República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021000186-7 A2

(22) Data do Depósito: 18/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 10/08/2021

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 BIESPECÍFICOS E USOS DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: A61K 39/00; A61P 35/02; C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 17/01/2019 US 62/793,645; 19/07/2018 US 62/700,596; 26/10/2018 US 62/750,968.

(71) Depositante(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

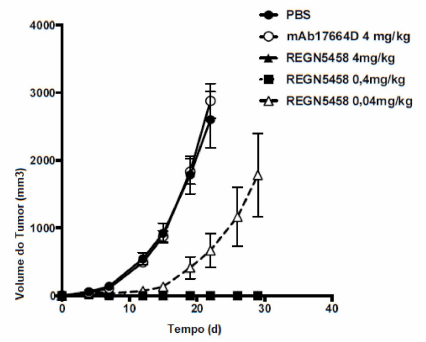
(72) Inventor(es): ERIC SMITH; KARA OLSON; FRANK DELFINO; DAVID DILILLO; JESSICA KIRSHNER; OLGA SINESHCHEKOVA; QIAN ZHANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2019042447 de 18/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/018820 de 23/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 06/01/2021

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 BIESPECÍFICOS E USOS DOS MESMOS. O antígeno de maturação de células B (BCMA) é expresso em células plasmáticas malignas. A presente invenção refere-se a anticorpos biespecíficos inovadores (bsAbs) que se ligam tanto a BCMA quanto ao CD3 e ativam células T por meio do complexo de CD3 na presença de células tumorais que expressam BCMA. Em certas modalidades, as moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção são capazes de inibir o crescimento de tumores que expressam BCMA. As moléculas de ligação a antígeno biespecífico da invenção são úteis para o tratamento de doenças e distúrbios em que uma resposta imune que tem como alvo BCMA positivamente regulado ou induzido é desejada e/ou terapeuticamente benéfica. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos da invenção são úteis para o tratamento de vários cânceres, incluindo mieloma múltiplo.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 BIESPECÍFICOS E USOS DOS MESMOS".**

REFERÊNCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[001] O presente pedido incorpora, a título de referência, a listagem de sequências submetida em forma legível por computador como o arquivo 10452WO01-Sequence, criado em 8 de julho de 2019 e que contém 63.211 bytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que são específicos para antígeno de maturação de células B (BCMA), e a métodos de uso dos mesmos. A presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecíficas (por exemplo, anticorpos biespecíficos) que ligam BCMA e CD3, e métodos de uso dos mesmos.

ANTECEDENTES

[003] O antígeno de maturação de células B (BCMA), também conhecido como TNFRSF17, ou CD269, é uma proteína transmembranar do tipo III sem um peptídeo sinal e contendo um domínio extracelular rico em cisteína. O BCMA, junto com proteínas intimamente relacionadas, promove a sobrevivência das células B em estágios distintos de desenvolvimento. O BCMA é expresso exclusivamente em células da linhagem de células B, particularmente na região interfolicular do centro germinativo, bem como em plasmablastos e células plasmáticas diferenciadas. O BCMA é induzido seletivamente durante a diferenciação das células plasmáticas e é necessário para a sobrevivência ideal das células plasmáticas de longa vida na medula óssea. No mieloma múltiplo, o BCMA é amplamente expresso em células plasmáticas malignas em níveis elevados, e a expressão do BCMA é aumentada com a progressão de células normais

para mieloma múltiplo ativo. O BCMA também é expresso em outras doenças malignas de células B, incluindo macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B. Tai *et al.*, *Immunotherapy*, 7(11): 1.187 a 1.199, 2015.

[004] [0001] O CD3 é um antígeno homodimérico ou heterodimérico expresso em células T em associação com o complexo receptor de células T (TCR) e é necessário para a ativação de células T. O CD3 funcional é formado pela associação dimérica de duas de quatro cadeias diferentes: épsilon, zeta, delta e gama. Os arranjos diméricos de CD3 incluem gama/épsilon, delta/épsilon e zeta/zeta. Os anticorpos contra CD3 mostraram agrupar CD3 em células T, causando assim a ativação de células T de uma maneira semelhante ao engajamento do TCR por moléculas MHC carregadas com peptídeo. Assim, anticorpos anti-CD3 têm sido propostos para fins terapêuticos envolvendo a ativação de células T. Adicionalmente, anticorpos biespecíficos que são capazes de se ligar a CD3 e a um antígeno-alvo foram propostos para utilizações terapêuticas envolvendo respostas imunológicas de células T que alvejam tecidos e células que expressam o antígeno-alvo.

