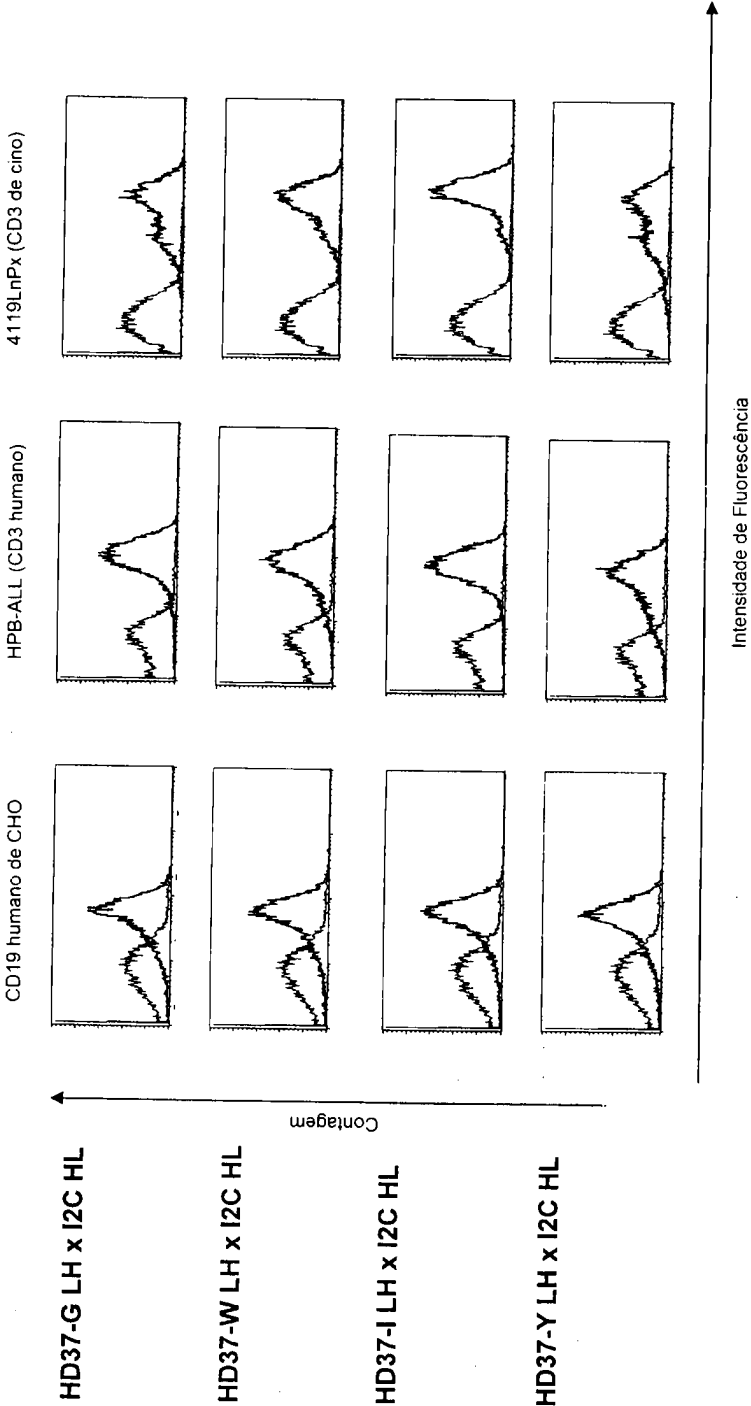


Figura 50e

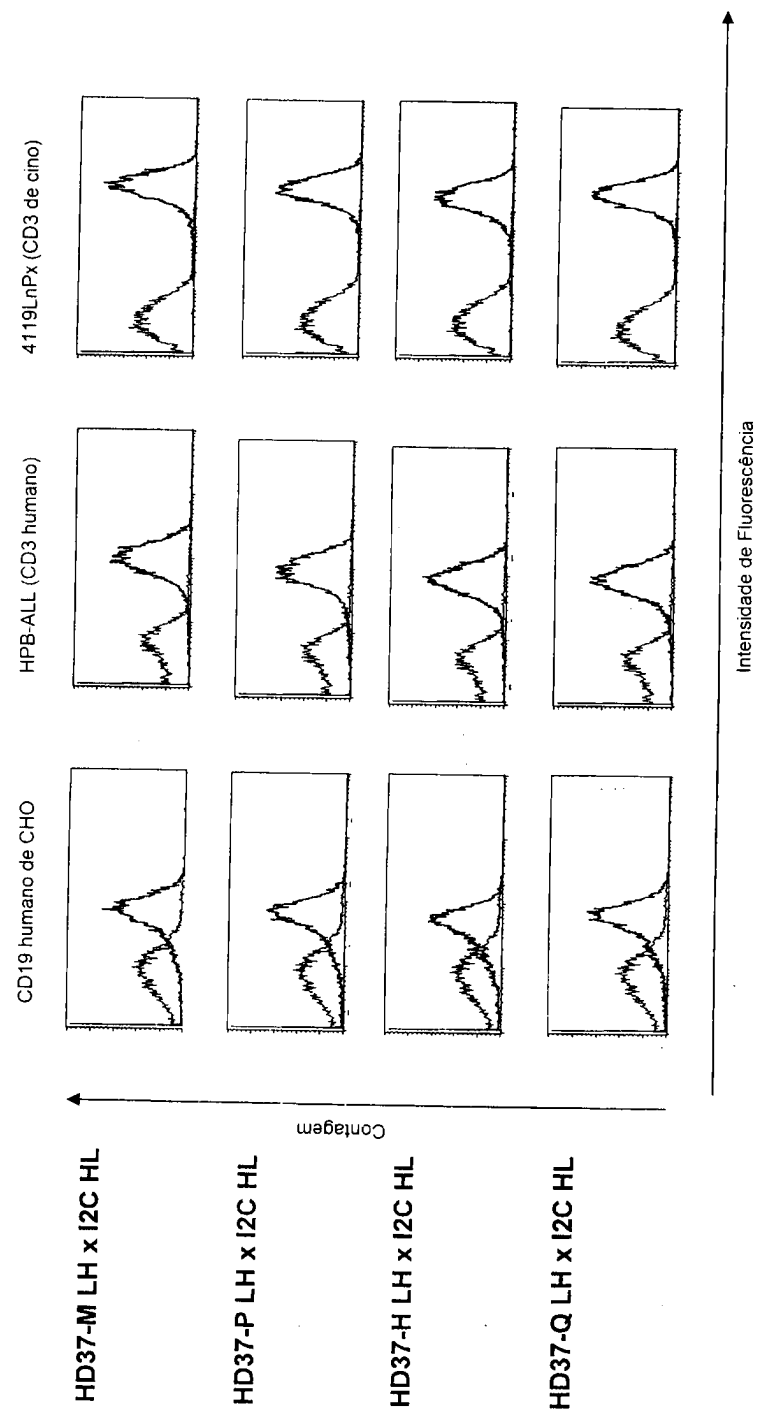


Figura 50f

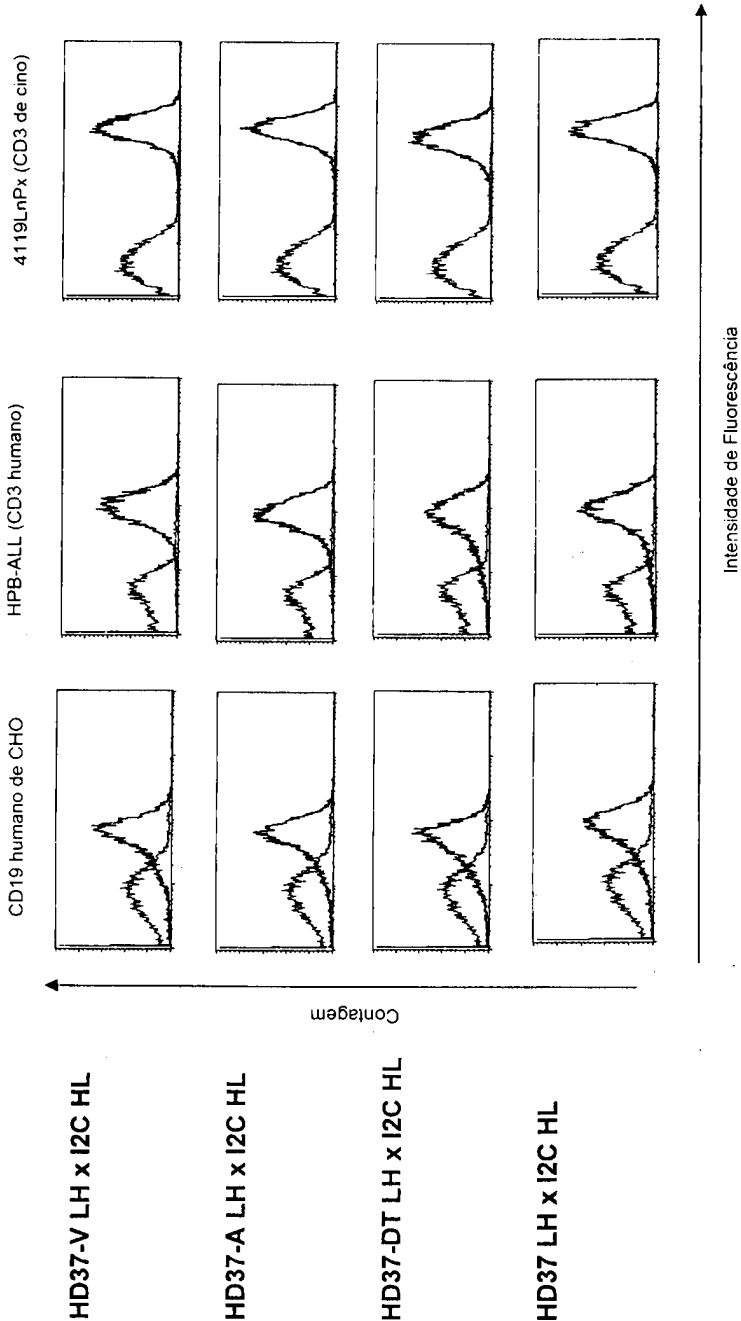


Figura 50g

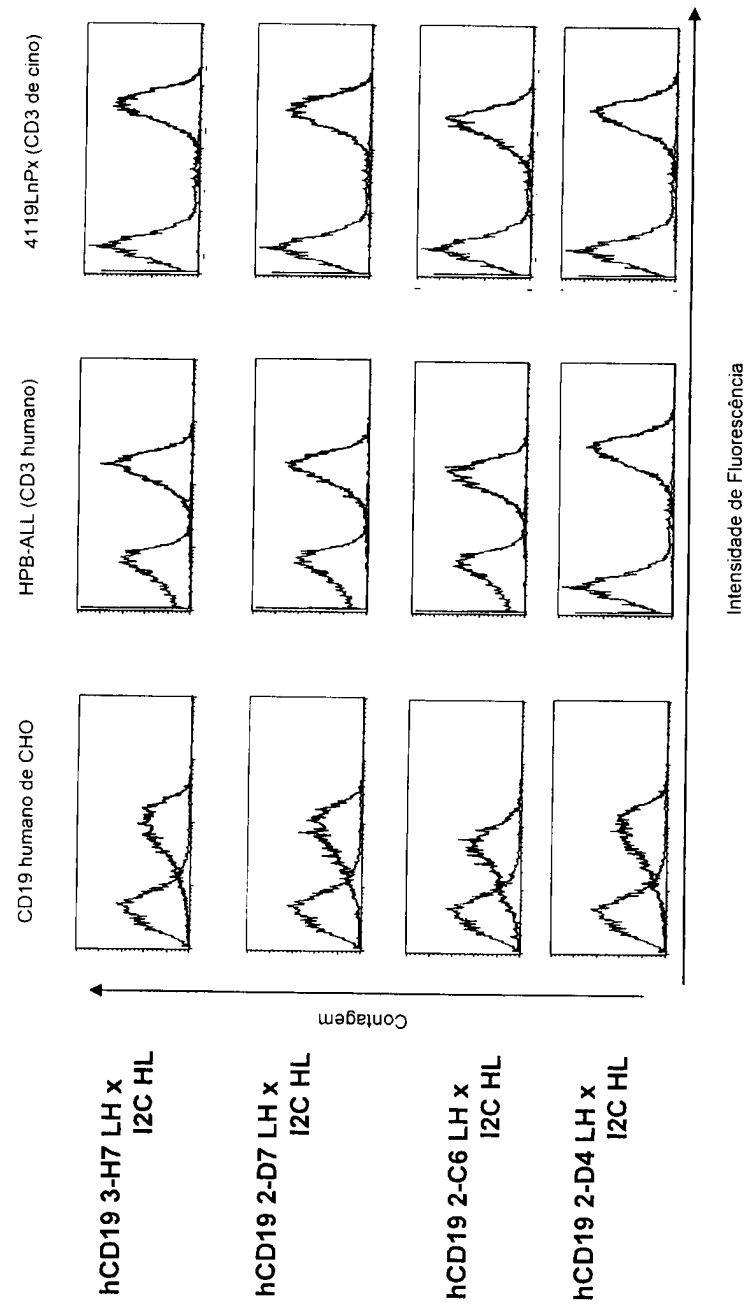


Figura 50h

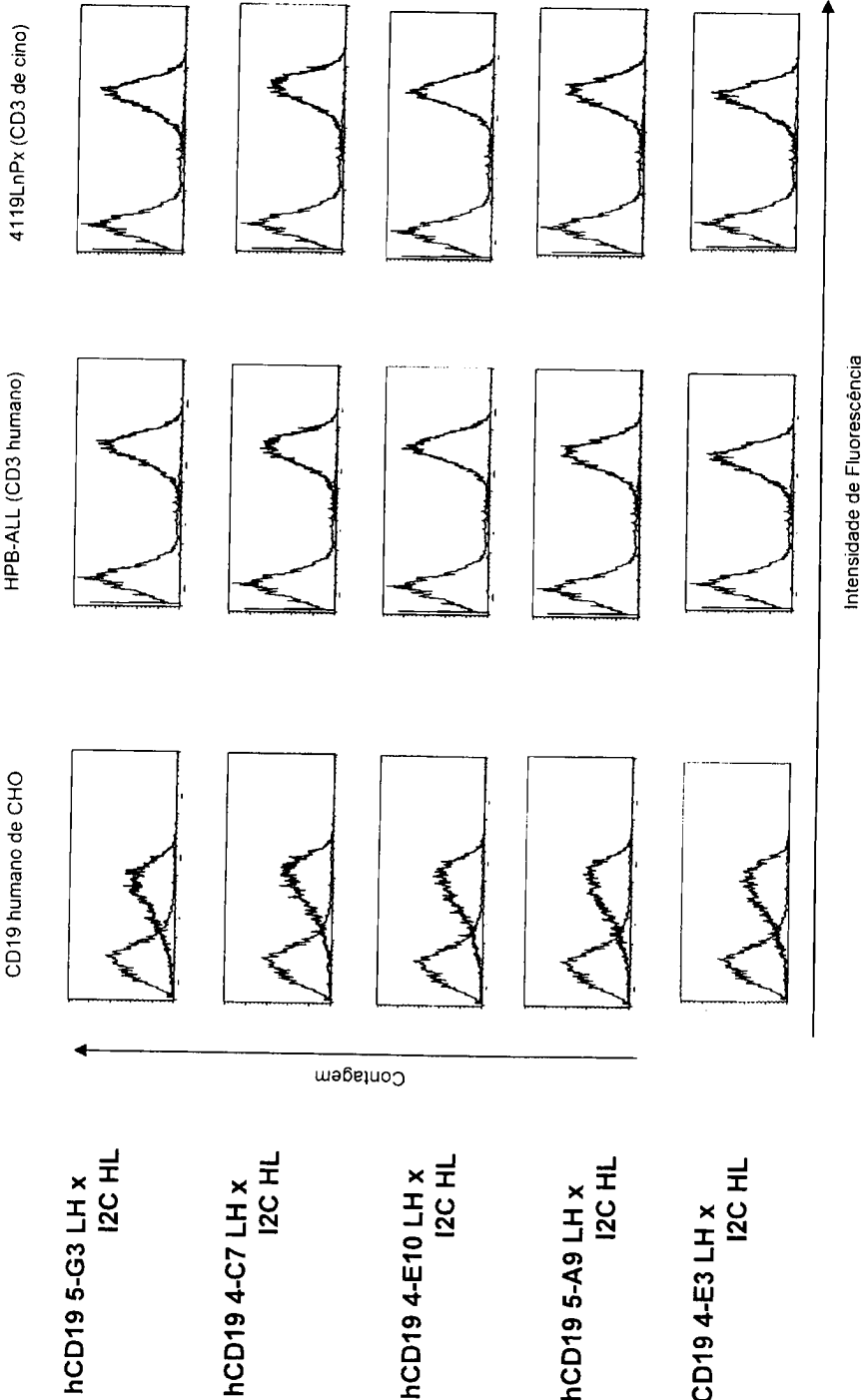


Figura 50i

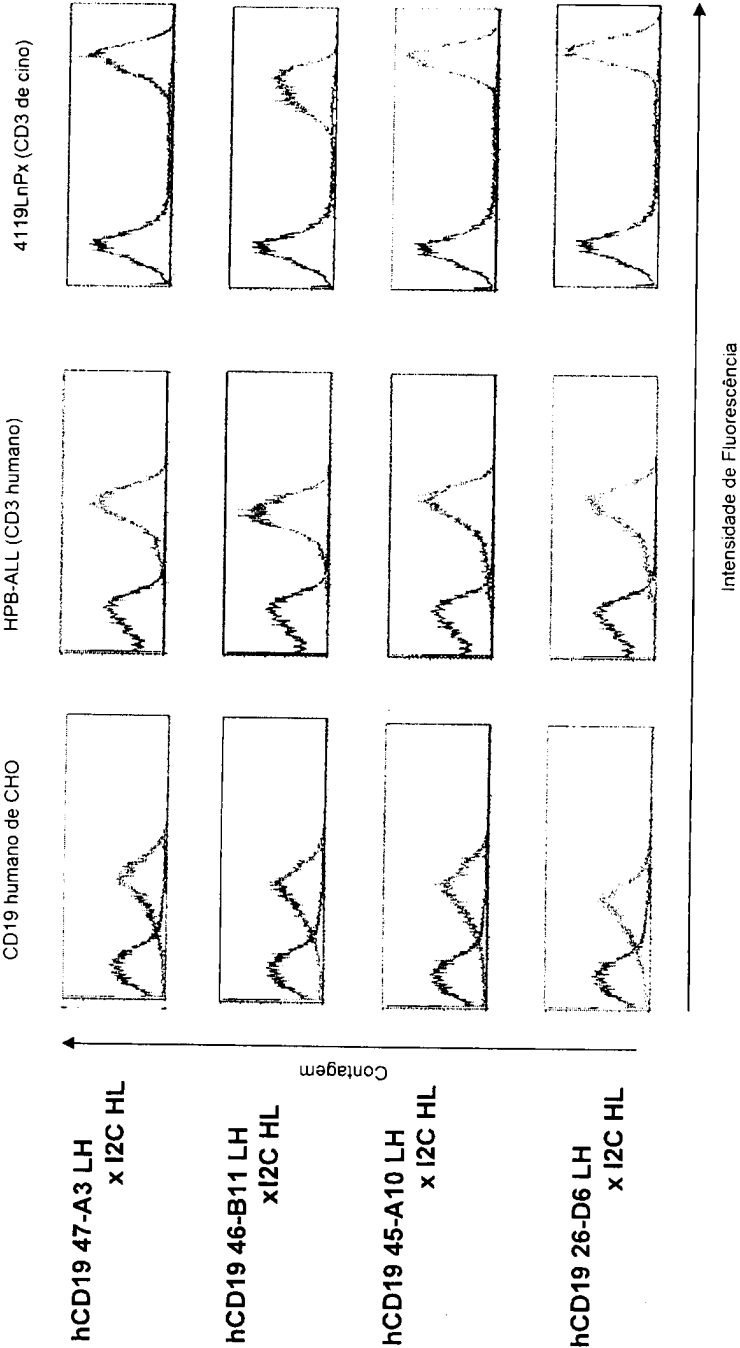
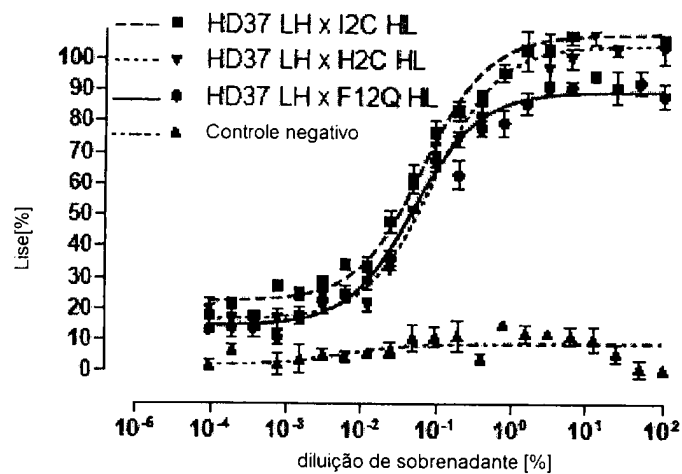


Figura 51(1)

A) Células efectoras: CD56 de PBMC humano desestimulado depletado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano



B) Células efectoras: 4119LnPx
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano

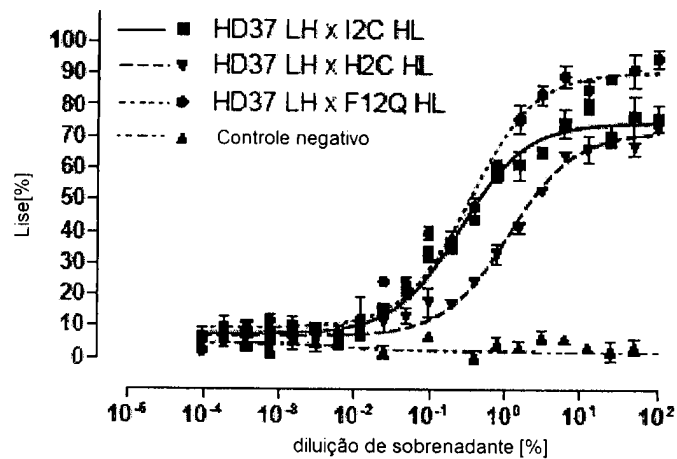
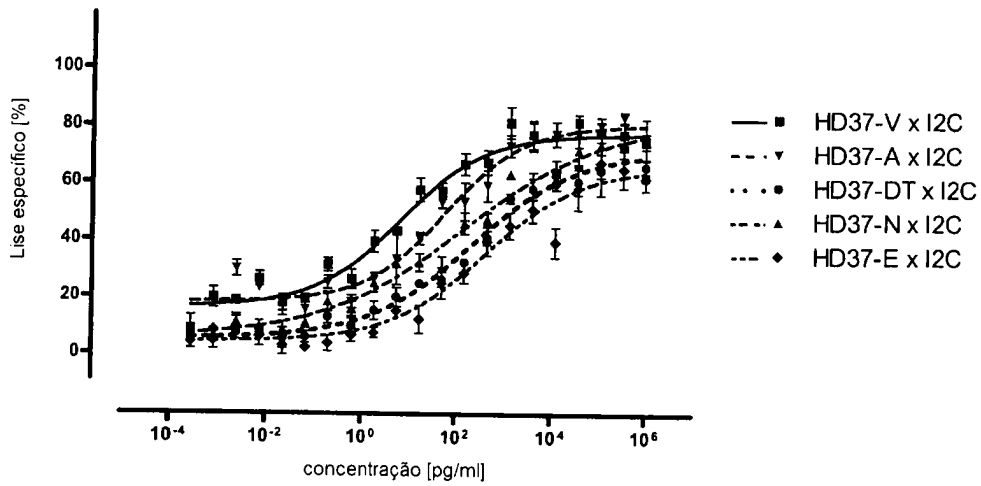


Figura 51(2)

C) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano



D) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano

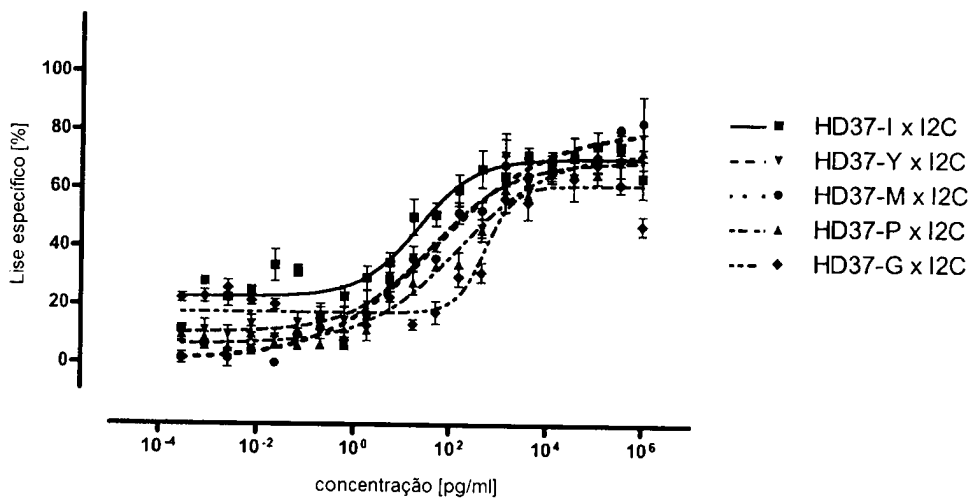
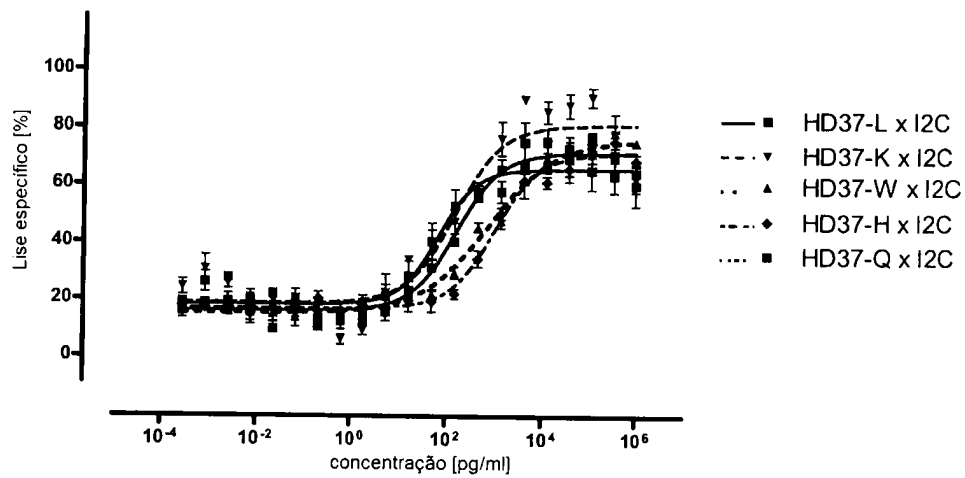


Figura 51(3)

E) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano



F) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano

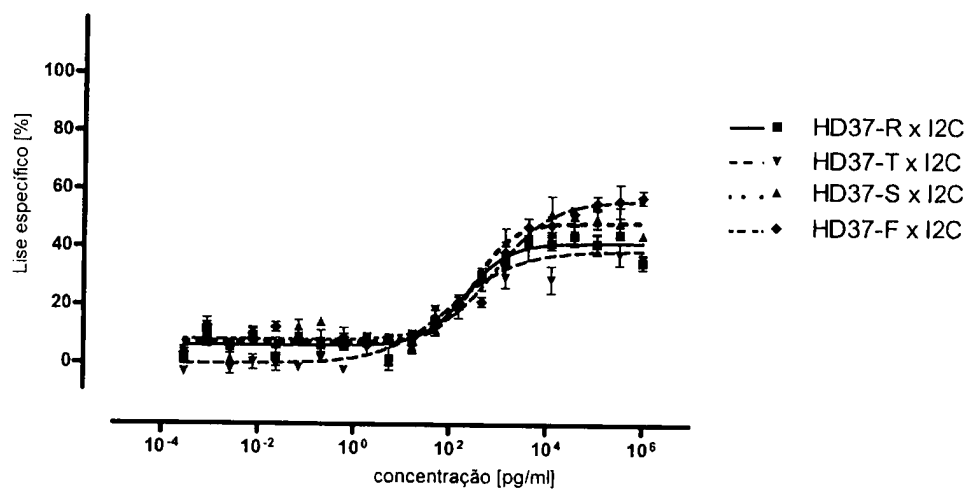
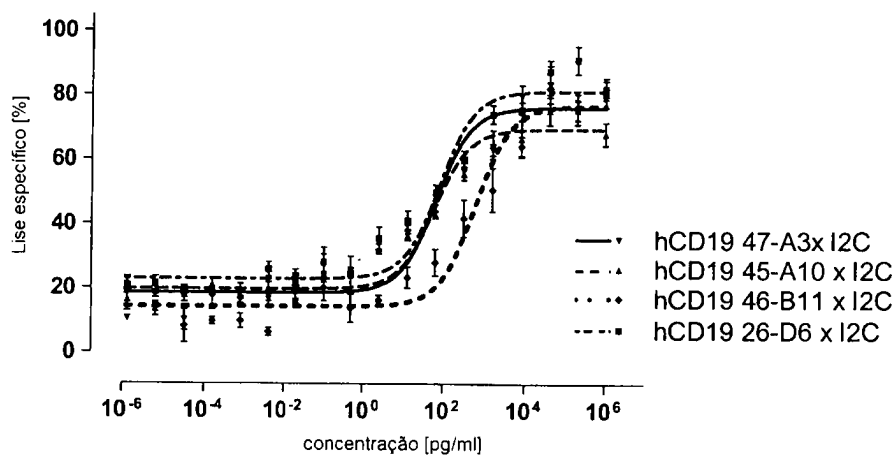


Figura 51(4)

G) Células efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano



H) Células efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano

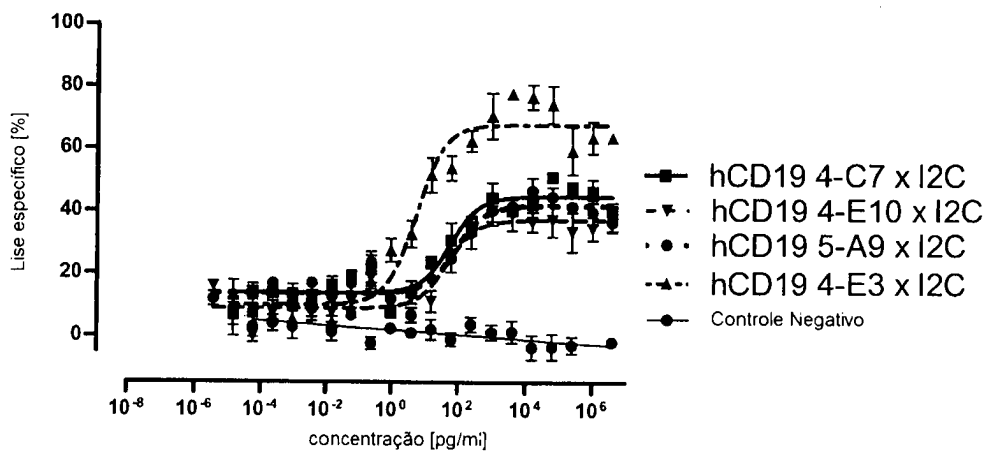


Figura 51(5)

1) Células efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células Alvo: CHO transfectado com CD19 humano

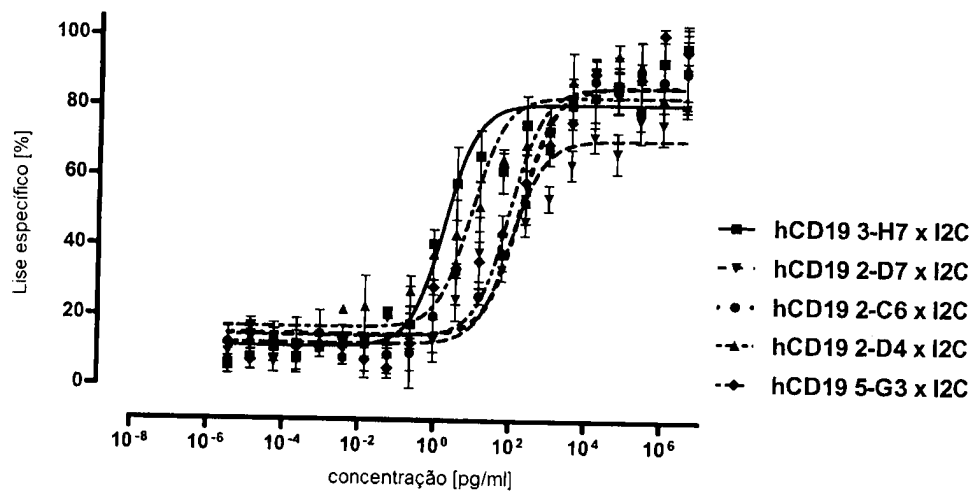


Figura 52a

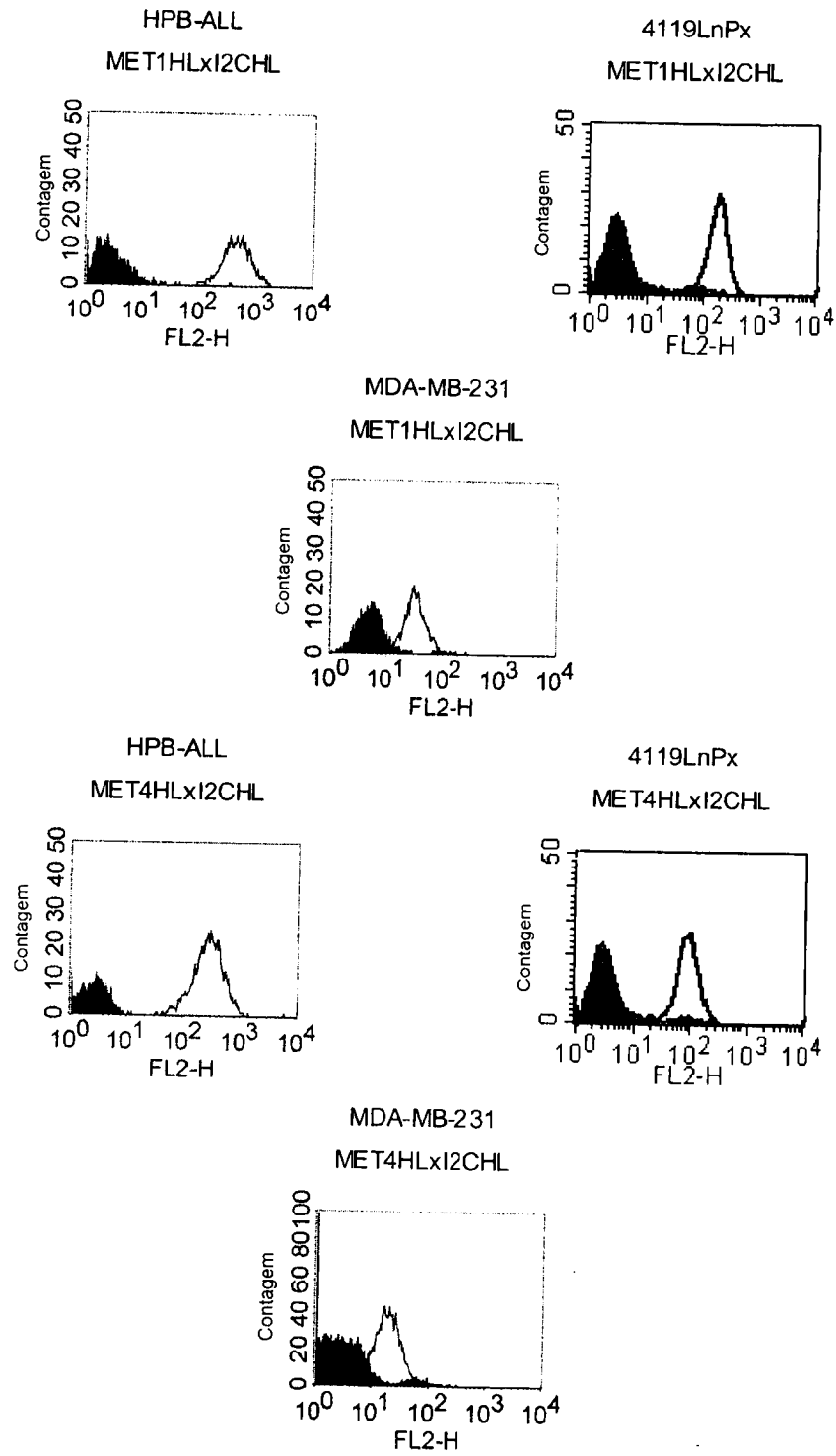


Figura 52b

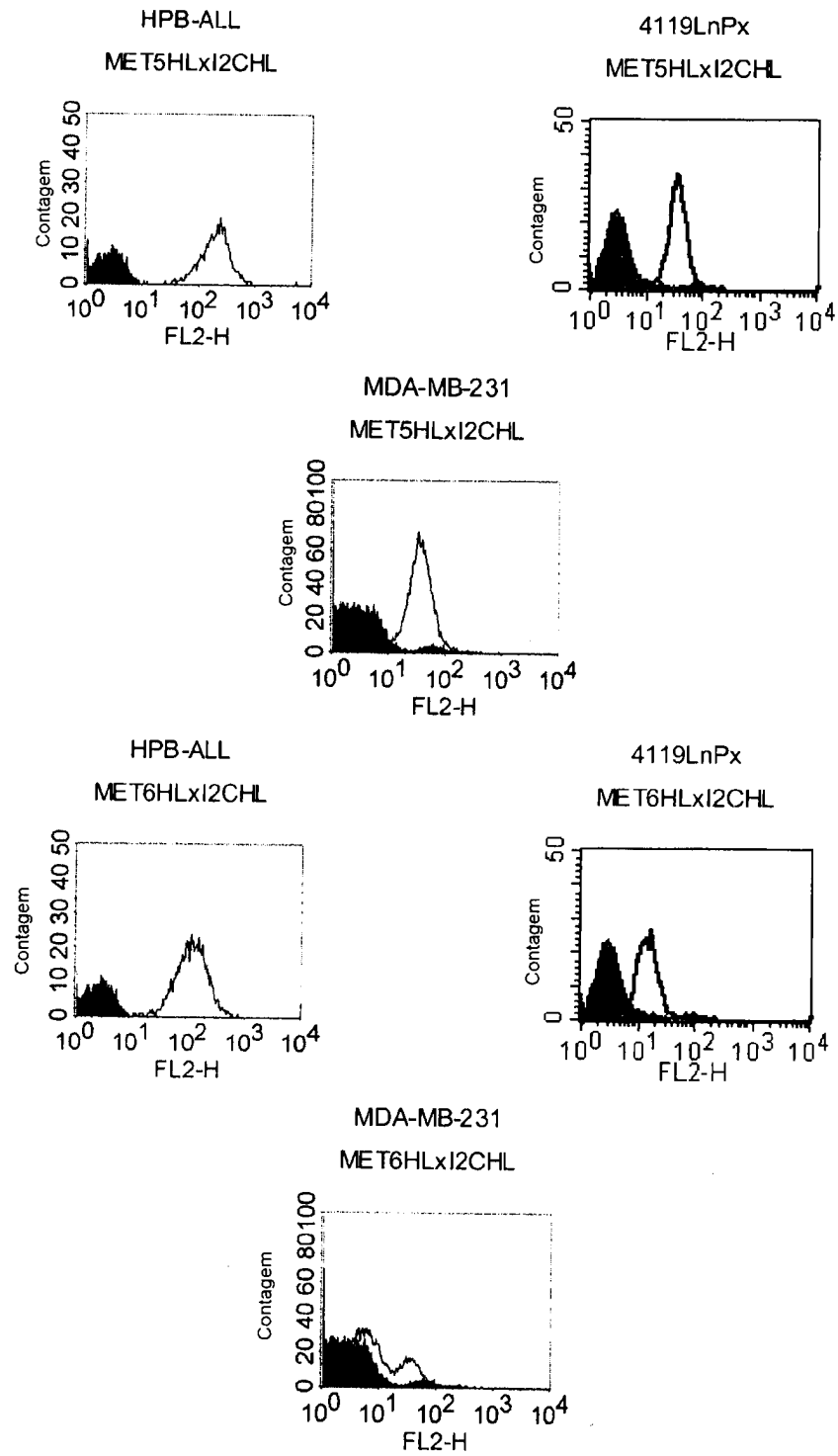


Figura 52c

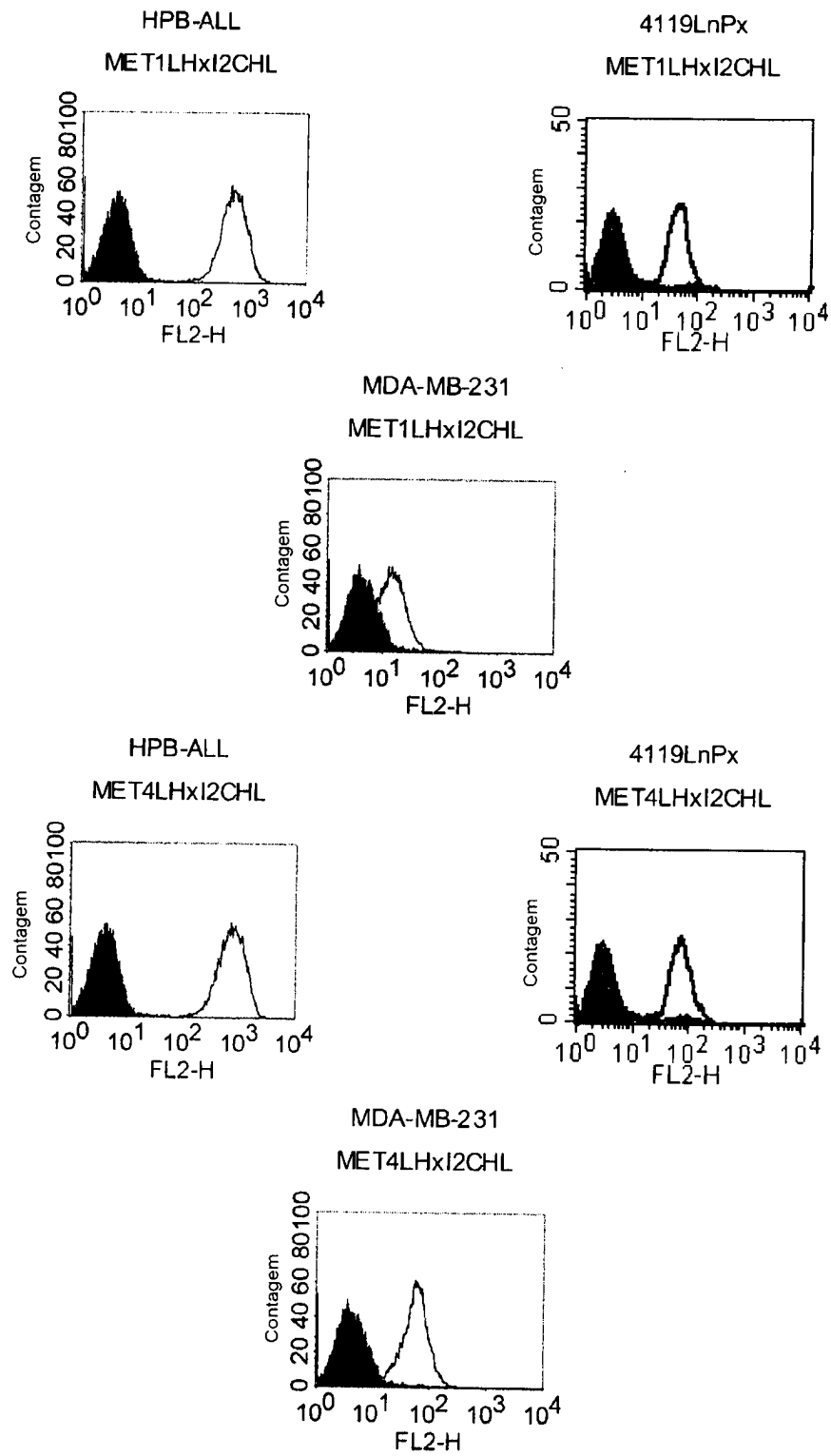


Figura 52d

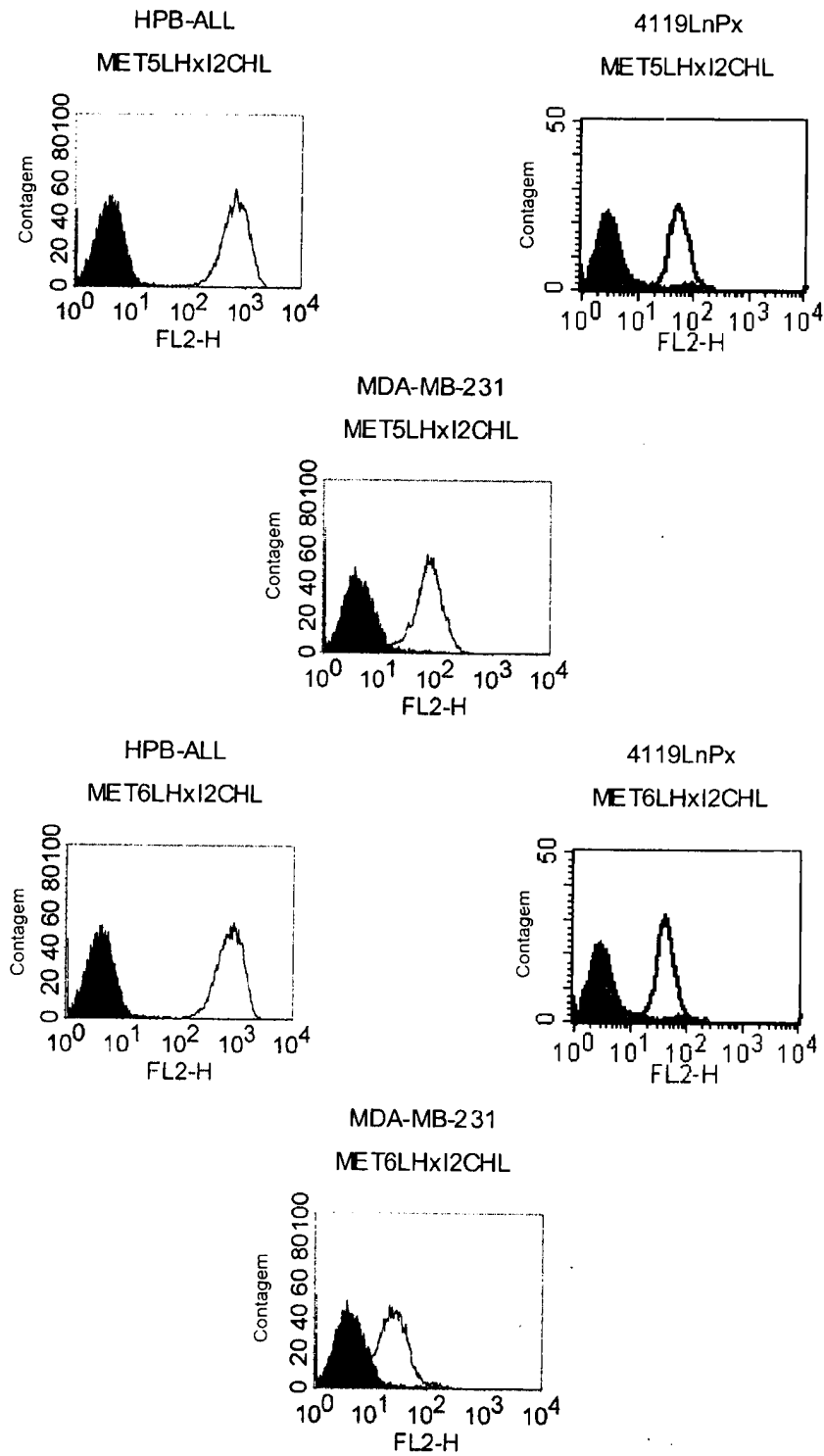


Figura 52e

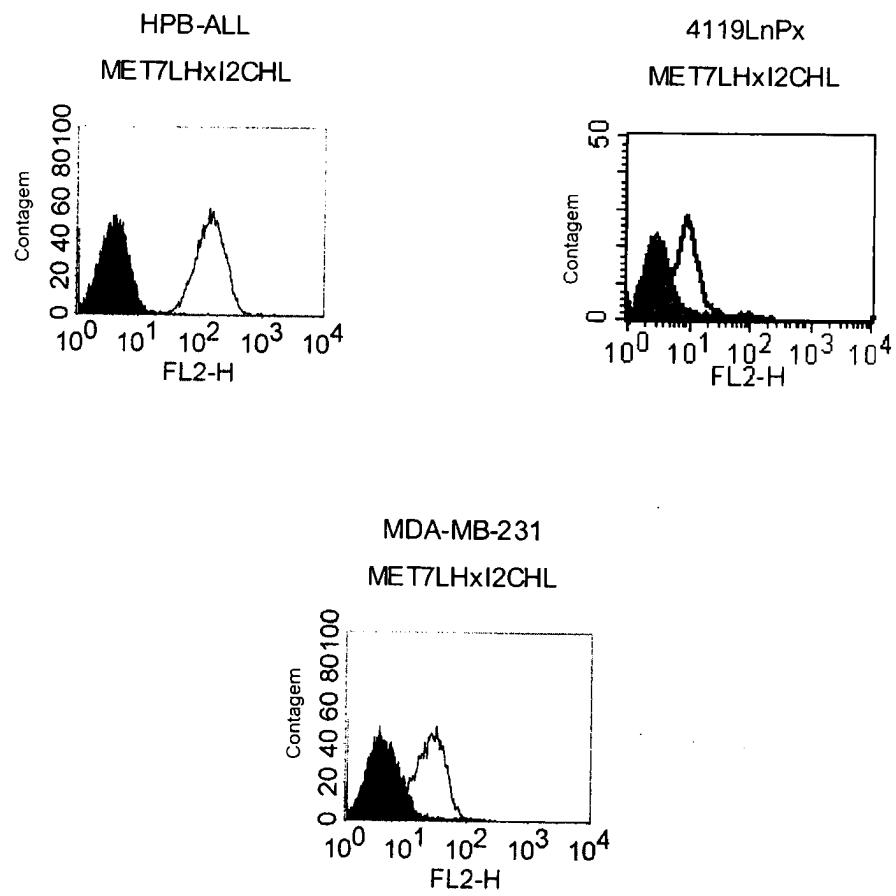
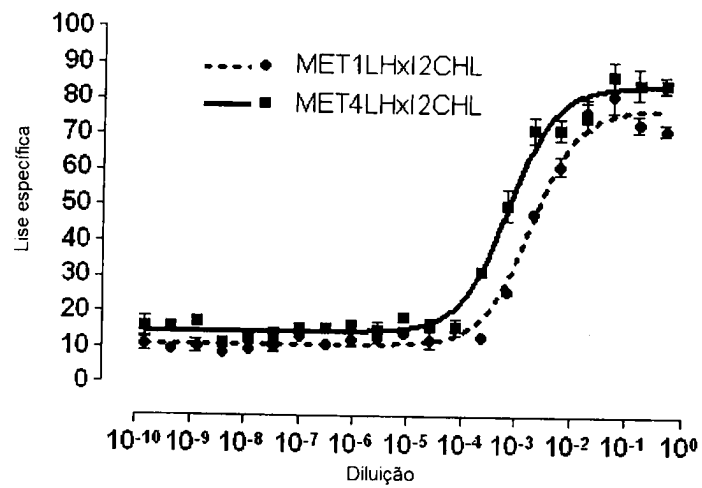