[005] As moléculas de ligação a antígeno que têm como alvo BCMA, incluindo moléculas de ligação a antígeno biespecíficas que se ligam tanto a BCMA quanto a CD3 seriam úteis em configurações terapêuticas em que o alvejamento específico e a morte mediada por células T de células que expressam BCMA são desejados.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Em um aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado que compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que especificamente se liga a um antígeno de maturação de células B humanas (BCMA) em uma célula de tumor-alvo, com uma EC_{50} de menos do que cerca de 100 nM

conforme medido por um ensaio de ligação FACS *in vitro*; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno (D2) que se liga especificamente ao CD3 humano com uma EC_{50} de menos do que cerca de 10^{-6} M, conforme medido por um ensaio de ligação FACS *in vitro*.

[007] Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico ativa as células T *in vitro* com uma EC_{50} inferior a cerca de 10^{-9} M. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico medeia a morte de células T *in vitro* de linhagens de células tumorais que expressam BCMA com uma EC_{50} de menos de cerca de 10^{-9} M. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico medeia a morte de células T autólogas *in vitro* de células de mieloma primárias que expressam BCMA com uma EC_{50} de menos de cerca de 10^{-8} M. Em alguns modalidades, a molécula de ligação a antígeno biespecífico interage com os resíduos de aminoácidos 1 a 43 de BCMA conforme estabelecido na SEQ ID NO: 115.

[008] Em alguns casos, a célula tumoral-alvo é uma célula plasmática. Em alguns casos, a célula tumoral-alvo é de um paciente que sofre de mieloma múltiplo ou de outro distúrbio de células B caracterizado em parte como tendo células B que expressam BCMA. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico inibe a proliferação de células tumorais que expressam BCMA a uma dose de cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 4,0 mg/kg. Em alguns casos, a dose é de 0,04 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 4 mg/kg. Em algumas modalidades, a dose é administrada a um paciente em necessidade da mesma pelo menos duas vezes por semana em pelo menos sete doses. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico inibe a proliferação de células tumorais BCMA+ selecionadas a partir do grupo que consiste em células de mieloma, células de linfoma e células de leucemia. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico inibe a proliferação de células tumorais BCMA+ selecionadas a partir do grupo

que consiste em células H929, células MOLP-8 e células OPM.

[009] Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico apresenta reação cruzada com BCMA cynomolgus. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico não apresenta reação cruzada com BCMA cynomolgus.

[0010] Em algumas modalidades, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende: (a) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas dentro de uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66; e (b) três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em uma região variável de cadeia leve (LCVR) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende uma HCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, uma HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 e uma HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 72. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende uma LCDR1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 e uma LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0011] Em algumas modalidades, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende: (a) três regiões determinantes de

complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas dentro de uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 ou SEQ ID NO: 98; e (b) três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em uma região variável de cadeia leve (LCVR) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende: (a) uma HCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 ou SEQ ID NO: 100; (b) uma HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 94 ou SEQ ID NO: 102; e (c) uma HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 ou SEQ ID NO: 104. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende uma LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 e uma LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende: (a) domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 94, 96; e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; ou (b) domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 100, 102, 104; e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende: (a) uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90 e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82; ou (b) uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, e uma

LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0012] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, compreendendo: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 68, 70, 72 e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende os domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 92, 94, 96 e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0013] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, compreendendo: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 68, 70, 72 e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende os domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as

sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 100, 102, 104 e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82.

[0014] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, compreendendo: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao BCMA humano e compreende as CDRs de uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 122 e 124, e as CDRs de uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 82, 123 e 125; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao CD3 humano. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende as CDRs de um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 e 124/82. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende domínios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, selecionados a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64, 68-70-72-76-78-80, 4-6-8-84-86-88, 20-22-24-84-86-88,

36-38-40-84-86-88, 52-54-56-84-86-88 e 68-70-72-84-86-88. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 e 124/82. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende as CDRs de um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 90/82 e 98/82.

[0015] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado que compete pela ligação a BCMA, ou se liga ao mesmo epítopo em BCMA como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 66/82 e um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 90/82 ou SEQ ID NOs: 98/82.

[0016] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado que compete pela ligação ao CD3 humano, ou se liga ao mesmo epítopo no CD3 humano como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno compreendendo um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 66/82 e um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 90/82 ou SEQ ID NOs: 98/82.

[0017] Qualquer uma das moléculas de ligação a antígeno biespecíficas discutidas acima ou aqui pode ser um anticorpo

biespecífico. Em alguns casos, o anticorpo biespecífico compreende uma região constante de cadeia pesada de IgG humana. Em alguns casos, a região constante da cadeia pesada de IgG humana é isotipo IgG1. Em alguns casos, a região constante da cadeia pesada de IgG humana é isotipo IgG4. Em várias modalidades, o anticorpo biespecífico compreende uma dobradiça quimérica que reduz a ligação do receptor Fcγ em relação a uma dobradiça de tipo selvagem do mesmo isotipo.

[0018] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação a antígeno biespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico) discutido acima ou aqui, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0019] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma molécula de ligação a antígeno biespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico) discutida acima ou aqui.

[0020] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um vetor de expressão que compreende a molécula de ácido nucleico discutida acima.

[0021] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma célula hospedeira que compreende o vetor de expressão discutido acima.

[0022] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para inibir o crescimento de um tumor de células plasmáticas em um indivíduo que compreende administrar uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado ou uma composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação a antígeno biespecífico, como discutido acima ou aqui, ao indivíduo. Em alguns casos, o tumor de células plasmáticas é mieloma múltiplo. Em alguns casos, o método compreende ainda administrar um segundo agente terapêutico ou regime terapêutico. Em algumas modalidades, o segundo agente

terapêutico compreende um agente antitumoral (por exemplo, agentes quimioterápicos incluindo melfalano, vincristina (Oncovina), ciclofosfamida (Citoxano), etopósido (VP-16), doxorrubicina (Adriamicina), doxorrubicina lipossomal (Doxila), obendamustina (Treanda) ou qualquer outro conhecido por ser eficaz no tratamento de um tumor de células plasmáticas em um indivíduo). Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende esteroides. Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende terapias direcionadas, incluindo talidomida, lenalidomida e bortezomibe, que são terapias aprovadas para tratar pacientes recém-diagnosticados. Lenalidomida, pomalidomida, bortezomibe, carfilzomibe, panobinostate, ixazomibe, elotuzumabe e daratumumabe são exemplos de um segundo agente terapêutico eficaz para o tratamento de mieloma recorrente. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é um regime que compreende radioterapia ou um transplante de células-tronco. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um agente imunomodulador. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um inibidor de proteassoma, incluindo bortezomibe (Velcade), carfilzomibe (Kyprolis), ixazomibe (Ninlaro). Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um inibidor de histona desacetilase, como panobinostat (Farydak). Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um anticorpo monoclonal, um conjugado de fármaco de anticorpo, um conjugado de anticorpo biespecífico a um agente antitumoral, um inibidor de ponto de verificação ou combinações dos mesmos.

[0023] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um paciente que sofre de mieloma múltiplo, ou de outra malignidade de célula B que expressa BCMA, em que o método compreende administrar uma molécula de ligação a antígeno

biespecífico isolado ou uma composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação a antígeno biespecífico, como discutido acima ou aqui, ao indivíduo. Em alguns casos, a malignidade de células B que expressa BCMA é selecionada a partir do grupo que consiste em macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B, linfoma não Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma de zona marginal, linfoma linfoplasmocitário e linfoma de Hodgkin. Em alguns casos, o método compreende ainda a administração de um segundo agente terapêutico. Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende um agente antitumoral (um agente quimioterápico), alquiladores de DNA, imunomoduladores, inibidores de proteassoma, radioterapia de inibidores de histona desacetilase, um transplante de células-tronco, um imunomodulador, um anticorpo monoclonal que interage com um antígeno expresso na superfície da célula tumoral, um anticorpo monoclonal diferente dos aqui descritos, que pode interagir com um antígeno diferente na superfície da célula plasmática, um anticorpo biespecífico, que tem um braço que se liga a um antígeno na superfície da célula tumoral e o outro braço que se liga a um antígeno em uma célula T, um conjugado de anticorpo e fármaco, um anticorpo biespecífico conjugado com um agente antitumoral, um inibidor de ponto de verificação, por exemplo, um que tem como alvo PD-1 ou CTLA-4, ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, os inibidores de ponto de verificação podem ser selecionados a partir de inibidores PD-1, como pembrolizumabe (Keytruda), nivolumabe (Opdivo) ou cemiplimabe (REGN2810). Em certas modalidades, os inibidores de ponto de verificação podem ser selecionados a partir de inibidores PD-L1, como atezolizumabe (Tecentriq), avelumabe (Bavencio) ou Durvalumabe (Imfinzi)). Em certas modalidades, os inibidores de ponto de verificação podem ser selecionados a partir de inibidores de CTLA-