Figura 53a

Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: MDA-MB-231



Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: MDA-MB-231

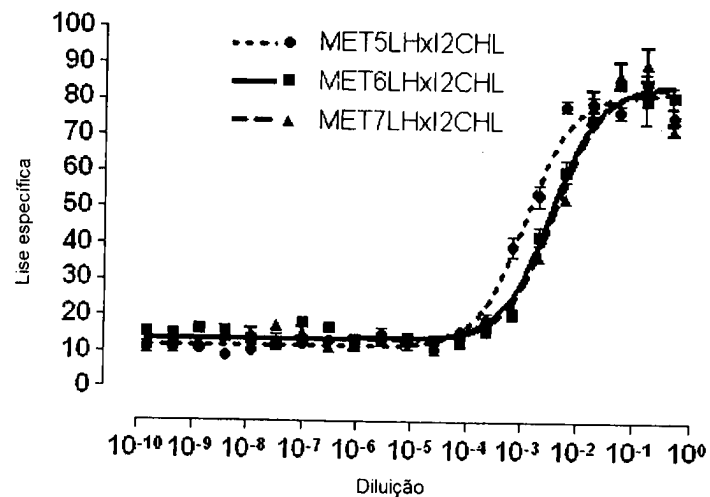
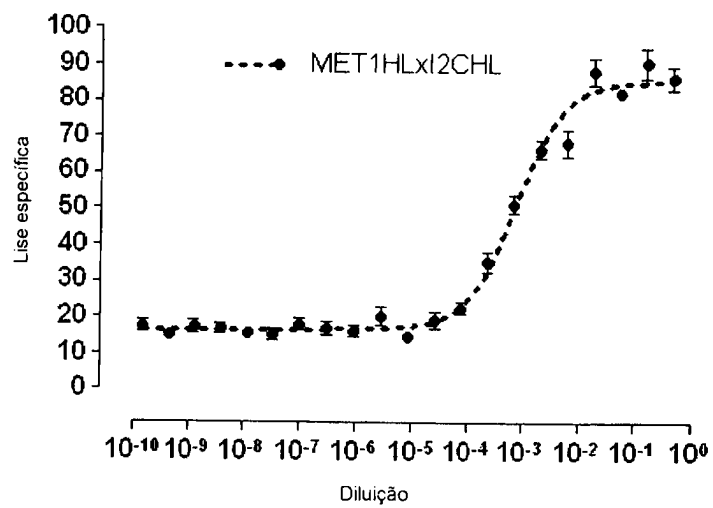
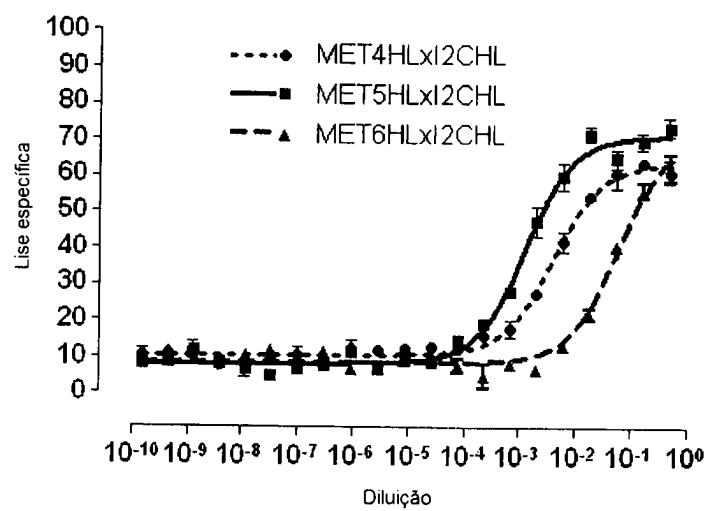


Figura 53b

Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: MDA-MB-231



Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: MDA-MB-231



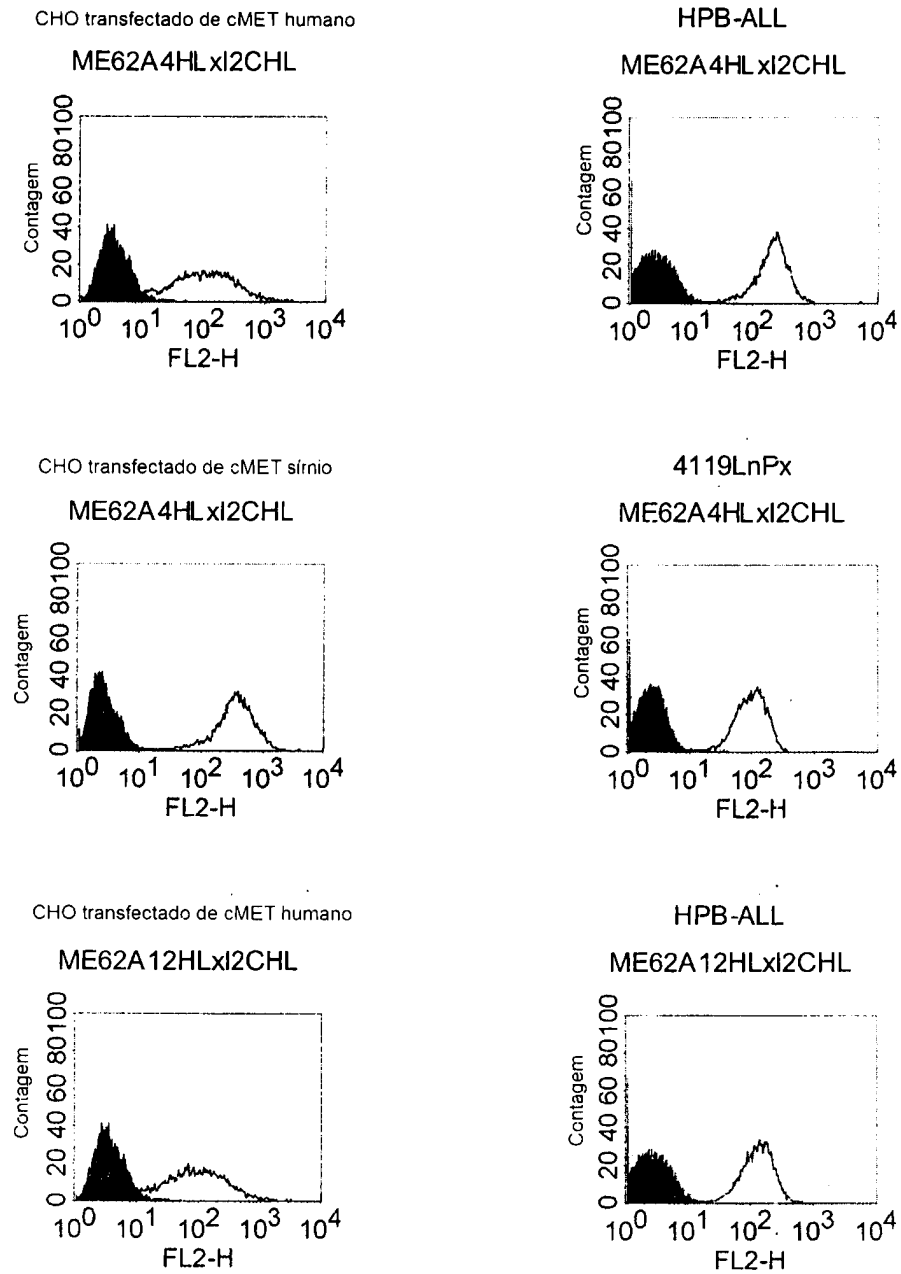


Figura 54a

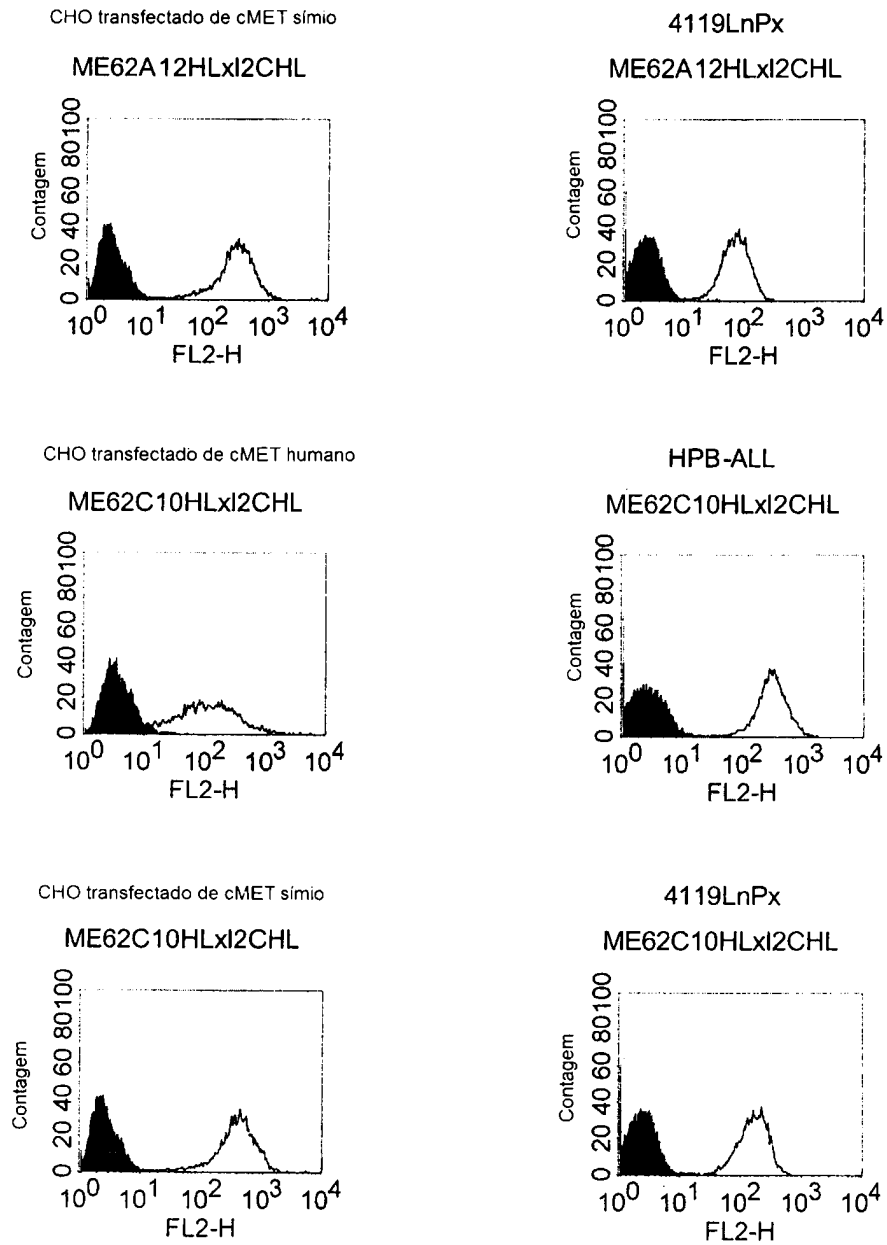


Figura 54b

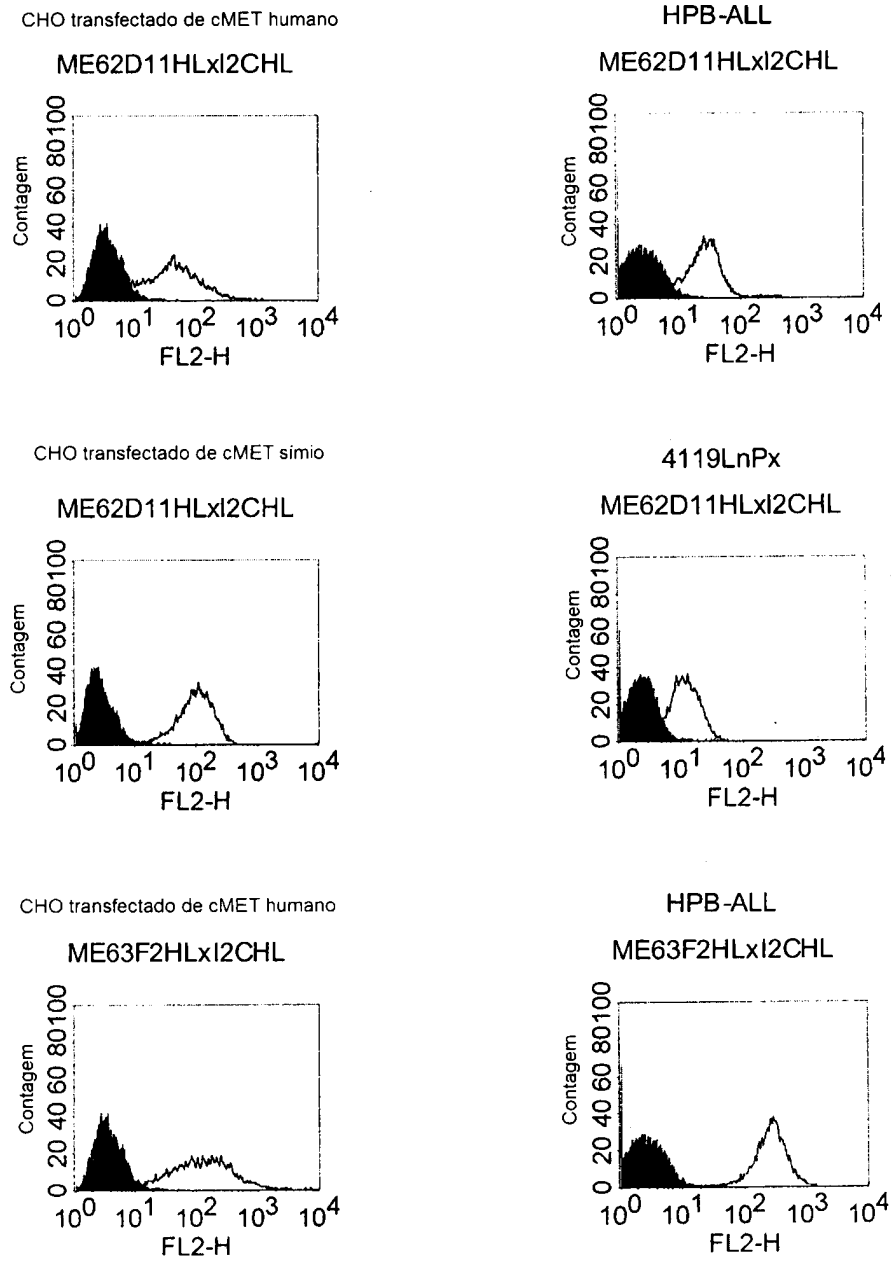


Figura 54c

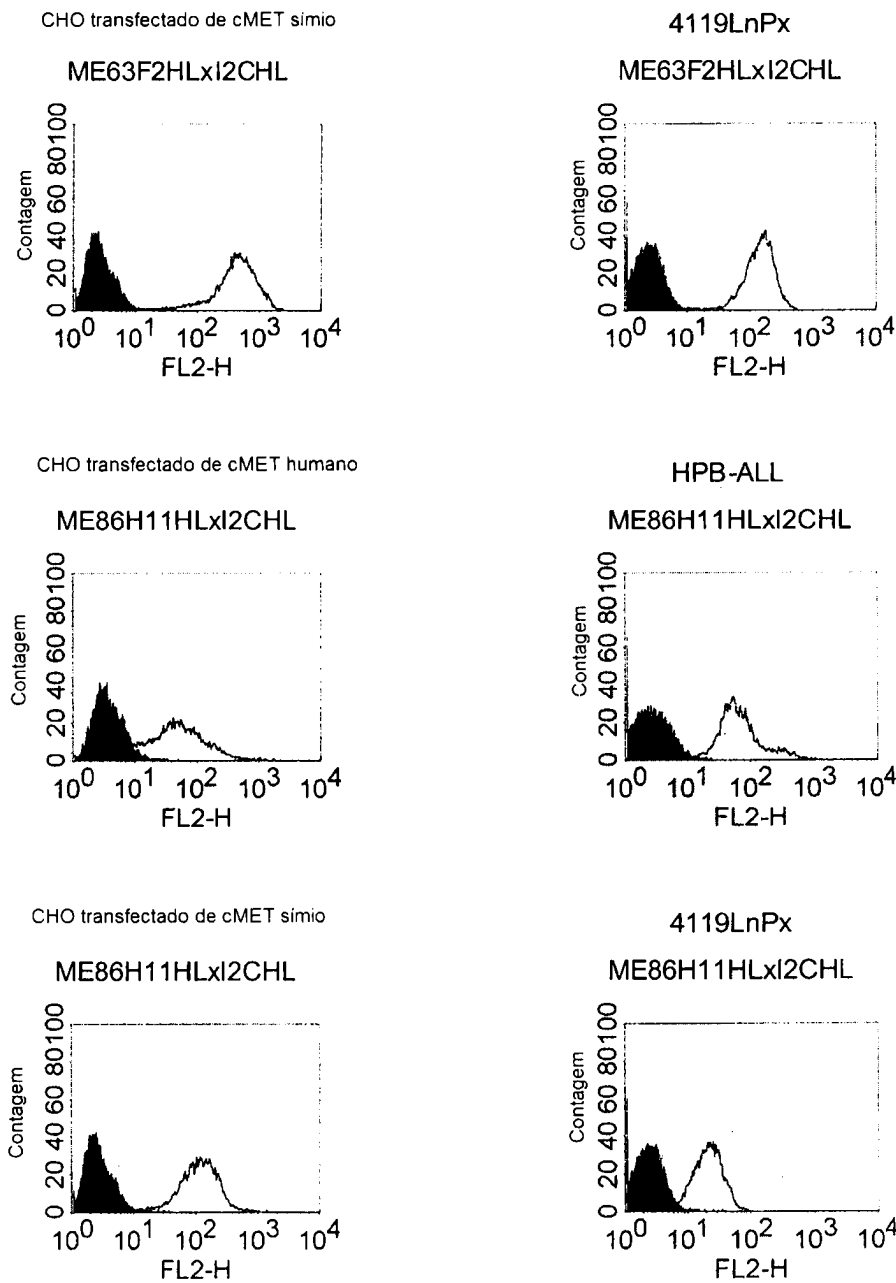
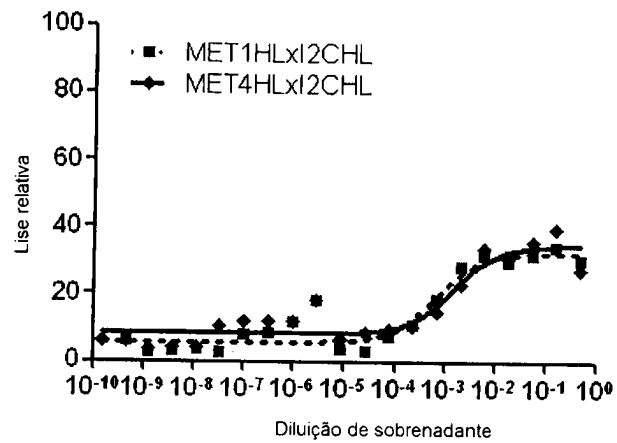


Figura 54d

Células T efectoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com cMET símio



Células T efectoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com cMET
símio

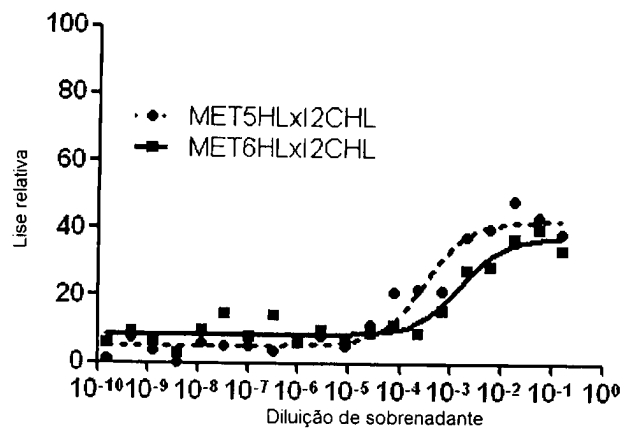
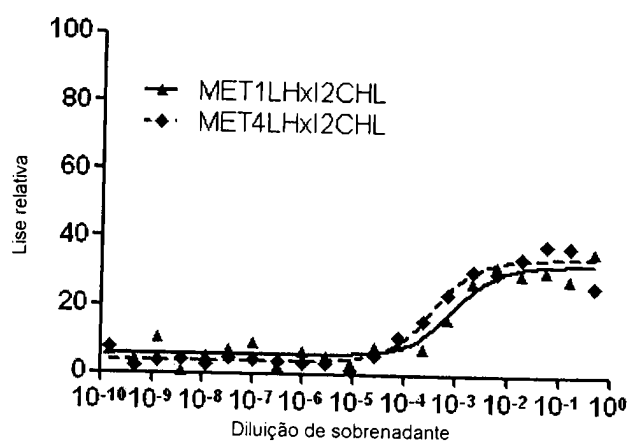


Figura 55a

Células T efetoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com cMET símio



Células T efetoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com cMET símio