4, como ipilimumabe (Yervoy). Outras combinações que podem ser utilizadas em conjunto com um anticorpo da invenção são descritas acima.

[0024] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um paciente que sofre de um tumor que expressa BCMA, em que o método compreende administrar uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, conforme discutido acima ou aqui, ou uma composição farmacêutica que compreende a mesma, ao indivíduo em combinação com um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em alguns casos, o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno é um anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é cemiplimabe (REGN2810). Em várias modalidades, a combinação de molécula de ligação a antígeno biespecífico anti-BCMA x anti-CD3 (por exemplo, um anticorpo biespecífico) e um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno (por exemplo, um anticorpo anti-PD-1) produz um efeito terapêutico sinérgico no tratamento de tumores que expressam BCMA.

[0025] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso das moléculas de ligação a antígeno biespecíficos discutidas acima ou aqui, ou as composições farmacêuticas discutidas acima ou aqui, no tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão de BCMA. Em alguns casos, a doença ou distúrbio é câncer. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo. Em alguns casos, a doença ou distúrbio é doença de Castleman. Em alguns casos, as moléculas de ligação a antígeno são para uso em combinação com um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, opcionalmente em que o anticorpo anti-PD-1 é cemiplimabe (REGN2810).

[0026] A presente invenção inclui ainda o uso das moléculas de ligação a antígeno biespecíficas discutidas acima ou aqui na fabricação

de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão de BCMA. Em alguns casos, a doença ou distúrbio é câncer. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo.

[0027] Em várias modalidades, qualquer um dos recursos ou componentes das modalidades discutidas acima ou no presente documento pode ser combinadas e essas combinações estão incluídas no escopo da presente divulgação. Qualquer valor específico discutido acima ou aqui pode ser combinado com outro valor relacionado discutido acima ou aqui para recitar uma faixa com os valores representando as extremidades superior e inferior do intervalo, e esses intervalos estão incluídos no escopo da presente divulgação.

[0028] Outras modalidades irão se tornar evidentes a partir de uma revisão da descrição detalhada a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0029] As Figuras 1 e 2 ilustram a inibição profilática do tumor dependente da dose de células tumorais de mieloma múltiplo humano NCI-H929 que expressam BCMA *in vivo* por anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 e REGN5459, respectivamente. As células NCI-H929 expressam níveis elevados de BCMA.

[0030] As Figuras 3 e 4 ilustram a inibição terapêutica do tumor dependente da dose de células tumorais de mieloma múltiplo humano NCI-H929 expressando BCMA *in vivo* por anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 e REGN5459, respectivamente. As células NCI-H929 expressam níveis elevados de BCMA.

[0031] As Figuras 5 e 6 ilustram a inibição profilática do tumor dependente da dose de células tumorais de mieloma múltiplo humano que expressam BCMA MOLP-8 *in vivo* por anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 e REGN5459, respectivamente. As células MOLP-8 expressam níveis moderados de BCMA.

[0032] A Figura 7 ilustra uma redução terapêutica na carga tumoral estabelecida de células tumorais de mieloma múltiplo humano OPM-2 expressando BCMA *in vivo* por anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 e REGN5459, em relação aos controles. As células OPM-2 expressam baixos níveis de BCMA.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0033] Antes de a presente invenção ser descrita, deve ser entendido que a presente invenção não é limitada a métodos e condições experimentais particulares descritos, visto que tais métodos e condições podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada no presente documento é para o propósito de descrever modalidades particulares apenas, e não se destina a ser limitante, visto que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

[0034] Exceto se for definido de outro modo, todos os termos técnicos e específicos usados no presente documento têm o mesmo significado que é comumente entendido por um elemento de habilidade comum na técnica à qual a presente invenção pertence. Como aqui utilizado, o termo "cerca de", quando utilizado em referência a um valor numérico particular recitado, significa que o valor pode variar do valor indicado em não mais do que 1%. Por exemplo, como usado no presente documento, a expressão "cerca de 100" inclui 99 e 101 e todos os valores entre (por exemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

[0035] Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são, agora, descritos. Todas as patentes, pedido e publicações de não patente mencionados no presente relatório específico são incorporados no presente documento a título de referência em suas totalidades.

DEFINIÇÕES

[0036] A expressão "CD3", como usado no presente documento, se refere a um antígeno que é expressado em células T como parte do receptor de célula T multimolecular (TCR) e que consiste em um homodímero ou heterodímero formado a partir da associação de duas dentre quatro cadeias de receptor: CD3-épsilon, CD3-delta, CD3-zeta e CD3-gama. CD3-épsilon humano compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 116; CD3-delta humano compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 117; CD3-zeta humano compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 118; e CD3-gama compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO 119. Todas as referências a proteínas, polipeptídeos e fragmentos de proteínas aqui se destinam a se referir à versão humana da respectiva proteína, polipeptídeo ou fragmento de proteína, a menos que explicitamente especificado como sendo de uma espécie não humana. Portanto, a expressão "CD3" significa o CD3 humano, exceto se for especificado como sendo de uma espécie não humana, por exemplo, "CD3 de camundongo", "CD3 de macaco", etc.

[0037] Como usado no presente documento, "um anticorpo que se liga ao CD3" ou um "anticorpo anti-CD3" inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que reconhecem especificamente uma única subunidade de CD3 (por exemplo, épsilon, delta, gama ou zeta), assim como anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que reconhecem especificamente um complexo dimérico de duas subunidades de CD3 (por exemplo, dímeros de CD3 gama/épsilon, delta/épsilon e zeta/zeta). Os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da presente invenção podem se ligar a CD3 solúvel e/ou CD3 expressado em superfície celular. O CD3 solúvel inclui proteínas de CD3 naturais assim como variantes de proteína de CD3 recombinante

como, por exemplo, construtos de CD3 monoméricos e diméricos, desprovidos de um domínio transmembranar ou são, de outro modo, não associados a uma membrana celular.

[0038] Como usado no presente documento, a expressão "CD3 expressado em superfície celular" significa uma ou mais proteína de CD3 que são expressadas na superfície de uma célula *in vitro* ou *in vivo*, de modo que pelo menos uma porção de uma proteína de CD3 seja exposta ao lado extracelular da membrana celular e seja acessível a uma porção de ligação a antígeno de um anticorpo. O "CD3 expressado em superfície celular" inclui proteínas de CD3 contidas dentro do contexto de um receptor de célula T funcional na membrana de uma célula. A expressão "CD3 expresso na superfície celular" inclui a proteína CD3 expressa como parte de um homodímero ou heterodímero na superfície de uma célula (por exemplo, gama/épsilon, delta/épsilon e dímeros zeta/zeta CD3). A expressão "CD3 expresso na superfície celular" também inclui uma cadeia CD3 (por exemplo, CD3-épsilon, CD3-delta ou CD3-gama) que é expressa por si mesma, sem outros tipos de cadeia CD3, na superfície de uma célula. Um "CD3 expresso na superfície celular" pode compreender ou consistir em uma proteína CD3 expressa na superfície de uma célula que normalmente expressa a proteína CD3. Alternativamente, "CD3 expressado em superfície celular" pode compreender ou consistir na proteína de CD3 expressada na superfície de uma célula que normalmente não expressa CD3 humano em sua superfície, porém, foi geneticamente modificada artificialmente para expressar CD3 em sua superfície.

[0039] A expressão "BCMA", tal como utilizada no presente documento, refere-se ao antígeno de maturação de células B. O BCMA (também conhecido como TNFRSF17 e CD269) é uma proteína de superfície celular expressa em células plasmáticas malignas e desempenha um papel central na regulação da maturação e

diferenciação de células B em células plasmáticas produtoras de imunoglobulina. A sequência de aminoácidos do BCMA humano é mostrada na SEQ ID NO: 115 e também pode ser encontrada no número de acesso do GenBank NP_001183.2.

[0040] Como usado no presente documento, "um anticorpo que se liga a BCMA" ou um "anticorpo anti-BCMA" inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que reconhecem especificamente BCMA.