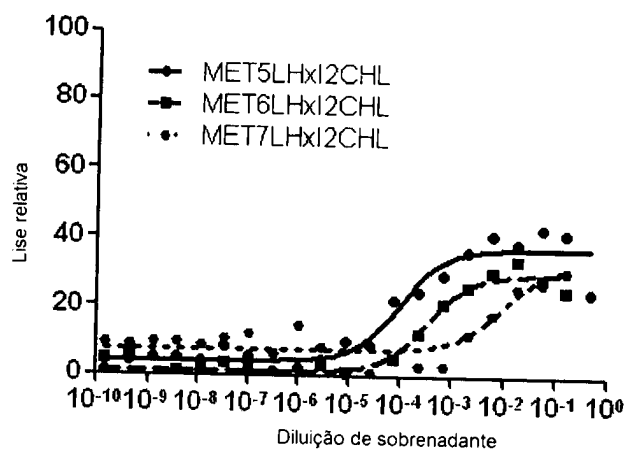


Figura 55b

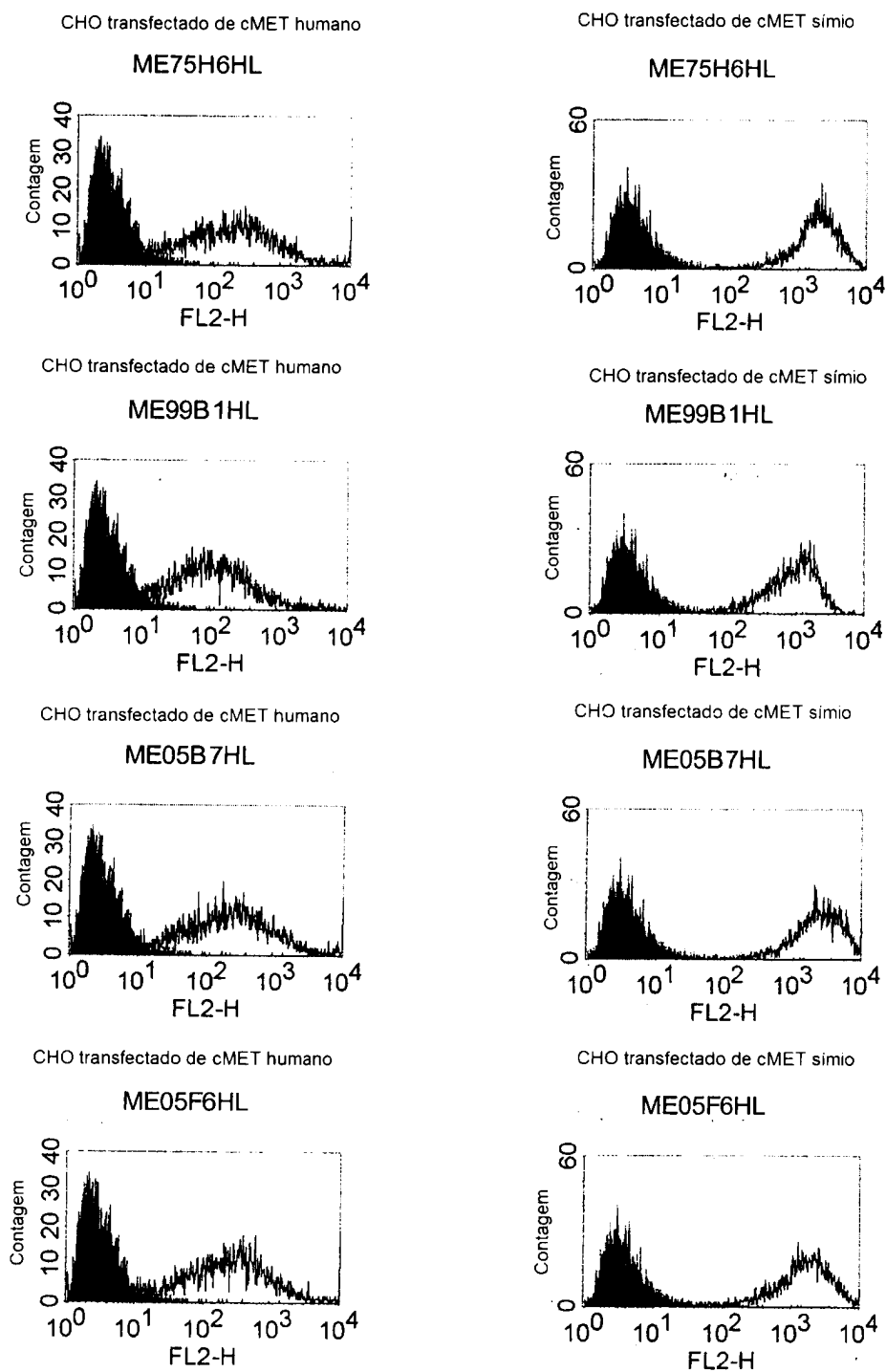


Figura 56a

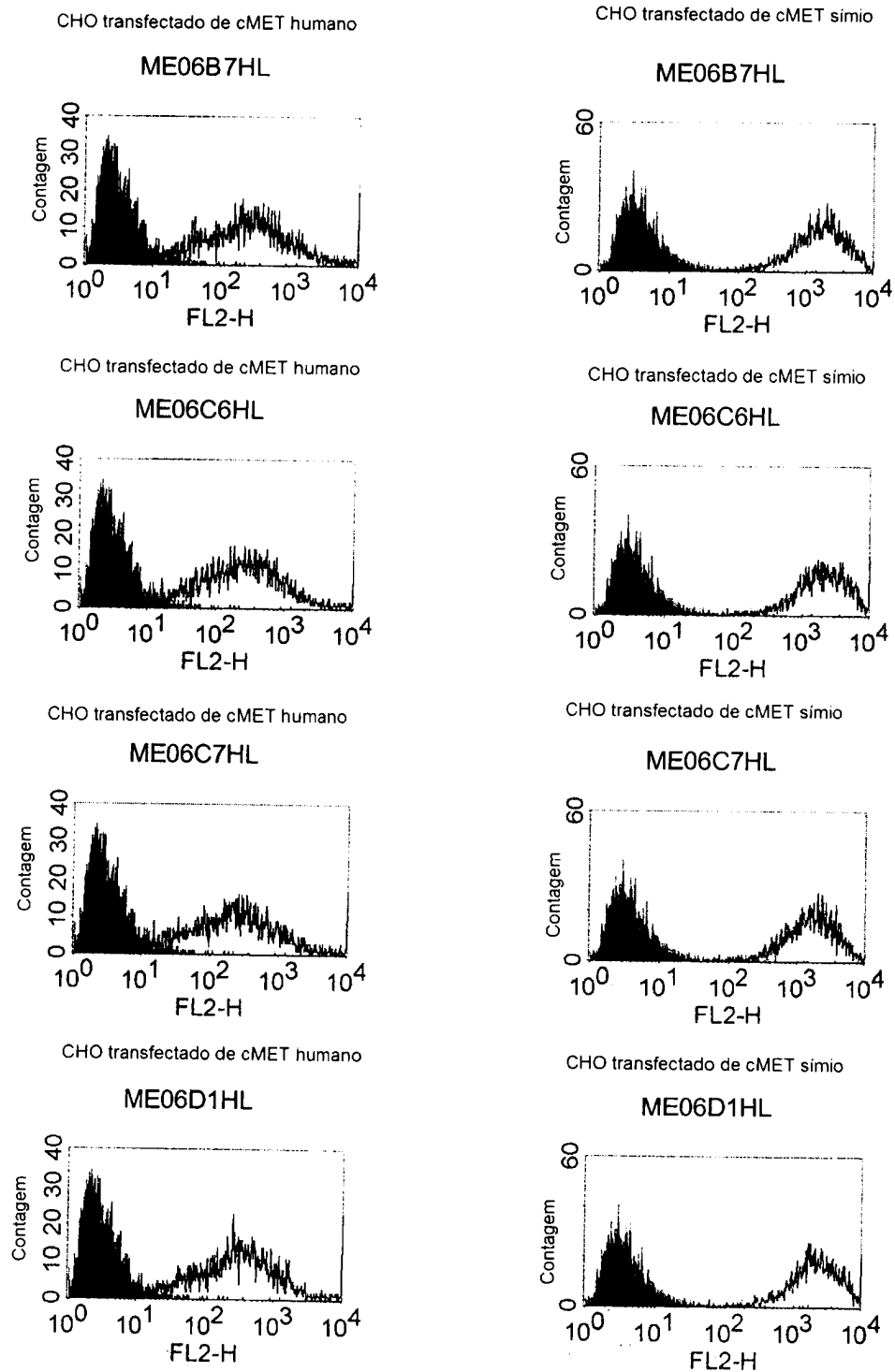


Figura 56b

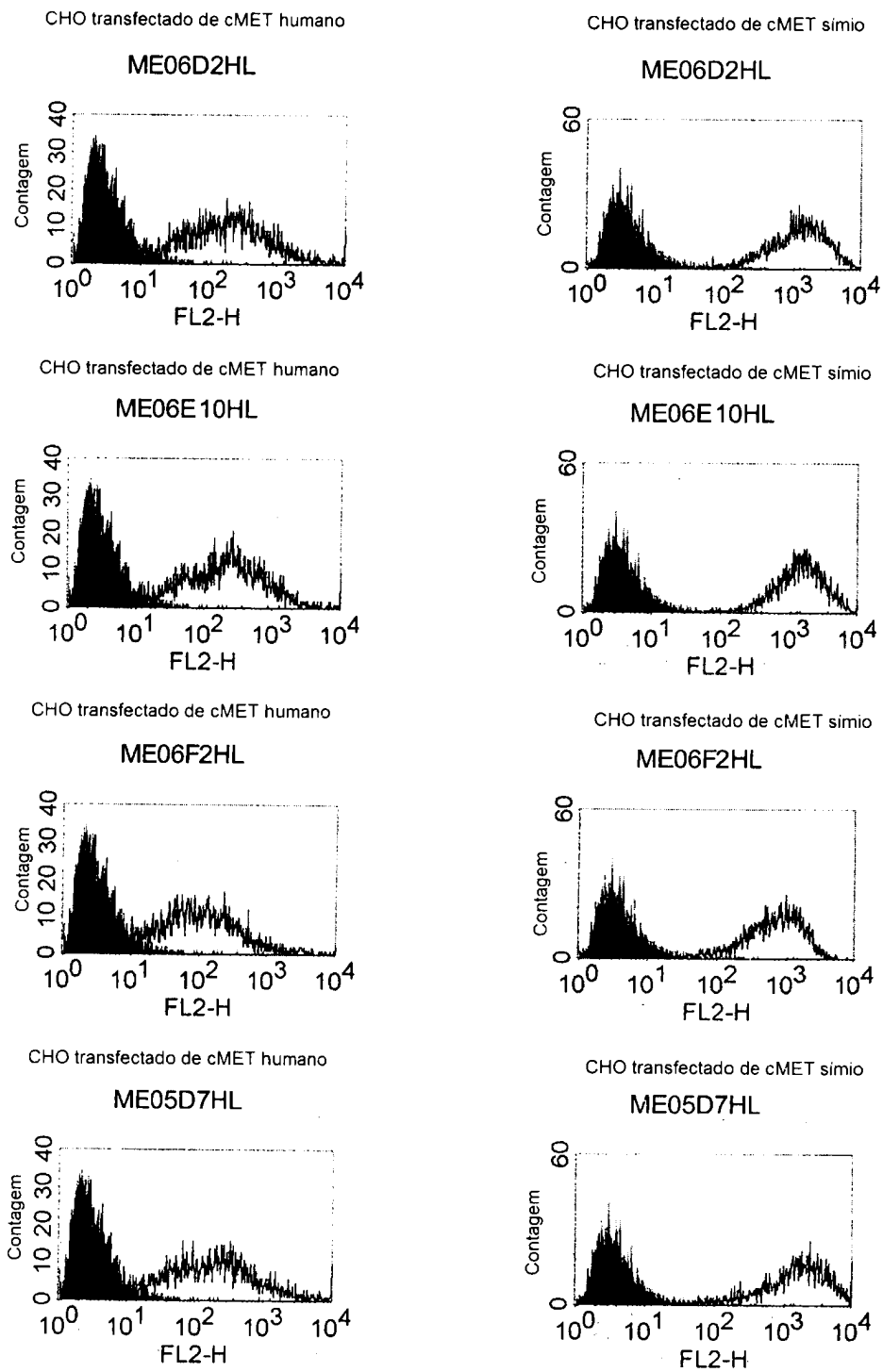
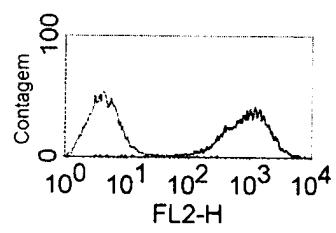


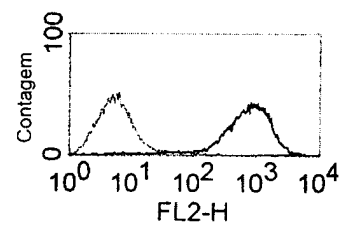
Figura 56c

Figura 57

CHO transfectado de endo-sialina humana



CHO transfectado de endo-sialina simia



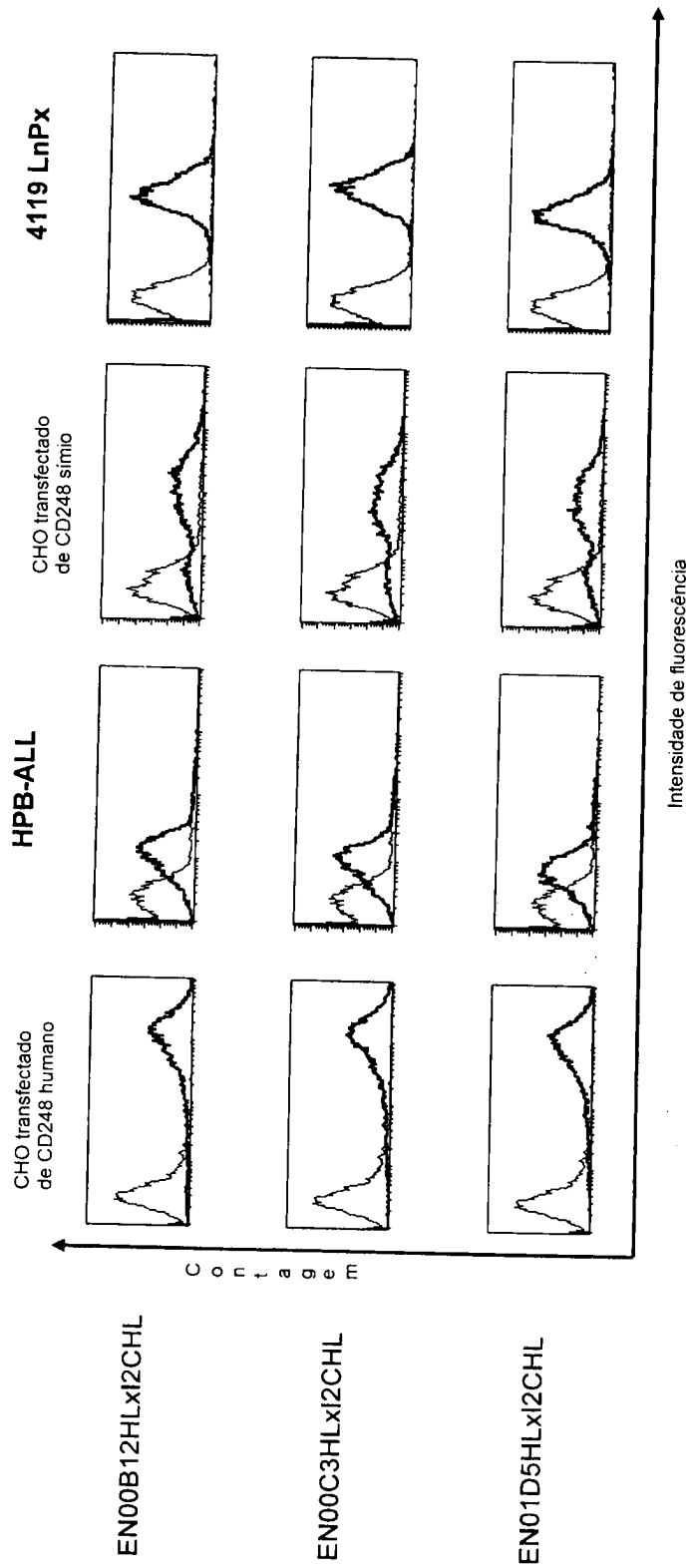


Figura 58(1)

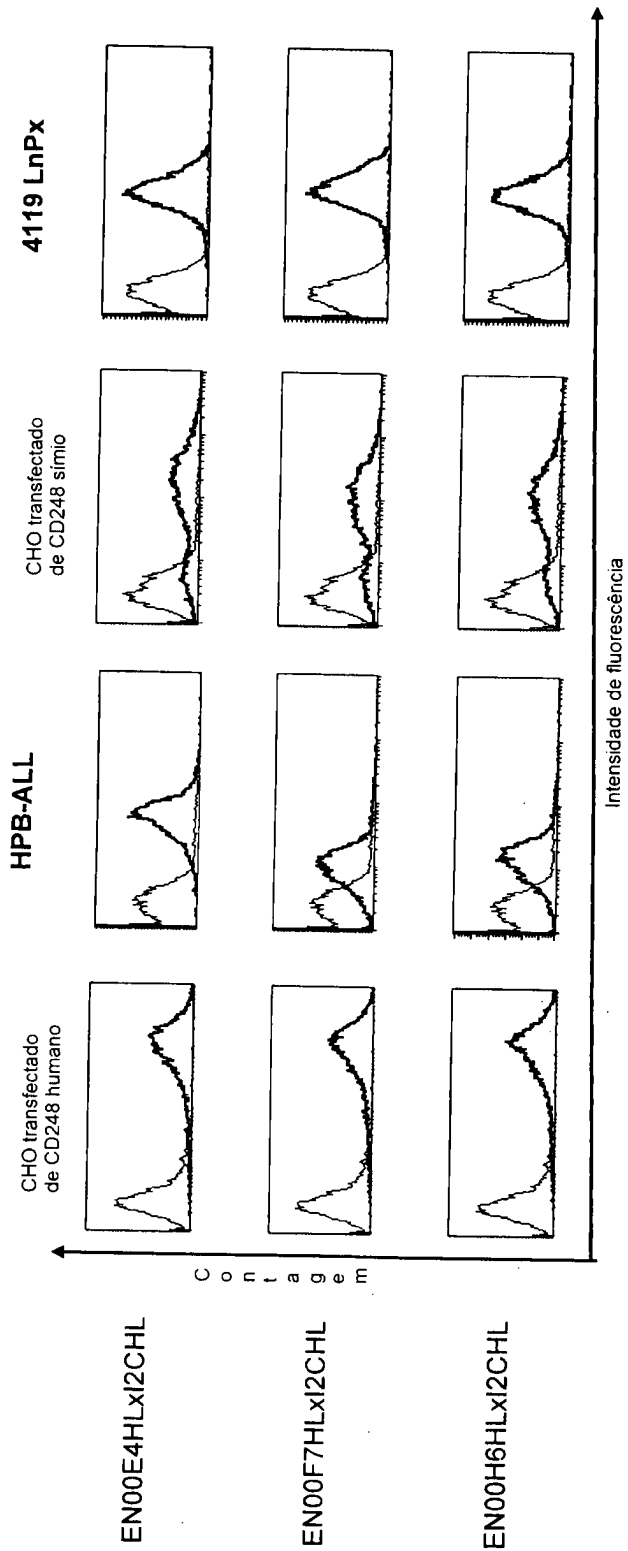
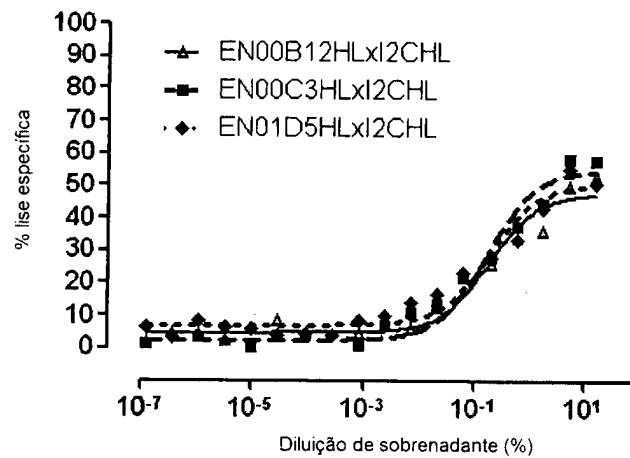


Figura 58(2)

Células T efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 humano estimulado
Células alvo: CHO transfectado com CD248 humano
Razão E:T: 10:1



Células T efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 humano estimulado
Células alvo: CHO transfectado com CD248 humano
Razão E:T: 10:1

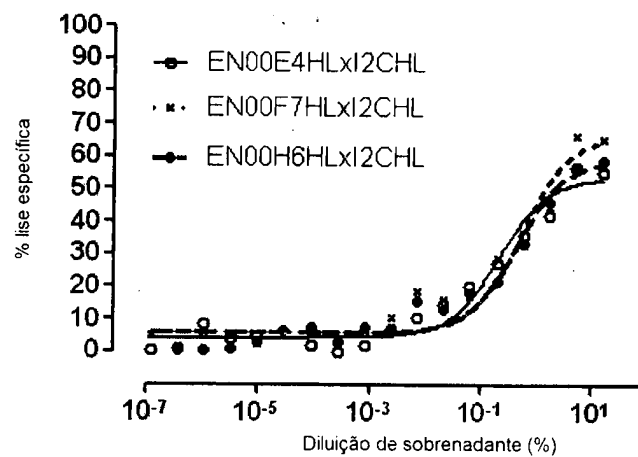
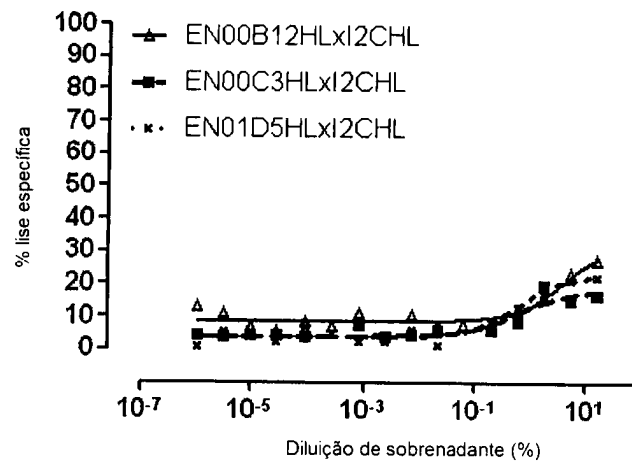


Figura 59 (1)

Células T efetoras: 4119 LnPx
 Células alvo: CHO transfectado com CD248 símio
 Razão E:T: 10:1



Células T efetoras: 4119 LnPx
 Células alvo: CHO transfectado com CD248 símio
 Razão E:T: 10:1

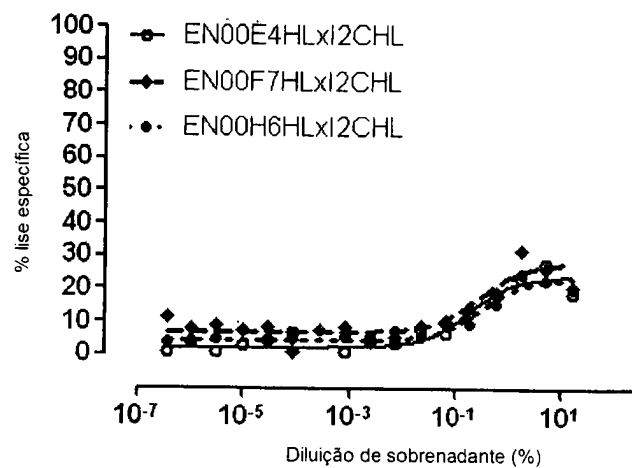


Figura 59 (2)