[0041] O termo "molécula de ligação a antígeno" inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de anticorpos, incluindo, por exemplo, anticorpos biespecíficos.

[0042] O termo "anticorpo", como usado no presente documento, significa qualquer molécula de ligação a antígeno ou complexo molecular que compreende pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) que se liga especificamente a ou interage com um antígeno particular (por exemplo, BCMA ou CD3). O termo "anticorpo" inclui molécula de imunoglobulina que compreendem quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto, assim como multímeros dos mesmos (por exemplo, IgM). O termo "anticorpo" também inclui moléculas de imunoglobulina que consistem em quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (abreviada no presente documento como HCVR ou V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada compreende três domínios, C_H1, C_H2 e C_H3. Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (abreviada no presente documento como LCVR ou V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante da cadeia leve compreende um domínio (C_L1). As regiões V_H e V_L podem

ser subdivididas adicionalmente em regiões de hipervariabilidade, denominadas de regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir de aminoterminação à carboxiterminação na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em modalidades diferentes da invenção, as FRs do anticorpo anti-BCMA ou anticorpo anti-CD3 (ou a porção de ligação a antígeno dos mesmos) pode ser idêntica às sequências de linhagem germinativa humanas, ou pode ser modificado natural ou artificialmente. Uma sequência de consenso de aminoácidos pode ser definida com base em uma análise tipo lado a lado de duas ou mais CDRs.

[0043] O termo "anticorpo", como usado no presente documento, também inclui fragmentos de ligação a antígeno de moléculas de anticorpo completas. Os termos "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo, e similares, como usado no presente documento, incluem qualquer polipeptídeo de ocorrência natural, enzimaticamente obtenível, sintético ou geneticamente modificado ou glicoproteína que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os fragmentos de ligação a antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de moléculas de anticorpo completas com o uso de quaisquer técnicas padrão adequadas, tais como digestão proteolítica ou técnicas de modificação genética recombinante que envolvem a manipulação e expressão de DNA que codifica domínios variável e (opcionalmente) constante de anticorpo. Esse DNA é conhecido e/ou está prontamente disponível, por exemplo, junto a fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo) ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou com o uso de técnicas de biologia

molecular, por exemplo, para dispor um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar aminoácidos, etc.

[0044] Exemplos não limitantes de fragmentos de ligação a antígeno incluem: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')2; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadeia simples (scFv); (vi) fragmentos de dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimo que consistem nos resíduos de aminoácidos que imitam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região determinante de complementaridade isolada (CDR), como um peptídeo CDR3) ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restringido. Outras moléculas geneticamente modificadas, como anticorpos específicos de domínio, anticorpos de domínio único, anticorpos com domínio excluído, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (por exemplo, nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes etc.), imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs) e domínios IgNAR variáveis de tubarão, também são abrangidos pela expressão "fragmento de ligação a antígeno", conforme usado no presente documento.

[0045] Um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo irá compreender tipicamente pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácido e irá compreender geralmente pelo menos uma CDR que é adjacente a ou enquadrada com uma ou mais sequências de arcabouço. Nos fragmentos de ligação a antígeno que têm um domínio V_H associado a um domínio V_L, os domínios V_H e V_L podem estar situados um em relação ao outro em qualquer disposição adequada. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros V_H -V_H, V_H-V_L ou V_L

-V_L. Alternativamente, o fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo pode conter um domínio de V_H ou V_L monomérico.

[0046] Em determinadas modalidades, um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável ligado de maneira covalente a pelo menos um domínio constante. As configurações exemplificativas não limitativas de domínios variáveis e constantes que podem ser encontradas dentro de um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo da presente invenção incluem: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; e (xiv) V_L-C_L. Em qualquer configuração de domínios varieis e constantes, incluindo qualquer uma das configurações exemplificativas listadas acima, os domínios variável e constante podem ser ligados diretamente entre si ou podem ser ligados por uma região ligante ou região de dobradiça completa ou parcial. Uma região de dobradiça pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos que resultam em uma ligação flexível ou semiflexível entre variáveis adjacentes e/ou domínios constantes em uma molécula de polipeptídeo única. Ademais, um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma dentre as configurações de domínio variável e constante listadas acima em associação não covalente entre si e/ou a um ou mais domínios de monoméricos V_H ou V_L (por exemplo, por ligação (ou ligações) de dissulfeto).