Figura 60.1

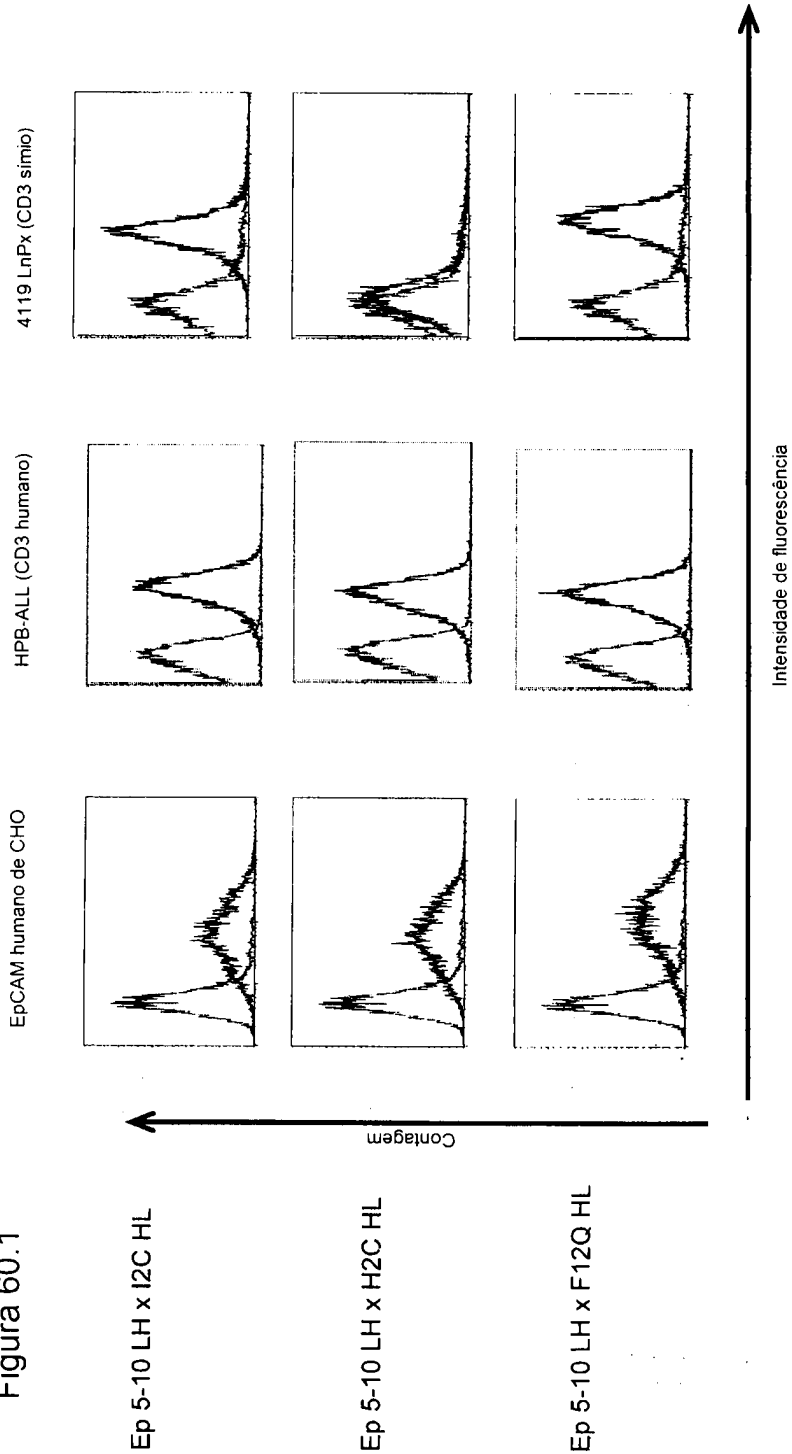


Figura 60.2

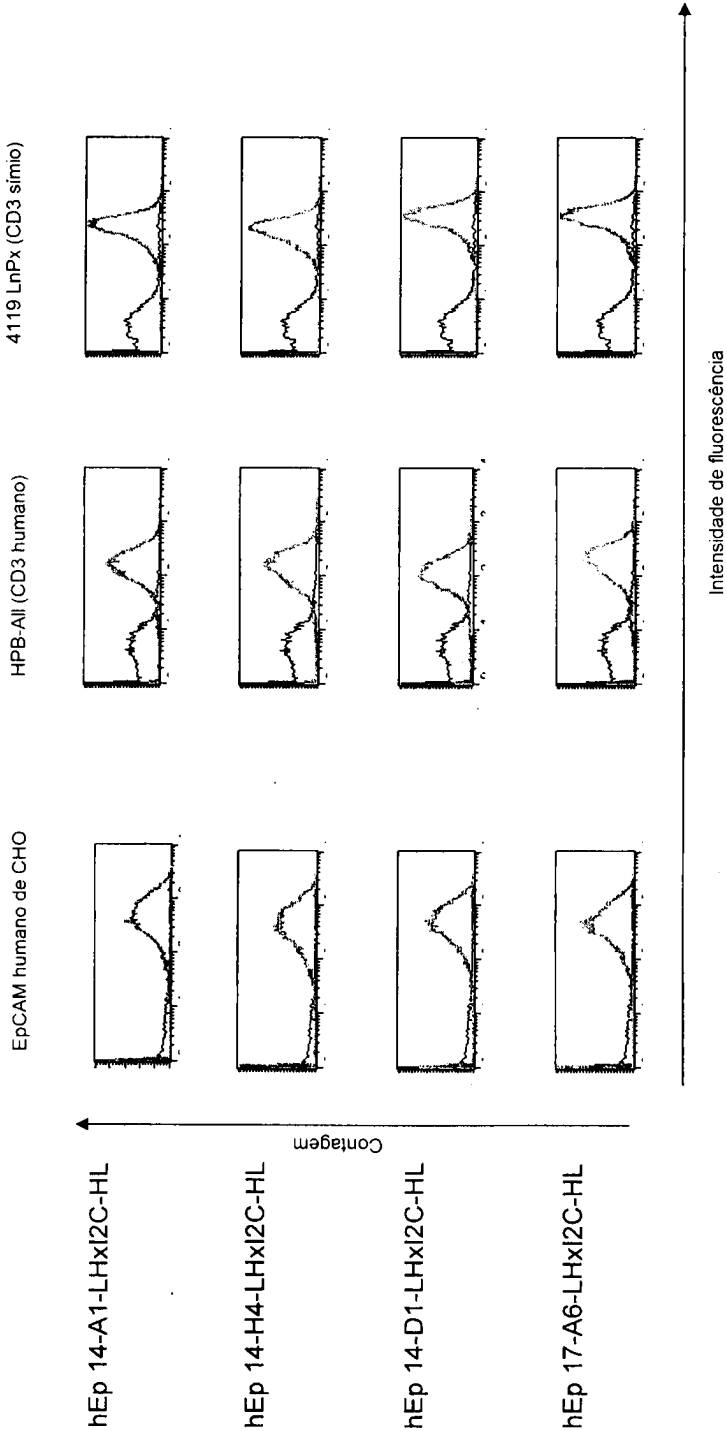


Figura 60.3

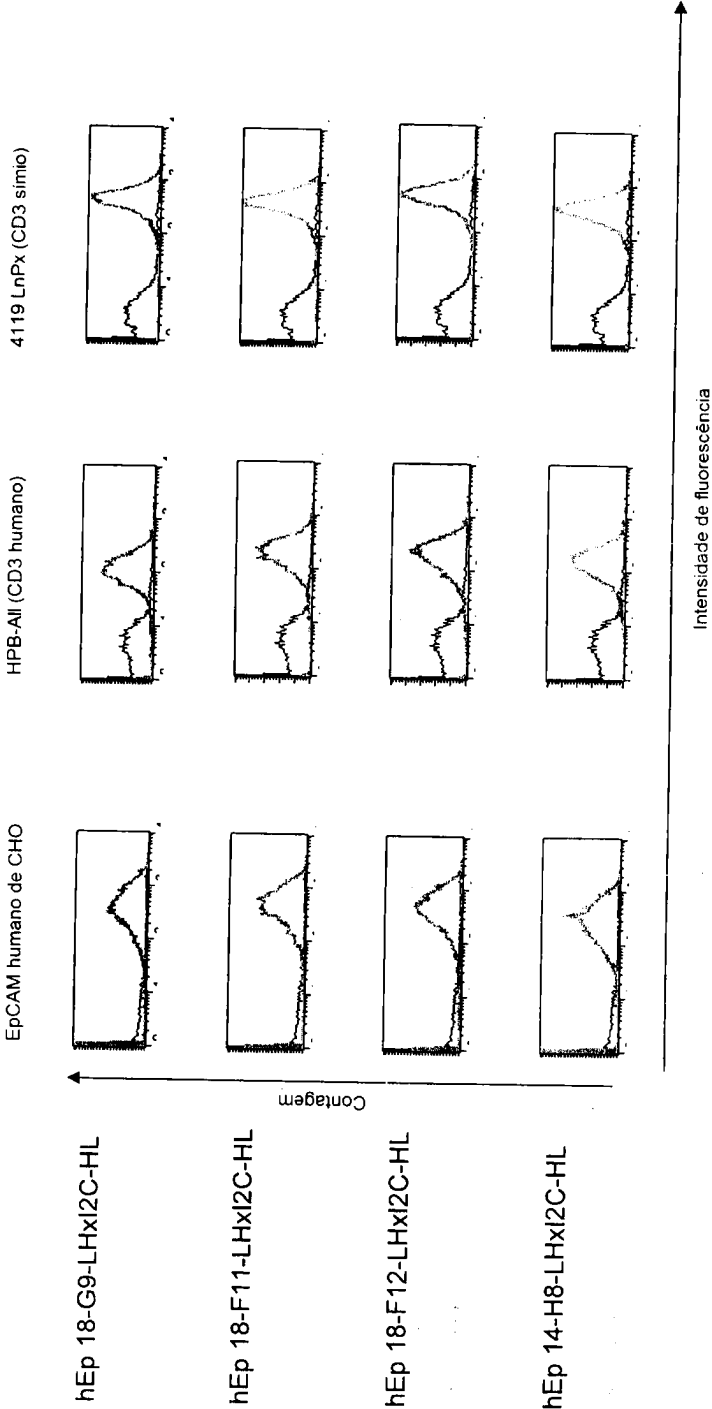


Figura 60.4

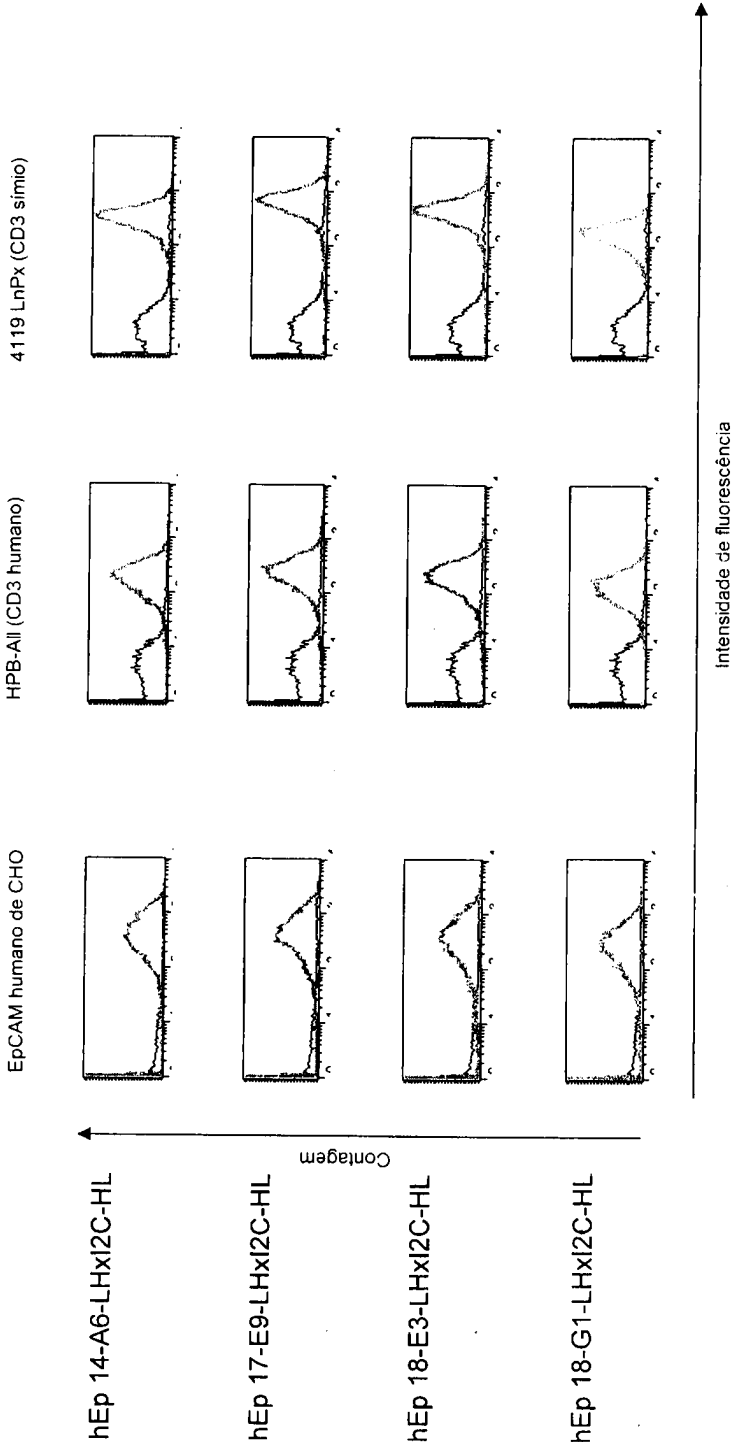


Figura 60.5

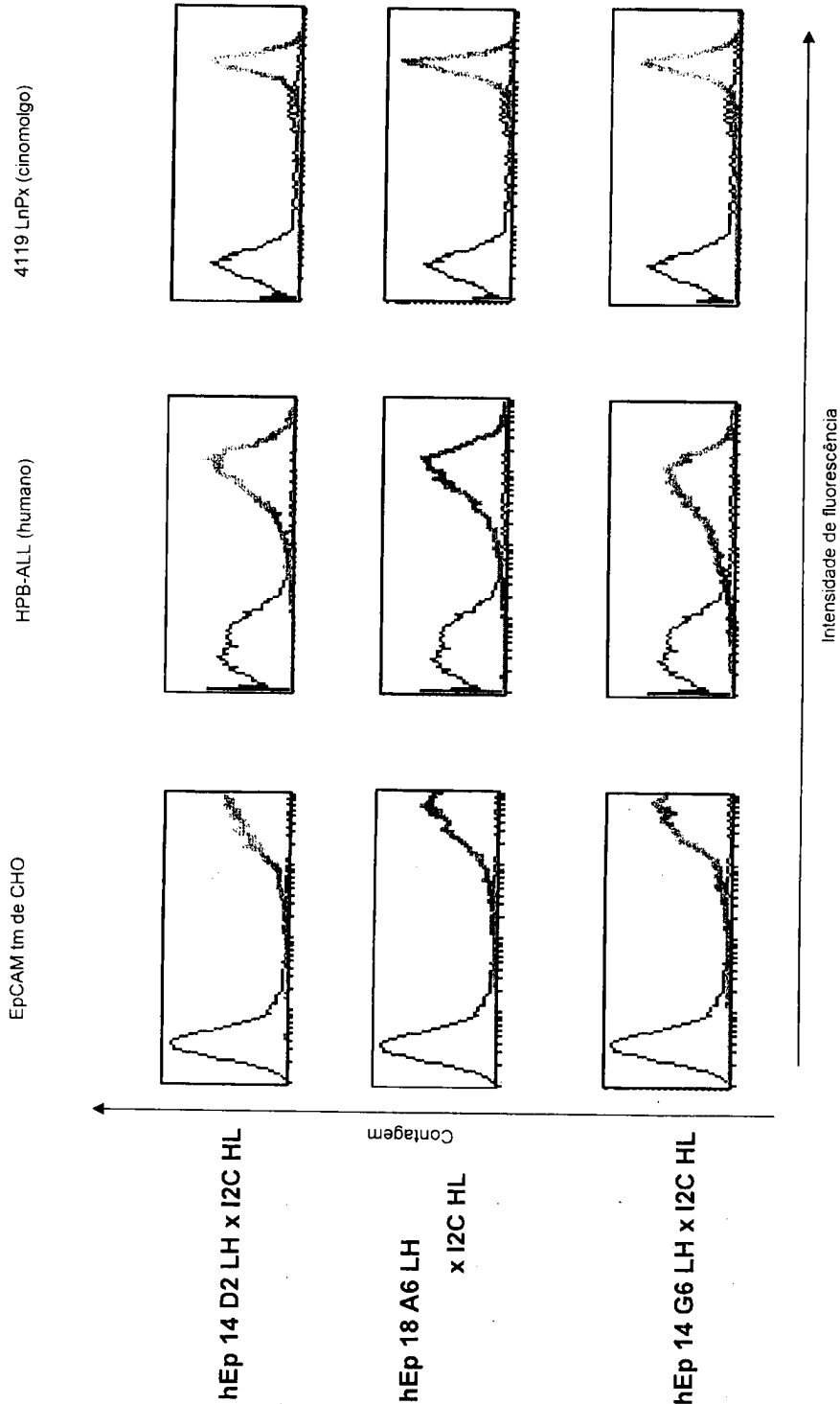
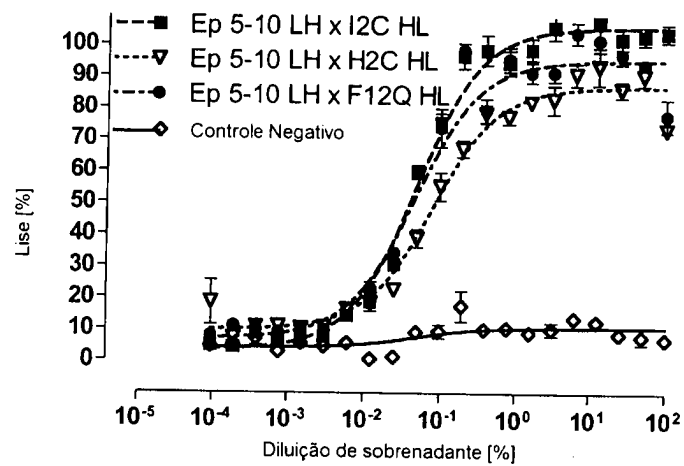


Figura 61

A) Células efectoras: PBMC humano não estimulado depletado de CD56
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano



B) Células efectoras: 4119LnPx
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano

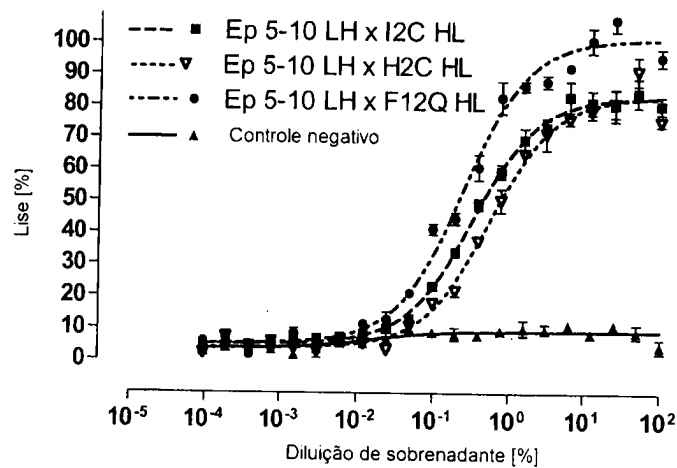
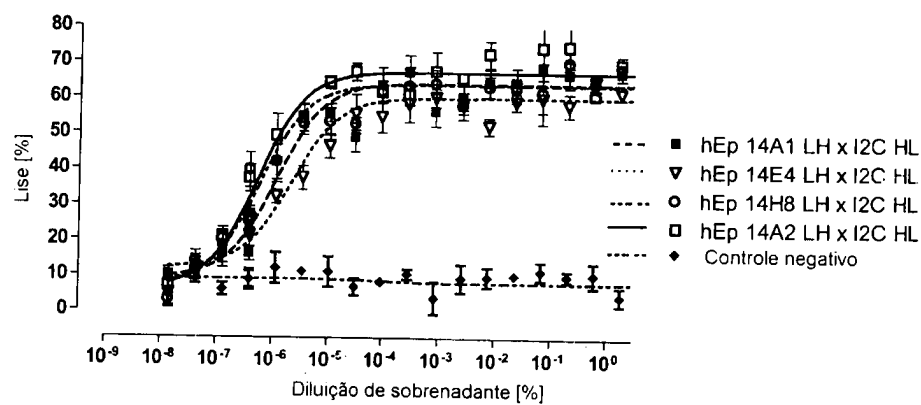


Figura 62

A) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano



B) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano

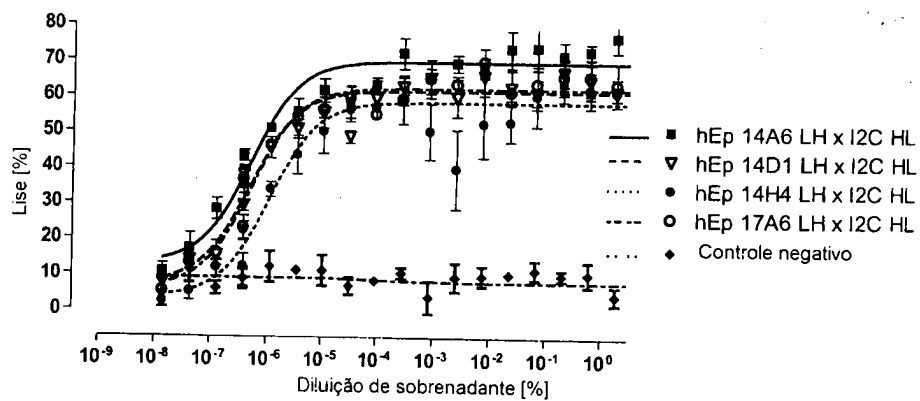
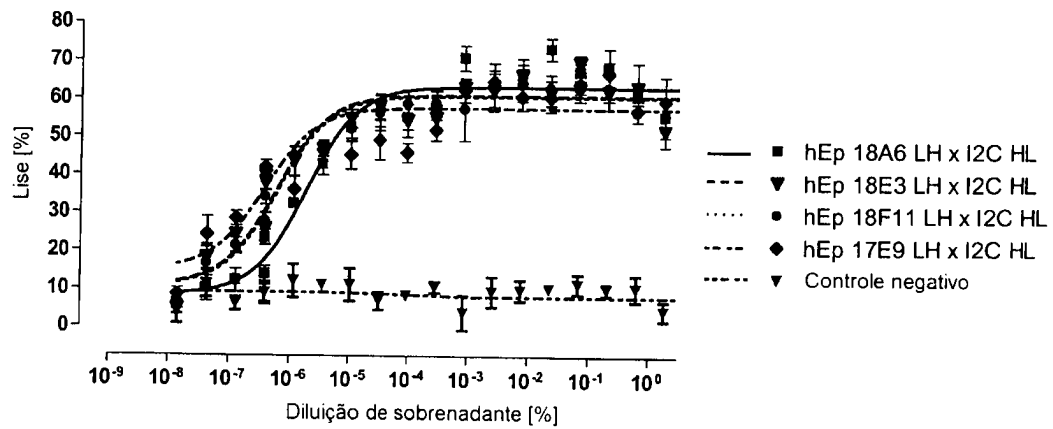


Figura 63

A) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano



B) Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano

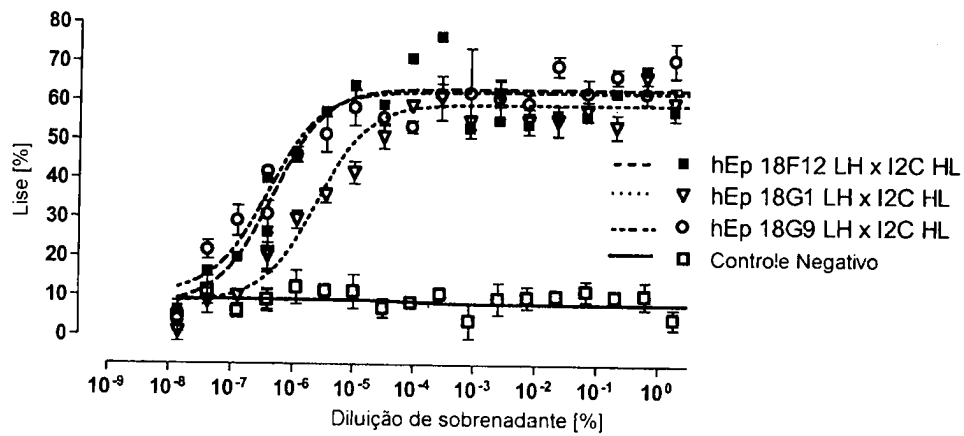
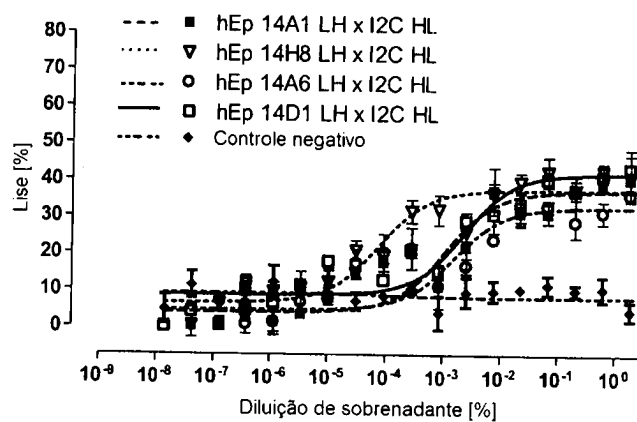


Figura 64

A) Células efectoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano



B) Células efectoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano

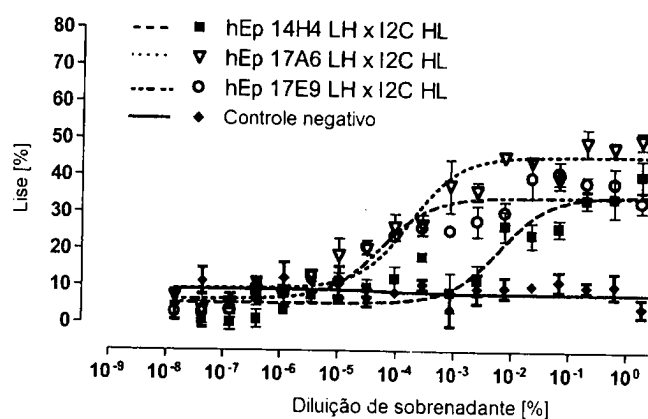
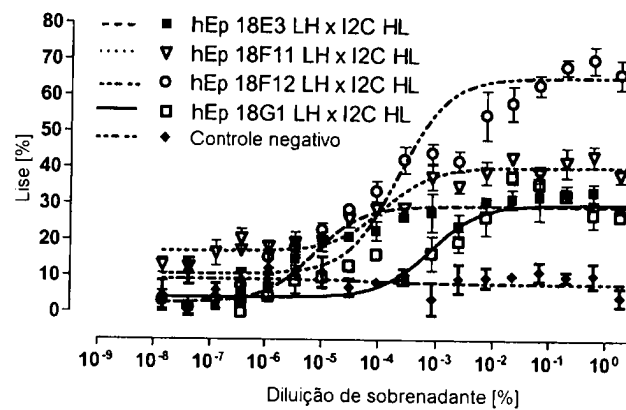


Figura 65

A) Células efetoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano



B) Células efetoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano

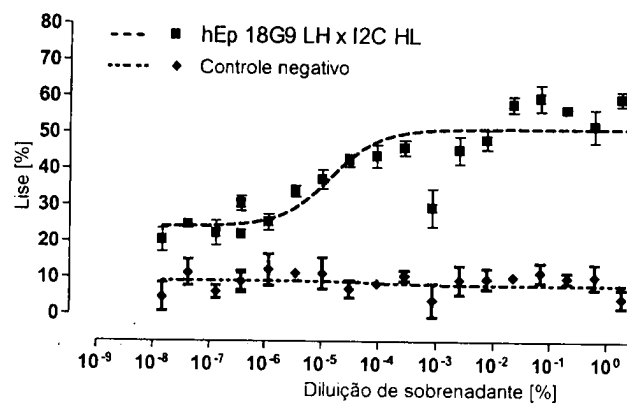
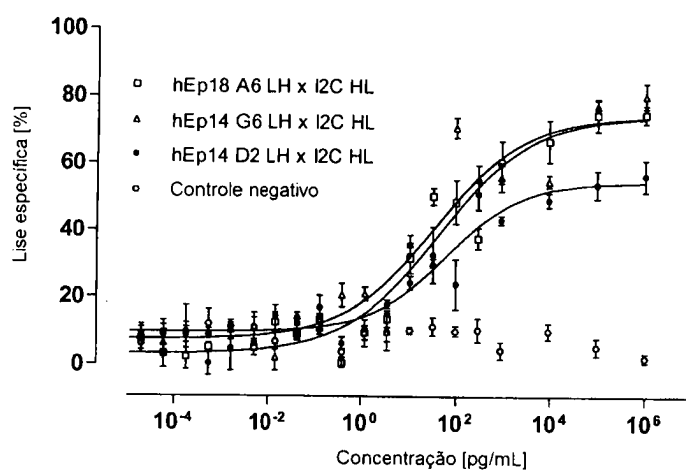


Figura 66

A) Células efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano



B) Células efetoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com EpCAM humano

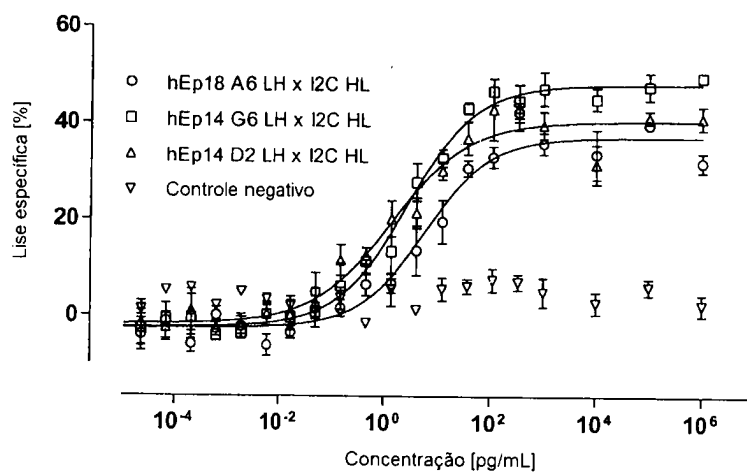


Figura 67

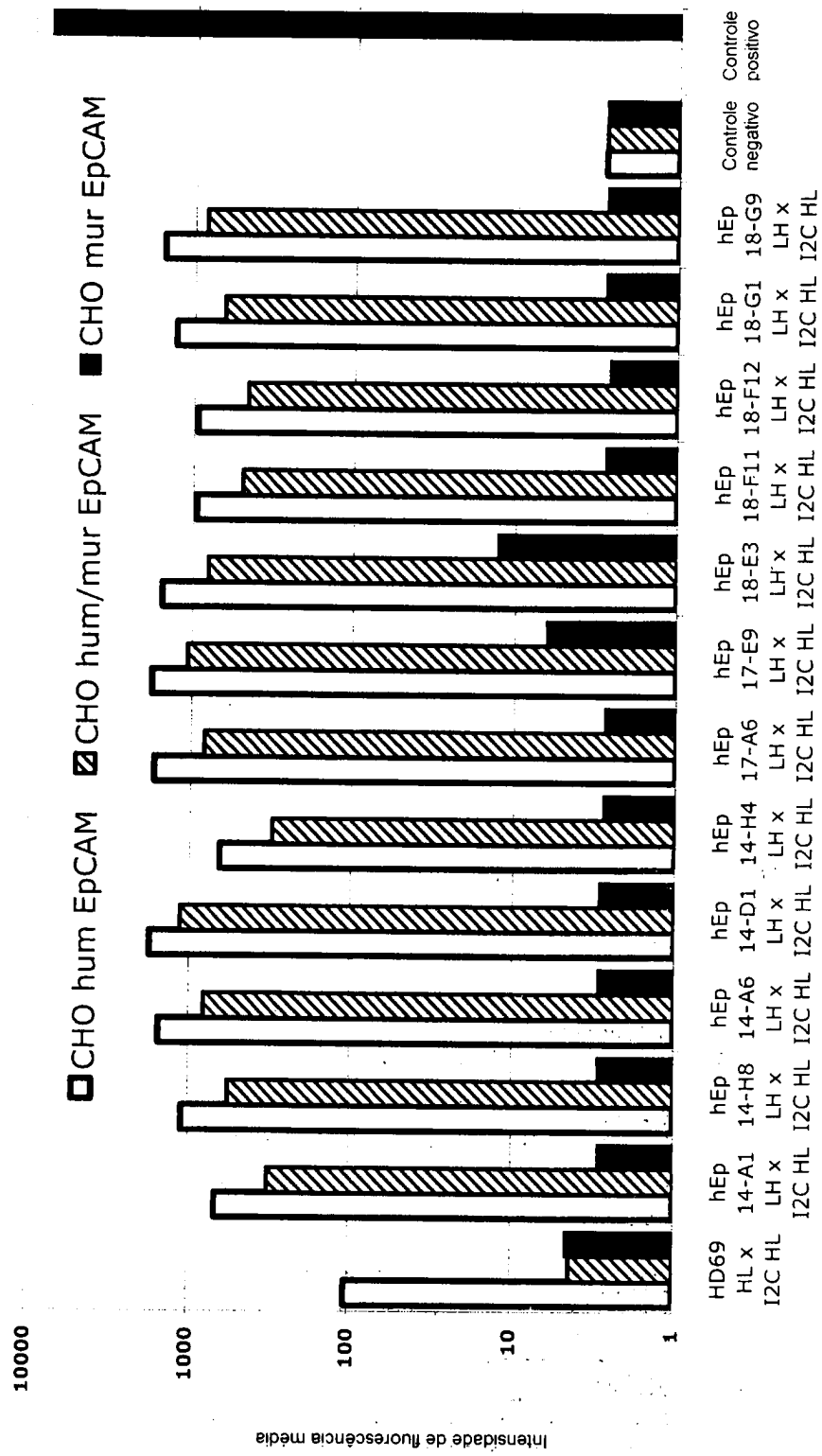


Figura 68

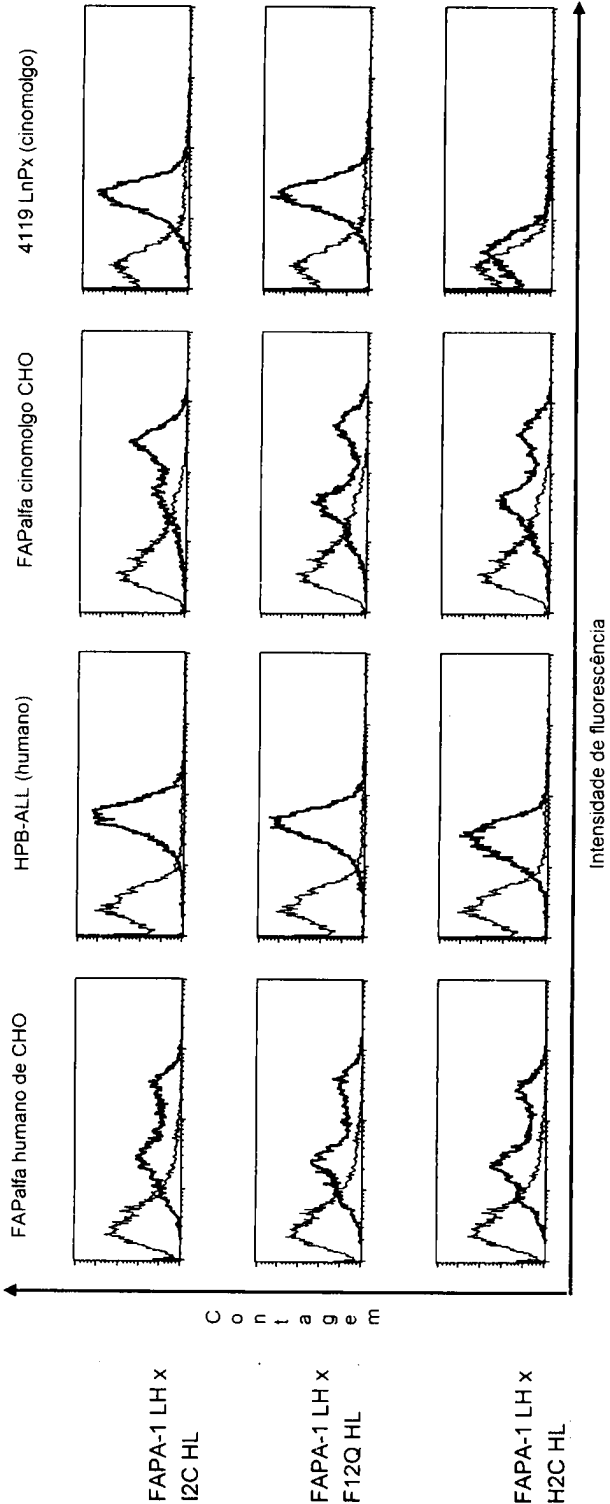
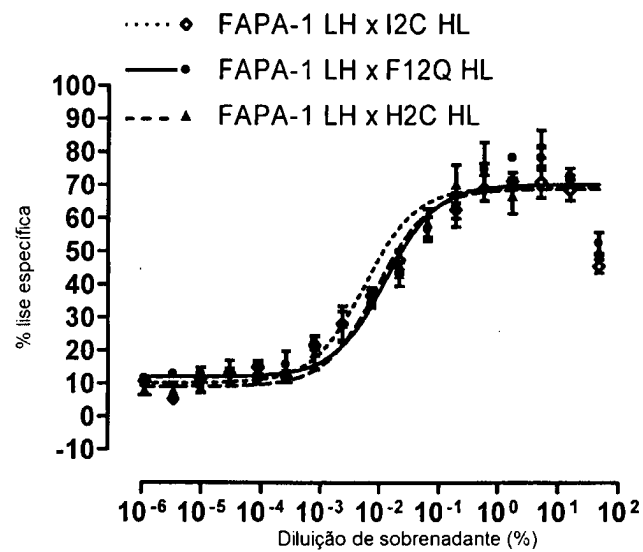
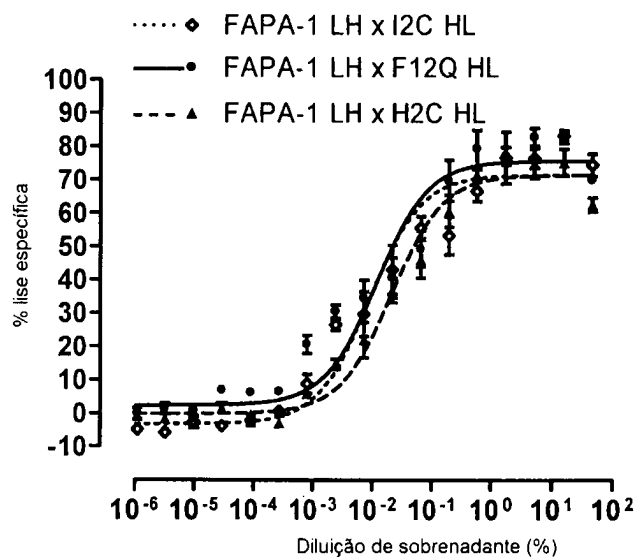


Figura 69

Células efectoras: PBMC humano depletado de
CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com FAPalfa humano
Razão E:T: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com FAPalfa humano
Razão E:T: 10:1



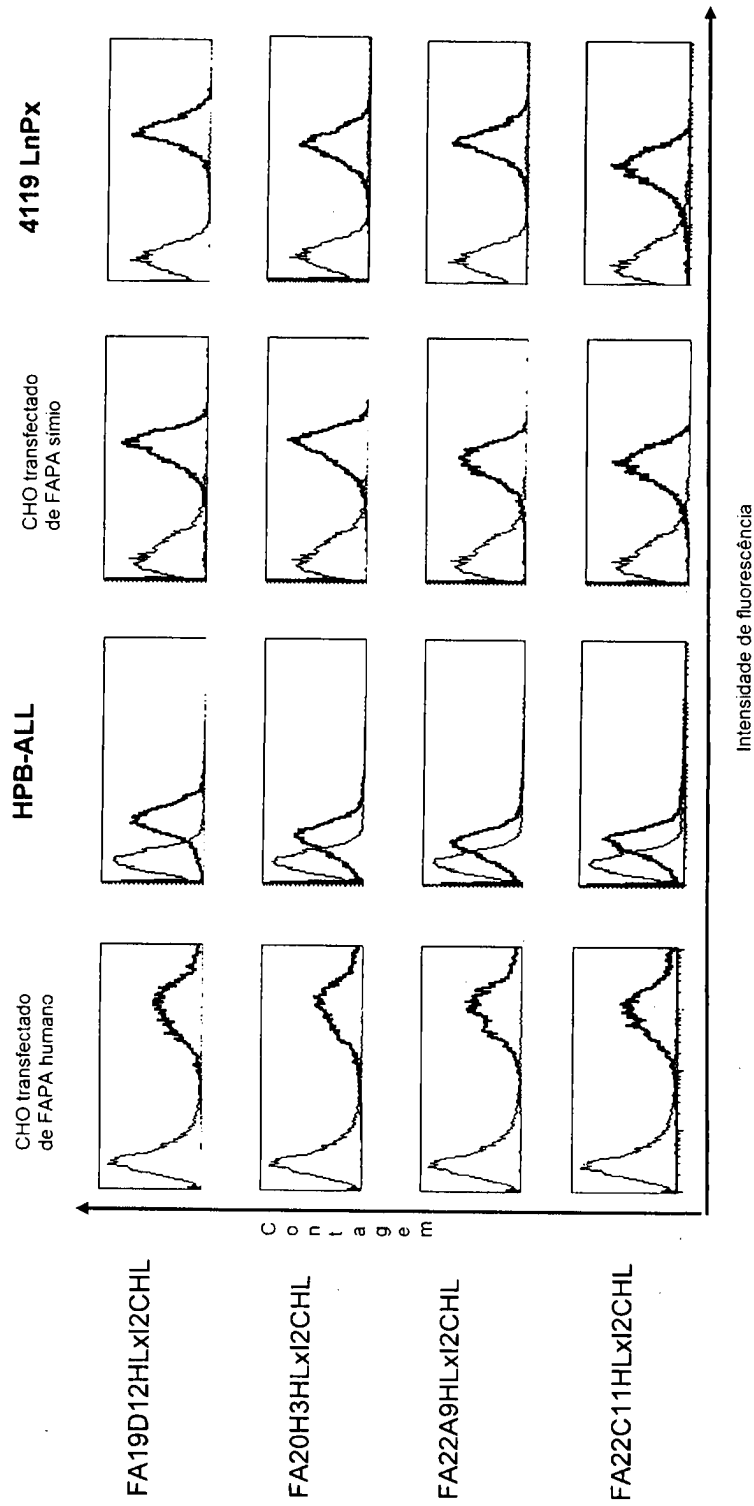


Figura 70(1)

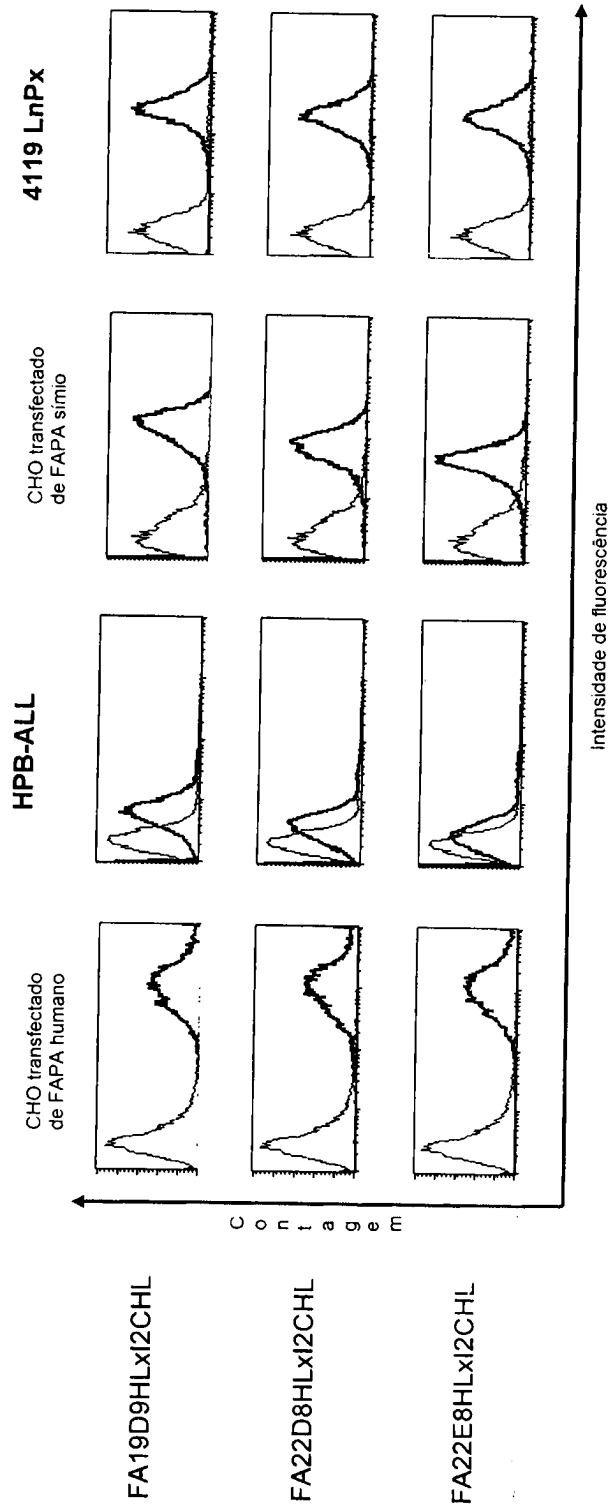
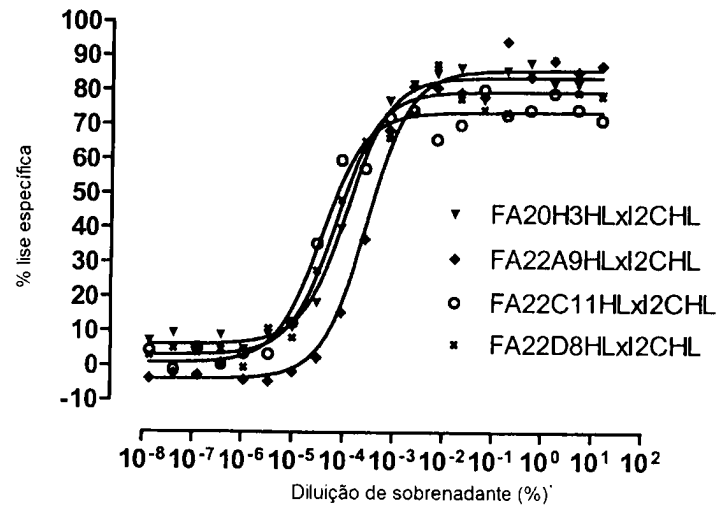


Figura 70(2)

Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectado com FAPA humano
 Razão E:T: 10:1



Células efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectado com FAPA humano
 Razão E:T: 10:1

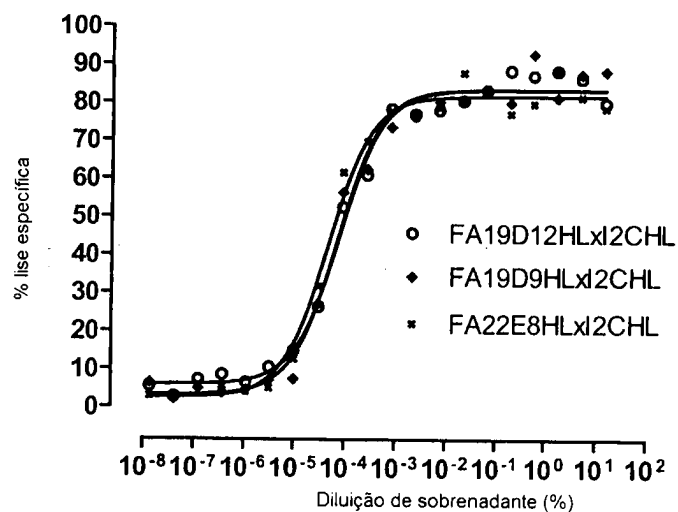
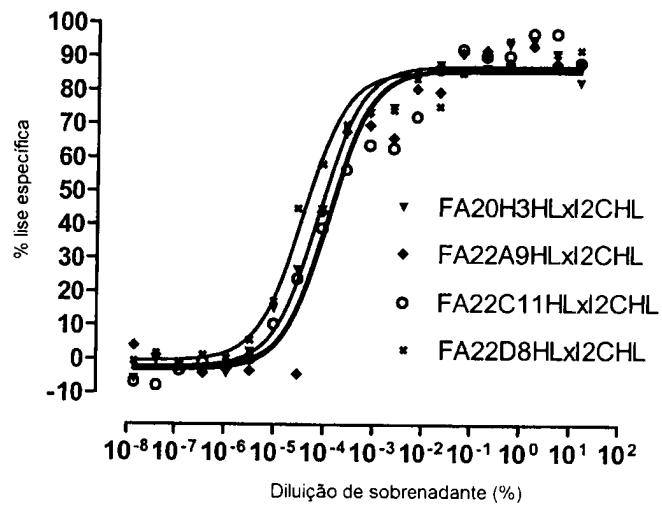