[0047] Como ocorre com as moléculas de anticorpo completas, os fragmentos de ligação a antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos). Um fragmento de ligação a antígeno multiespecífico de um anticorpo tipicamente irá compreender

pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de se liga especificamente a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpo biespecífico exemplificativos divulgados no presente documento, pode ser adaptado para uso no contexto de um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo da presente invenção com o uso de técnicas de rotina disponíveis na técnica.

[0048] Os anticorpos da presente invenção podem funcionar através de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC). A "citotoxicidade dependente de complemento" (CDC) se refere à lise de células que expressam antígeno por um anticorpo da invenção na presença de complemento. "Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" (ADCC) refere-se a uma reação mediada por células em que células citotóxicas não específicas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células Natural Exterminadora (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado em uma célula-alvo e, assim, levar à lise da célula-alvo. CDC e ADCC podem ser medidos utilizando ensaios que são bem conhecidos e disponíveis na técnica. (Ver, por exemplo, Patentes nºs US 5.500.362 e 5.821.337, e Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sei. (EUA) *95*:652 a 656). A região constante de um anticorpo é importante na capacidade de um anticorpo de fixar complemento e mediar a citotoxicidade dependente de células. Portanto, o isotipo de um anticorpo pode ser selecionado com base na possibilidade de ser desejável que o anticorpo medie a citotoxicidade.

[0049] Em certas modalidades da invenção, os anticorpos monoespecíficos anti-BCMA ou anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 da invenção são anticorpos humanos. O termo "anticorpos

humano", como usado no presente documento, é destinado a incluir anticorpos que têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulinas de linhagem germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese sítio-específica aleatória *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs e, em particular, na CDR3. Entretanto, o termo "anticorpos humano", como usado no presente documento, não se destina a incluir anticorpos em que sequências de CDR derivadas da linhagem germinal de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências de arcabouço humanas.

[0050] Os anticorpos da invenção podem, em algumas modalidades, ser anticorpos humanos recombinantes. O termo "anticorpos humano recombinantes", como usado no presente documento, se destina a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressados, criados ou isolados por meios recombinantes, como anticorpos expressados com o uso de um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira (descrita mais abaixo), anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatoriais recombinantes (descrita mais abaixo), anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana (consultar, por exemplo, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6.287 a 6.295) ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva o splicing de sequências de genes de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Esses anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em

certas modalidades, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes são submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humana é usado, mutagênese somática *in vivo*) e, assim, as sequências de aminoácidos das regiões de V_H e V_L de anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas às sequências de V_H e V_L de linhagem germinal humana, pode não existir naturalmente dentro do repertório de linhagem germinal de anticorpo humano *in vivo*.

[0051] Os anticorpos humanos podem existir em duas formas que são associadas à heterogeneidade de articulação. Em uma forma, uma molécula de imunoglobulina compreende um construto estável de quatro cadeias de aproximadamente 150 a 160 kDa em que os dímeros são mantidos juntos por uma ligação de dissulfeto de cadeia pesada intercadeias. Em uma segunda forma, os dímeros não são ligados através de ligações dissulfeto entre cadeias e uma molécula de cerca de 75 a 80 kDa é formada composta por uma cadeia leve e pesada acoplada covalentemente (semianticorpo). Essas formas foram extremamente difíceis de separar, mesmo após a purificação de afinidade.

[0052] A frequência de aparecimento da segunda forma em vários isotipos de IgG intactos se deve a, mas sem limitações, diferenças estruturais associadas ao isotipo de região de articulação do anticorpo. Uma única substituição de aminoácido na região de articulação da articulação de IgG4 humana pode reduzir significativamente o aparecimento da segunda forma (Angal *et al*. (1993) Molecular Immunology 30:105) a níveis tipicamente observados com o uso de uma articulação de IgG1 humana. A presente invenção engloba anticorpos que têm uma ou mais mutações na articulação, região de C_H2 ou C_H3 que podem ser desejáveis, por exemplo, na produção, para aprimorar o rendimento da forma de anticorpo desejada.

[0053] Os anticorpos da invenção podem ser anticorpos isolados. Um "anticorpo isolado", como usado no presente documento, significa um anticorpo que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de pelo menos um componente de seu ambiente natural. Por exemplo, um anticorpo que foi separado ou removido de pelo menos um componente de um organismo, ou de um tecido ou célula em que o anticorpo existe naturalmente ou é produzido naturalmente, é um "anticorpo isolado" para os fins da presente invenção. Um anticorpo isolado também inclui um anticorpo *in situ* dentro de uma célula recombinante. Os anticorpos isolados são anticorpos que foram submetidos a pelo menos uma etapa de purificação ou isolamento. De acordo com certas modalidades, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou agentes químicos.