Figura 71(1)

Células efetoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com FAPA símio
Razão E:T: 10:1



Células efetoras: 4119 LnPx
Células alvo: CHO transfectado com FAPA símio
Razão E:T: 10:1

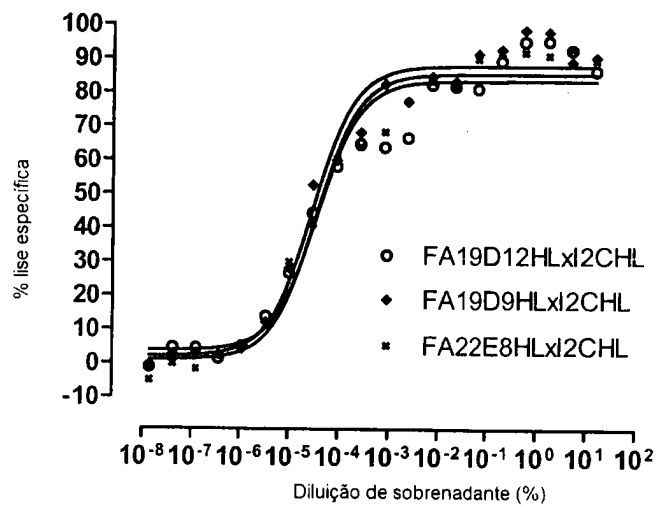


Figura 71(2)

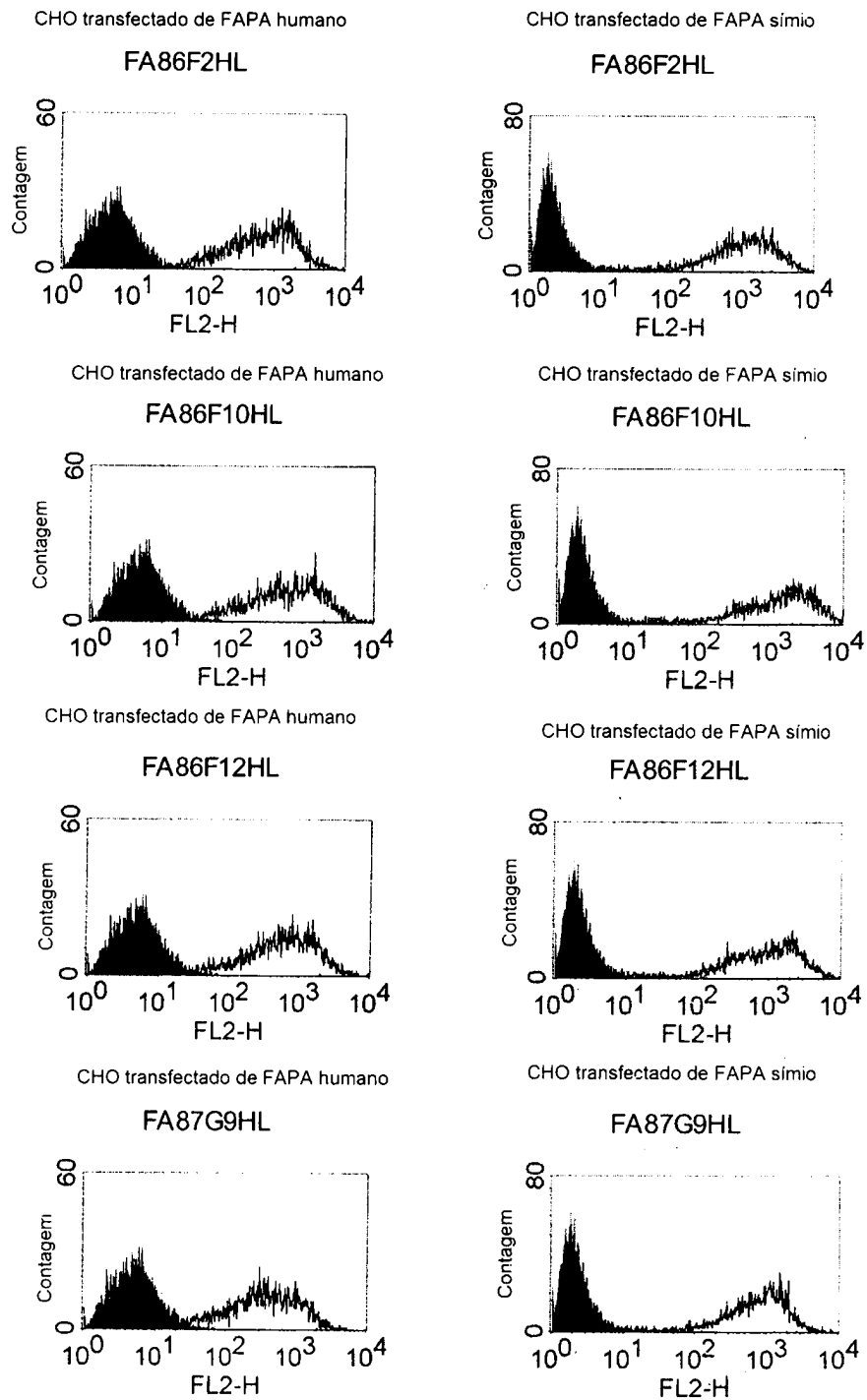


Figura 72(1)

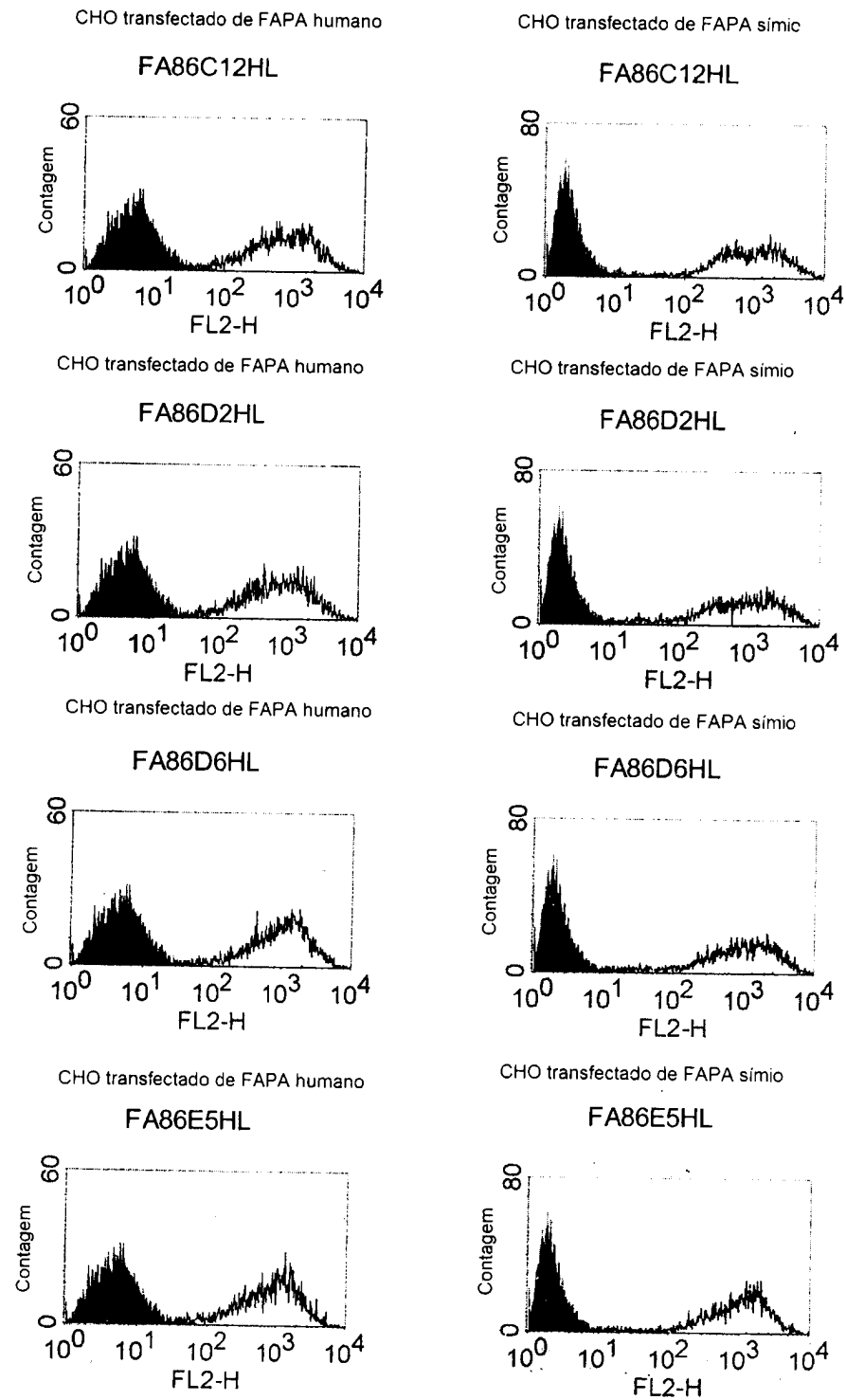


Figura 72(2)

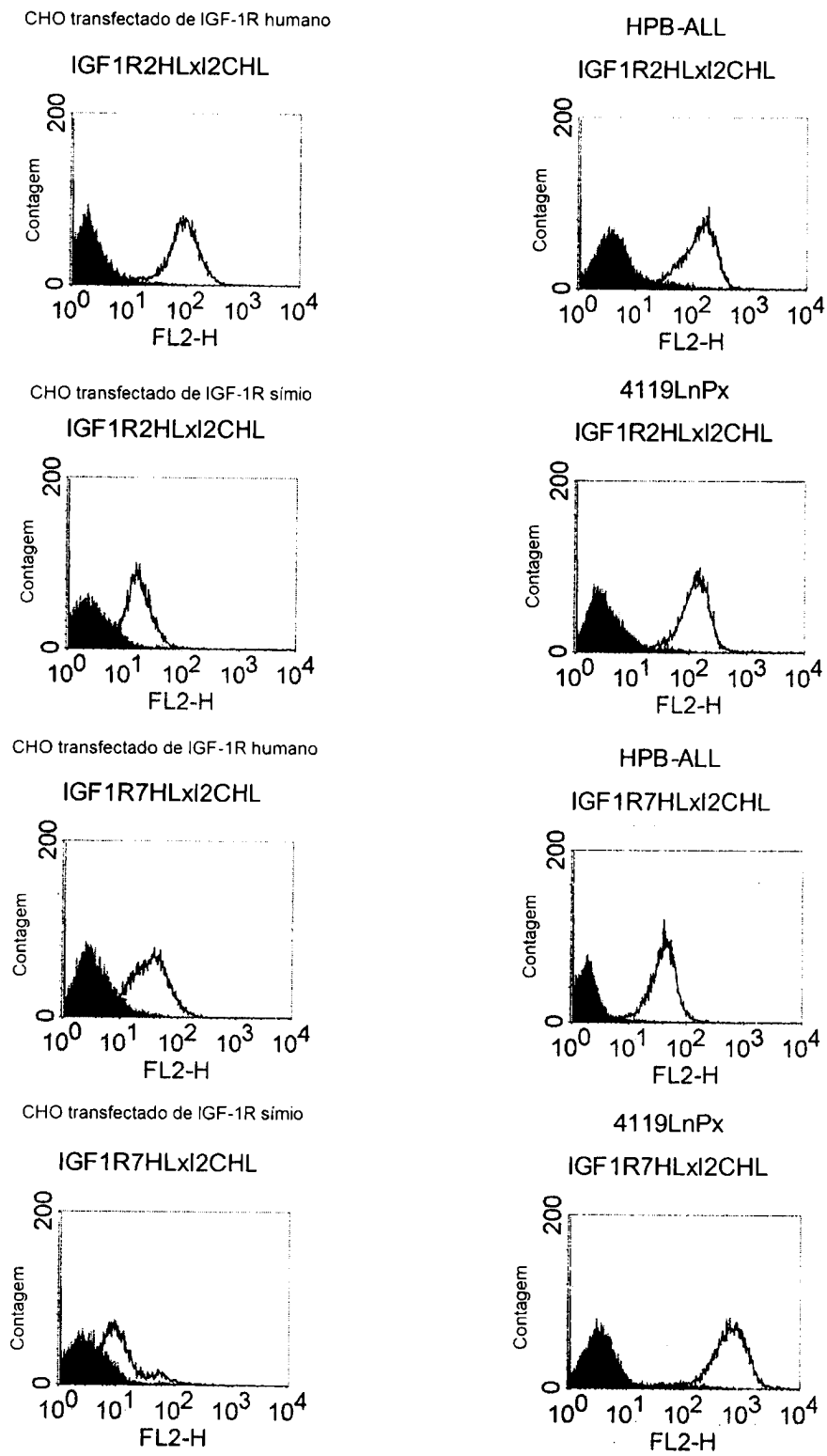


Figura 73a

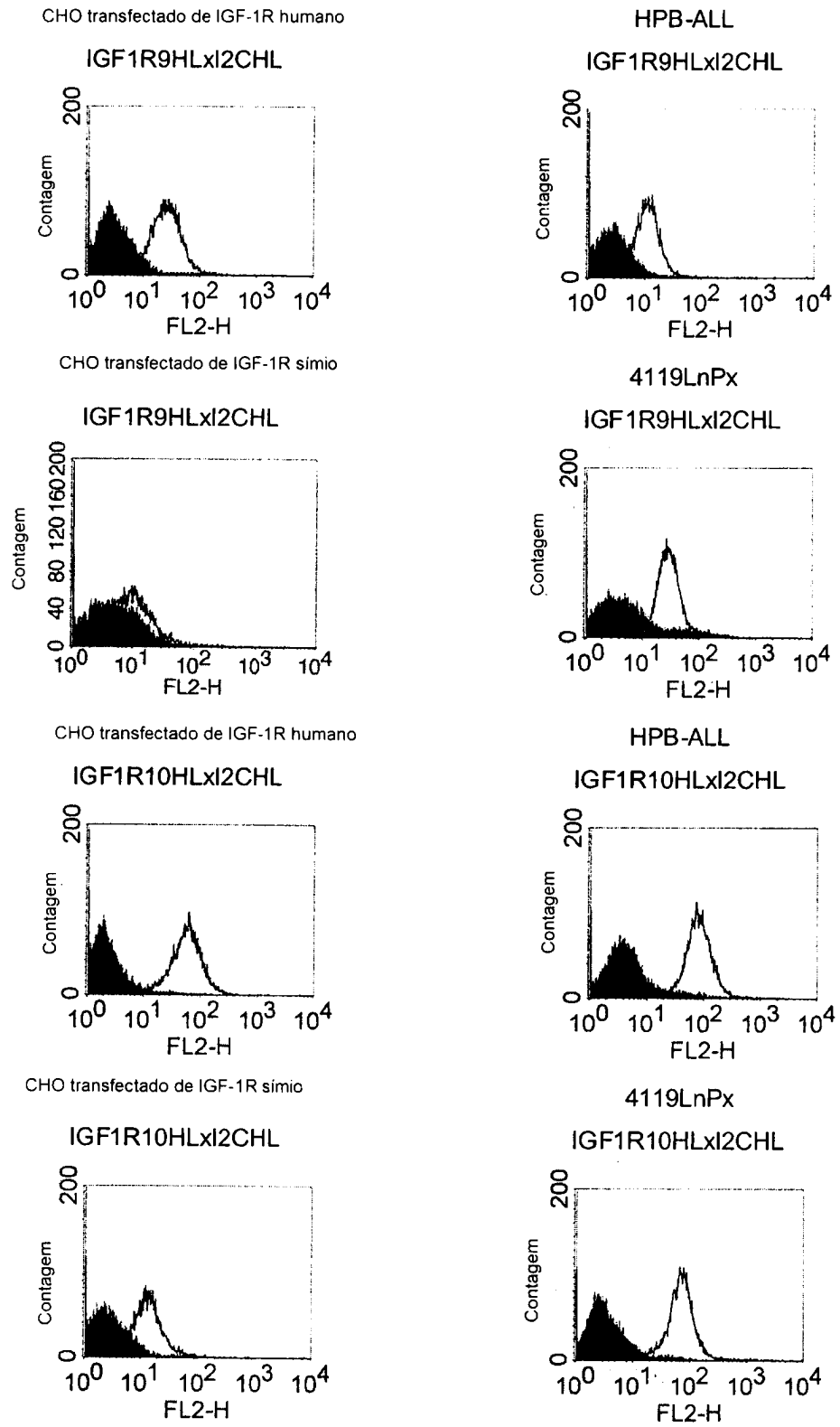


Figura 73b

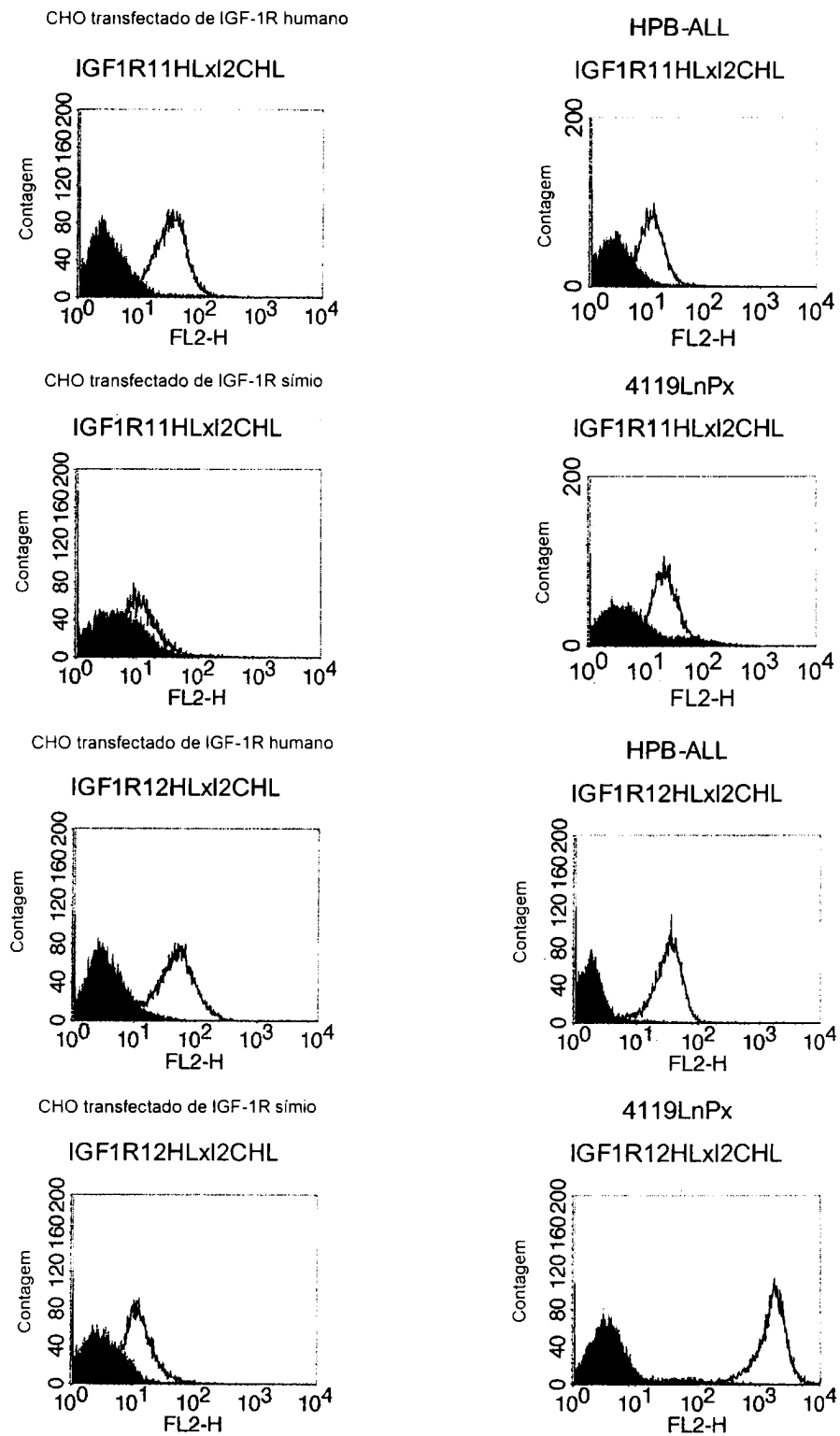
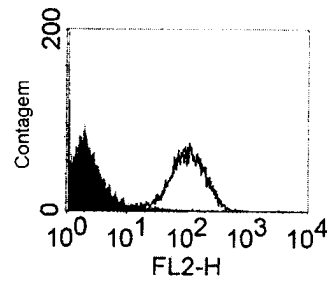


Figura 73c

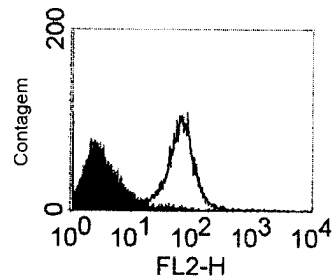
CHO transfectado de IGF-1R humano

IGF1R13HLxI2CHL



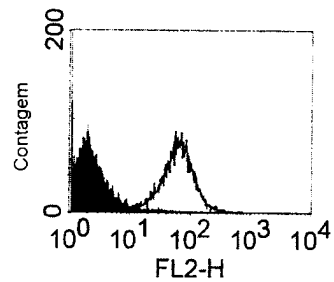
CHO transfectado de IGF-1R simio

IGF1R13HLxI2CHL



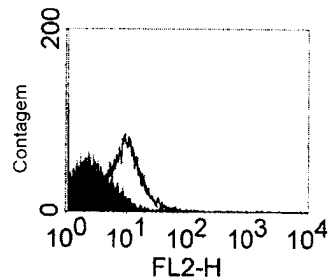
CHO transfectado de IGF-1R humano

IGF1R15HLxI2CHL



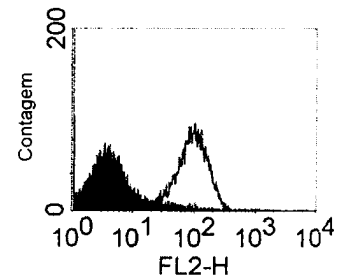
CHO transfectado de IGF-1R simio

IGF1R15HLxI2CHL



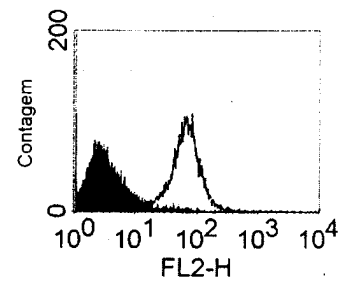
HPB-ALL

IGF1R13HLxI2CHL



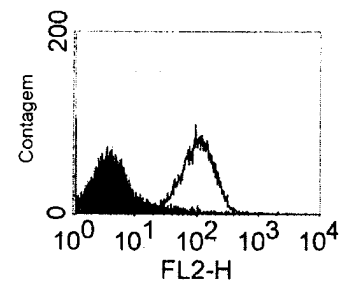
4119LnPx

IGF1R13HLxI2CHL



HPB-ALL

IGF1R15HLxI2CHL



4119LnPx

IGF1R15HLxI2CHL

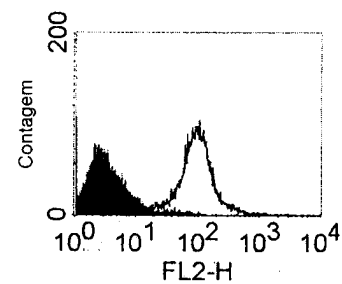


Figura 73d

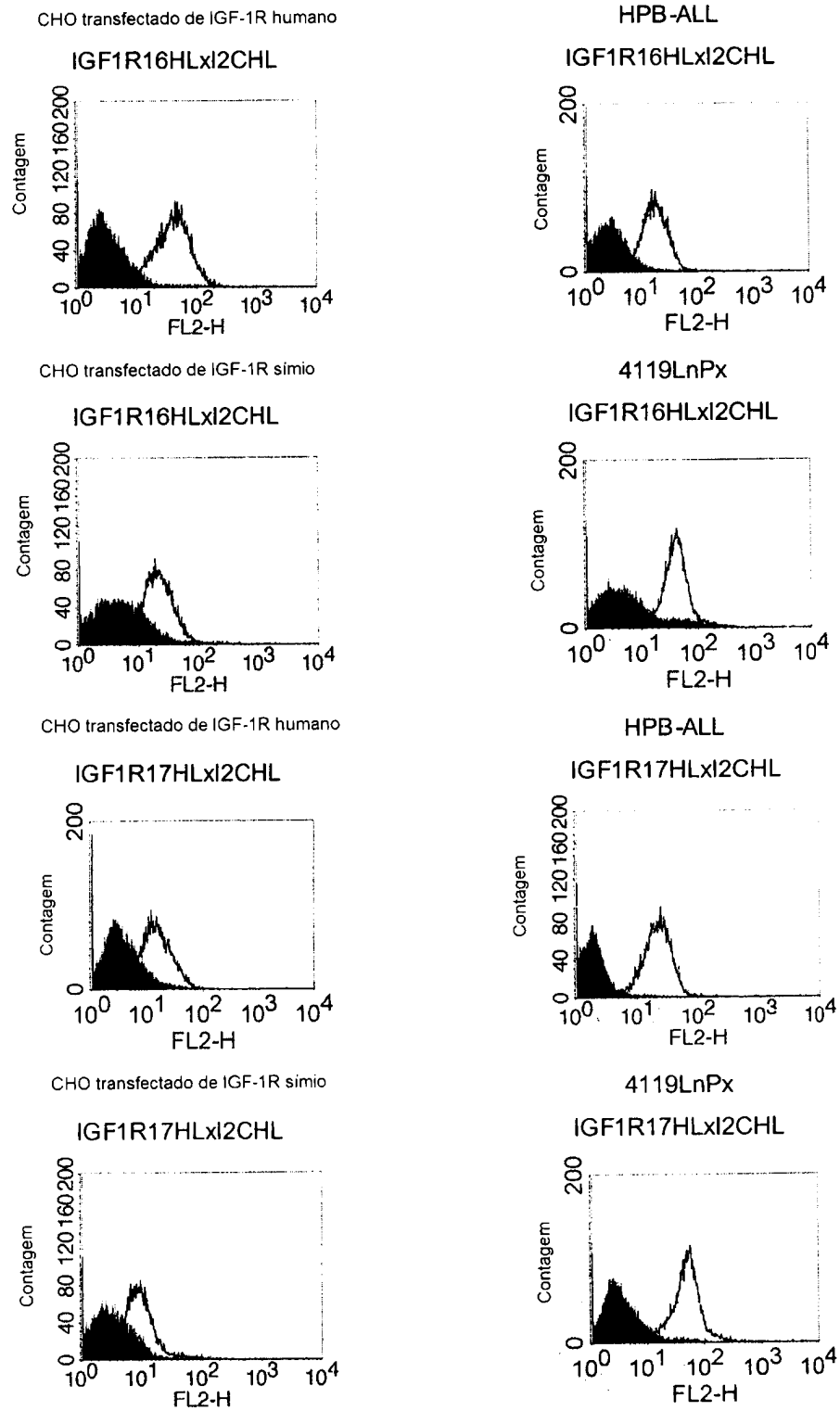
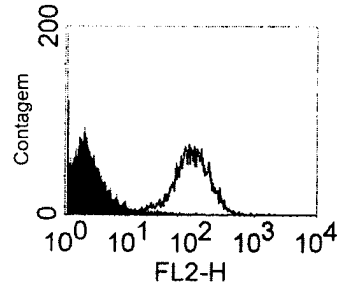


Figura 73e

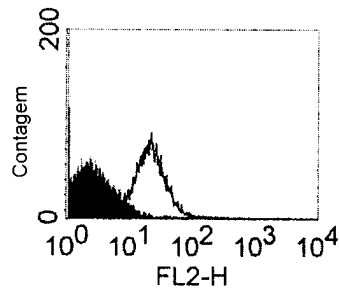
CHO transfectado de IGF-1R humano

IGF1R19HLxI2CHL



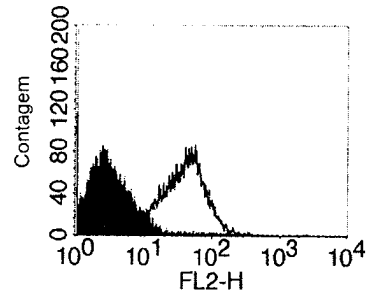
CHO transfectado de IGF-1R simio

IGF1R19HLxI2CHL



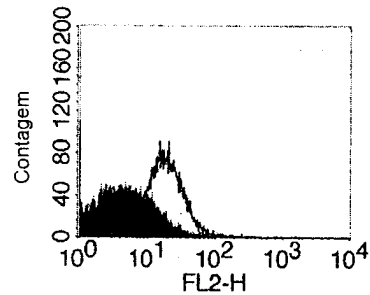
CHO transfectado de IGF-1R humano

IGF1R20HLxI2CHL



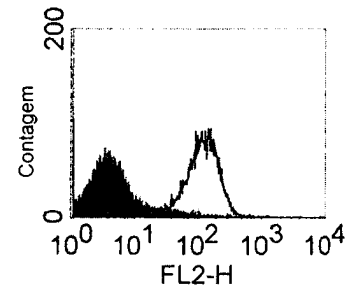
CHO transfectado de IGF-1R simio

IGF1R20HLxI2CHL



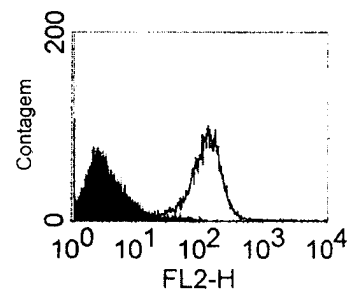
HPB-ALL

IGF1R19HLxI2CHL



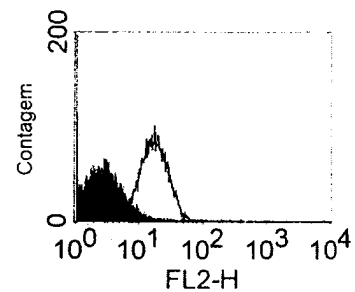
4119LnPx

IGF1R19HLxI2CHL



HPB-ALL

IGF1R20HLxI2CHL



4119LnPx

IGF1R20HLxI2CHL

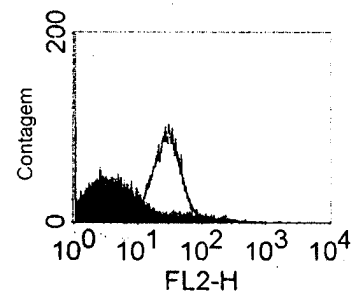


Figura 73f

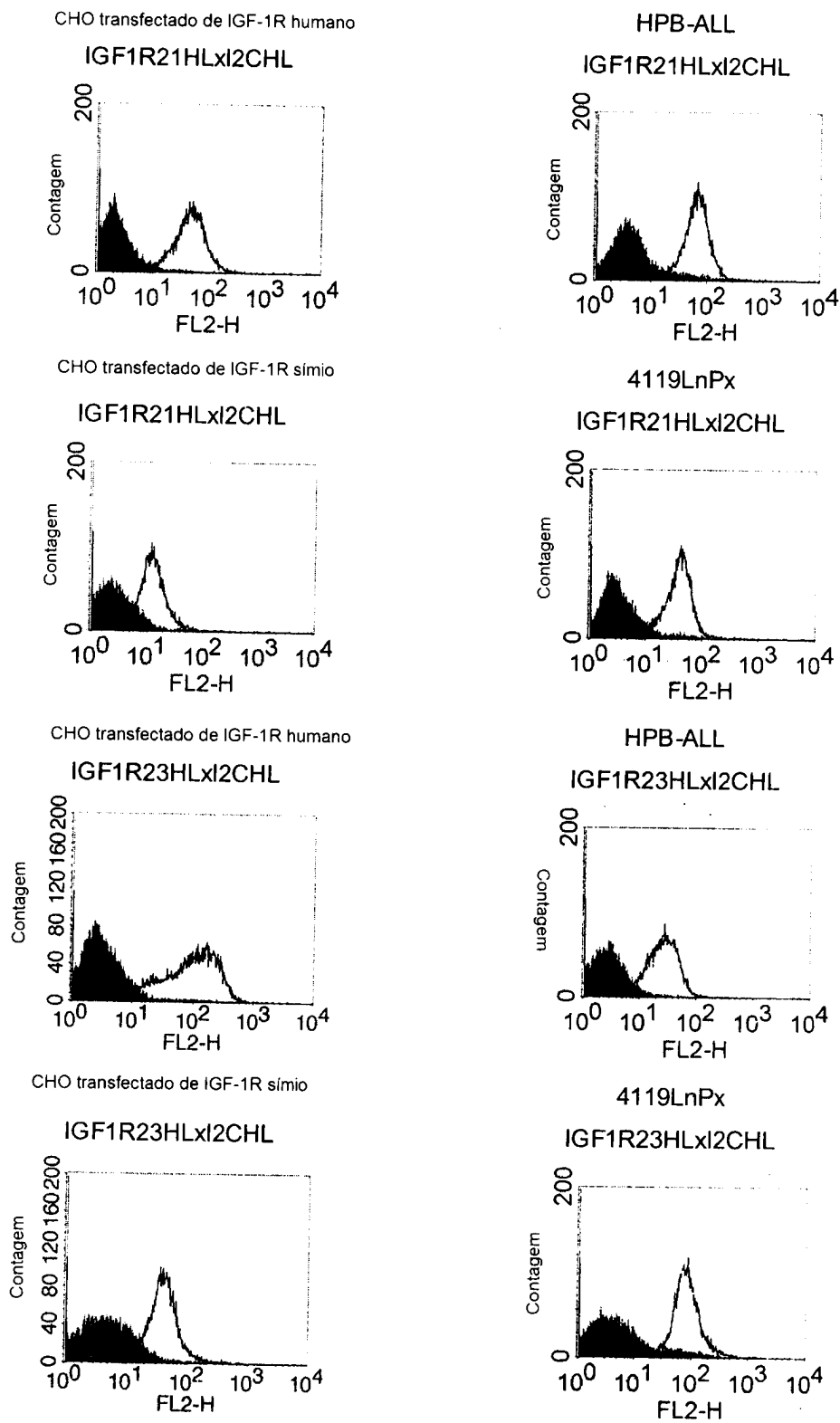


Figura 73g

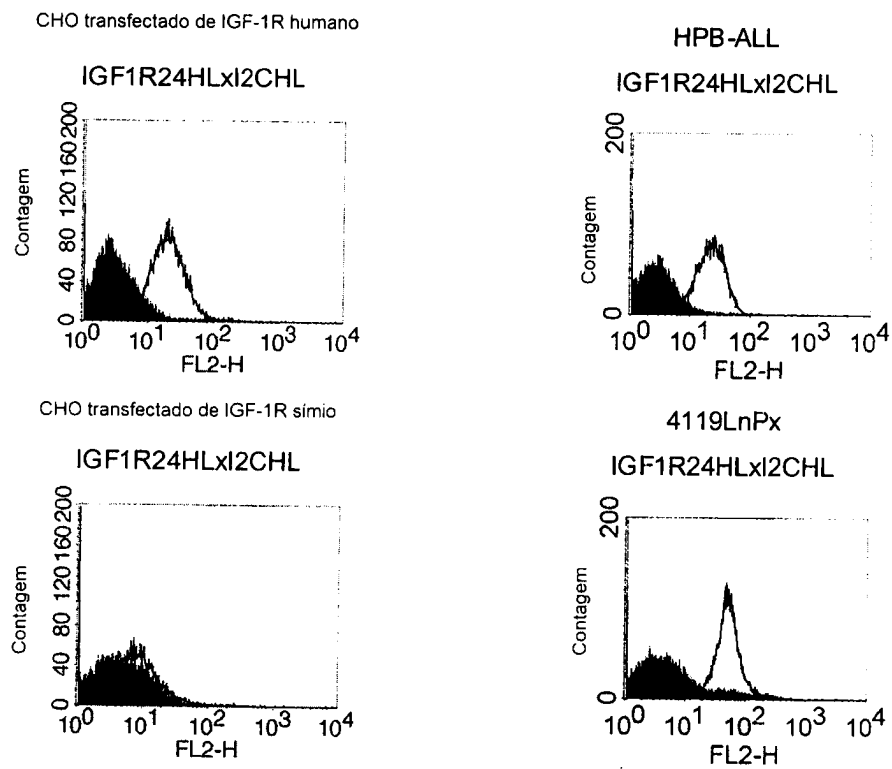
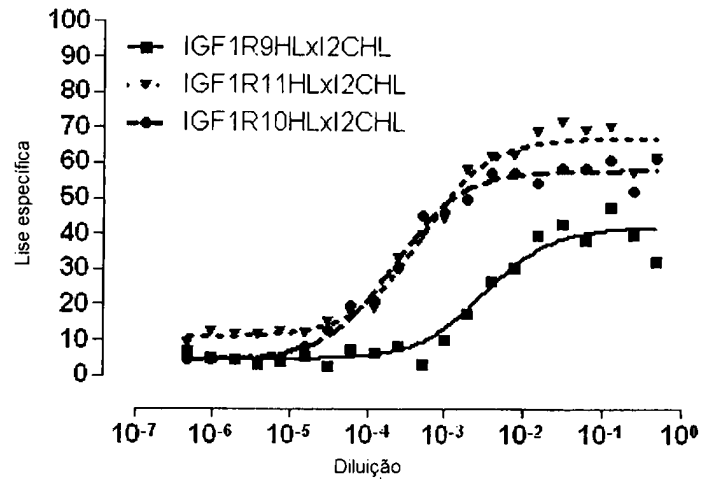


Figura 73h

Células T efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R humano



Células T efetoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R símio

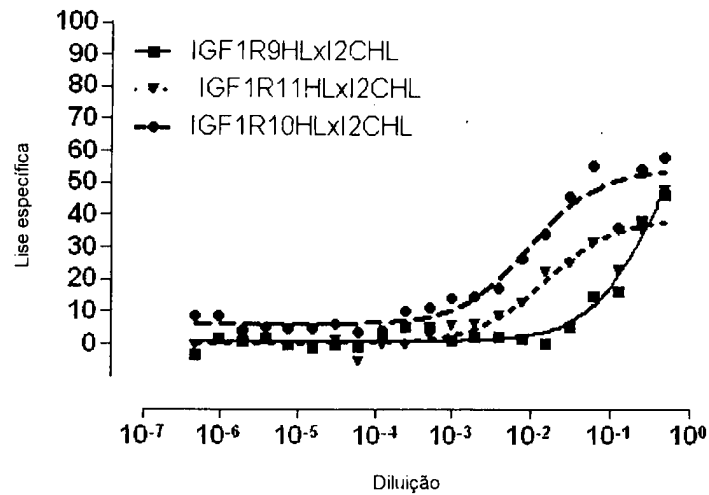
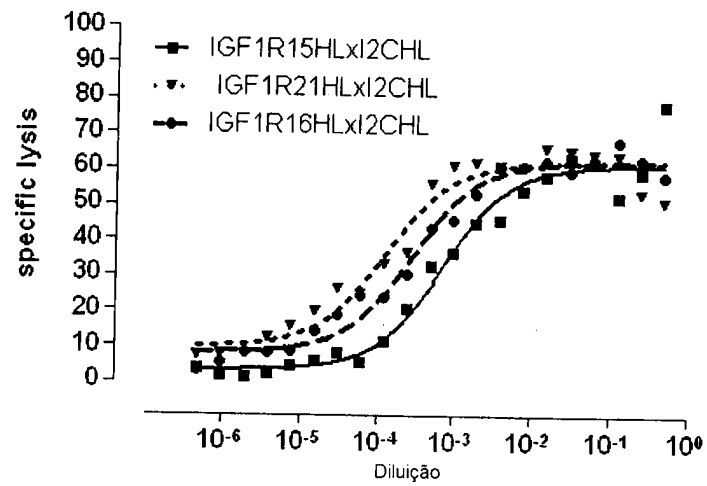


Figura 74a

Células T efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R humano



Células T efectoras: 4119 LnPx símio
 Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R símio

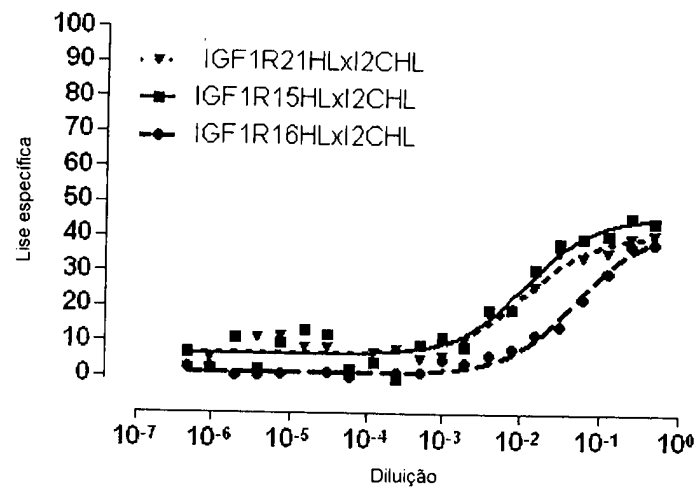
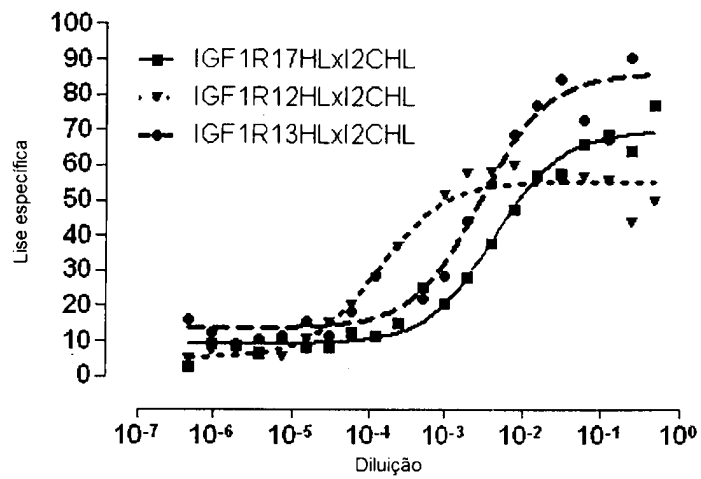


Figura 74b

Células T efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R humano



Células T efetoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R símio

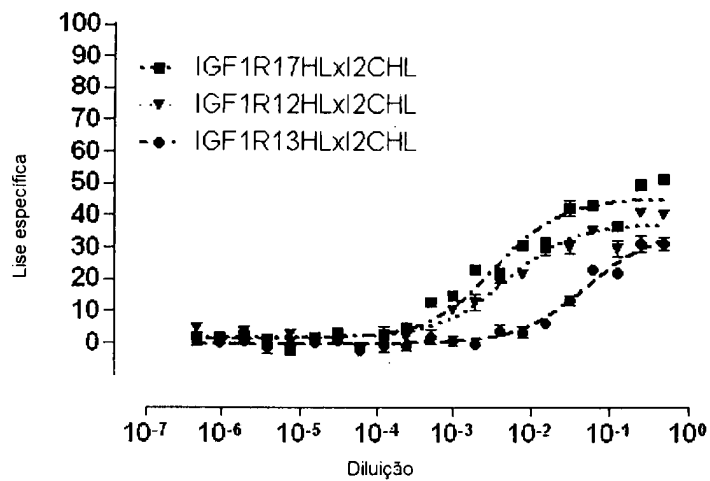
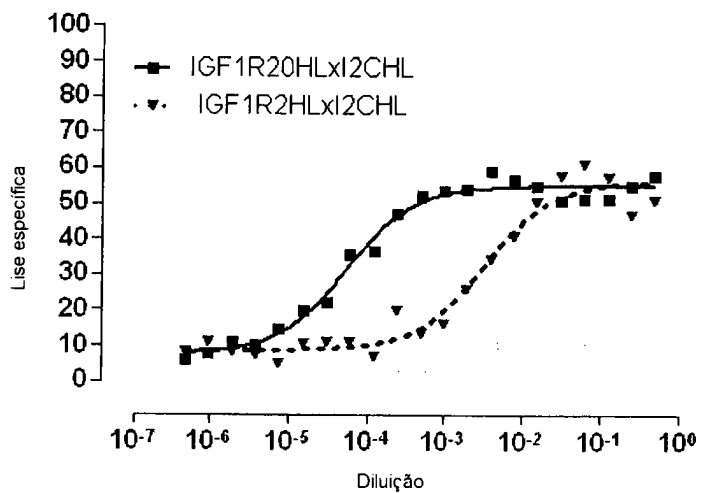


Figura 74c

Células T efetoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R humano



Células T efetoras: 4119 LnPx símio
Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R símio

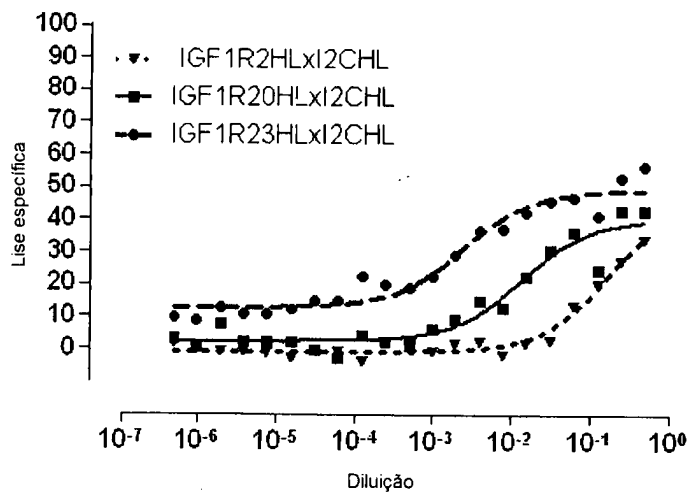
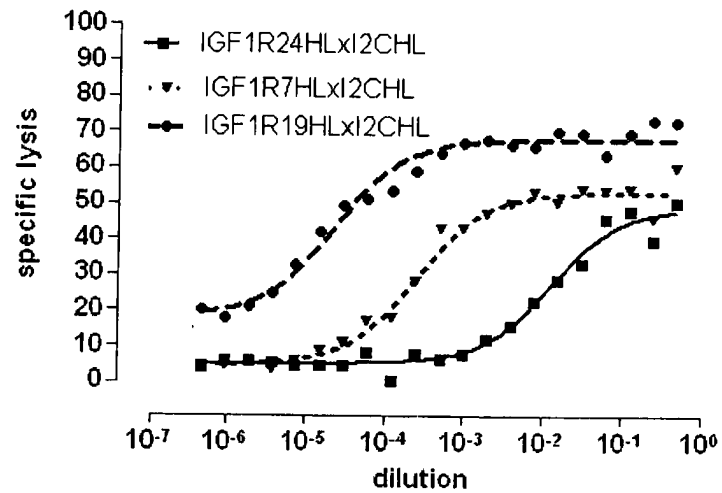


Figura 74d

Células T efectoras: PBMC humano depletado de CD4/CD56 estimulado
 Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R humano



Células T efectoras: 4119 LnPx símio
 Células alvo: CHO transfectado com IGF-1R símio

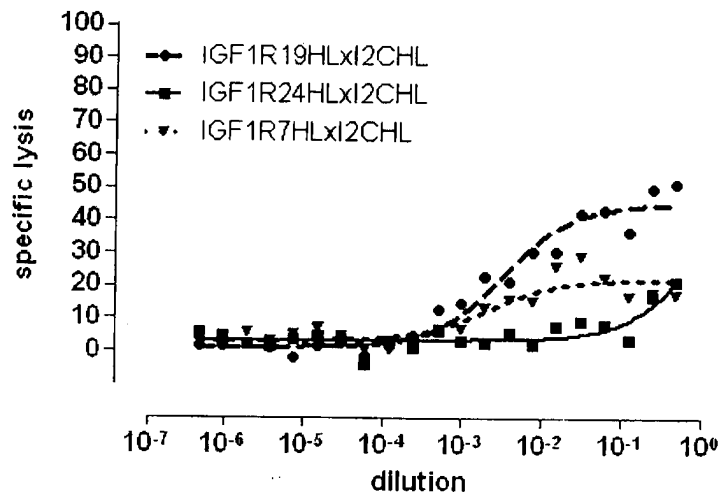


Figura 74e