[0054] A presente invenção também inclui anticorpos de um braço que se ligam ao BCMA. Como usado no presente documento, um "anticorpo de um braço" significa uma molécula de ligação a antígeno que compreende uma cadeia pesada de anticorpo único e uma cadeia leve de anticorpo único. Os anticorpos de um braço da presente invenção podem compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR ou CDR como apresentado na Tabela 1.

[0055] Os anticorpos anti-BCMA ou anti-BCMA x anti-CD3 divulgados no presente documento podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos nas regiões de arcabouço e/ou CDR dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve em comparação com as sequências de linhagem germinativa correspondentes das quais os anticorpos foram derivados. Tais mutações podem ser prontamente apuradas comparando-se as sequências de aminoácidos divulgadas no presente documento com sequências de linhagem germinativa disponíveis a partir de, por exemplo, bancos de dados públicos de sequência de anticorpo. A

presente invenção inclui anticorpos, e os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que são derivados de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos divulgadas no presente documento, sendo que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões estruturais e/ou CDR sofrem mutação para o resíduo correspondente (ou resíduos correspondentes) da sequência da linhagens germinativas da qual o anticorpo foi derivado ou do resíduo correspondente (ou resíduos correspondentes) de outra sequência da linhagens germinativas humanas, ou a uma substituição conservadora de aminoácido do resíduo (ou resíduos) da linhagem germinativa correspondente (tais alterações de sequência são denominadas no presente documento coletivamente de "mutações de linhagem germinativa"). Uma pessoa versada na técnica, começando com as sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e leve divulgadas no presente documento, pode produzir facilmente inúmeros anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que compreendem uma ou mais mutações de linhagem germinativa individual ou suas combinações dos mesmos. Em determinadas modalidades, todos os resíduos de framework e/ou de CDR dentro dos domínios V_H e/ou V_L sofrem mutação de volta para os resíduos constatados na sequência original de linhagens germinativas da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas determinados resíduos sofrem mutação de volta para a sequência original de linhagens germinativas, por exemplo, apenas os resíduos que sofreram mutação constatados nos primeiros 8 aminoácidos do FR1 ou nos últimos 8 aminoácidos do FR4, ou apenas os resíduos que sofreram mutação constatados no CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais dos resíduos de framework e/ou de CDR sofrem mutação para o resíduo correspondente (ou resíduos correspondentes) de uma sequência diferentes de linhagens germinativas (isto é, uma sequência de linhagens germinativas que é

diferente da sequência de linhagens germinativas da qual o anticorpo derivou originalmente). Além disso, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações da linhagem germinativa dentro das regiões framework e/ou de CDR, por exemplo, em que determinados resíduos individuais sofrem mutação para o resíduo correspondente de uma determinada sequência de linhagens germinativas ao passo que alguns outros resíduos que são diferentes da sequência original de linhagens germinativas são mantidos ou sofrem mutação para o resíduo correspondente de uma sequência diferente da linhagem germinativa. Uma vez obtidos, os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que contêm uma ou mais mutações germinativas podem ser facilmente testados em relação a uma ou mais propriedades desejadas, tais como melhor especificidade de ligação, maior afinidade de ligação, propriedades biológicas antagonistas ou agonísticas aprimoradas ou amplificadas (conforme o caso), imunogenicidade reduzida, etc. Os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno obtidos dessa maneira geral são abrangidos pela presente invenção.

[0056] A presente invenção também inclui anticorpos anti-BCMA x anti-CD3 que compreendem variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR divulgadas no presente documento que têm uma ou mais substituições conservadoras. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-BCMA ou anti-BCMA x anti-CD3 que têm sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR, por exemplo, com 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc., substituições de aminoácido conservadoras em relação a qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR apresentadas nas Tabelas 1 e 3 no presente documento, ou os anticorpos anti-CD3 divulgados no documento WO 2014/047231 ou WO 2017/053856, em que cada um desses está incorporado no presente

documento a título de referência.

[0057] O termo "epítopo" se refere a um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação de antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um único antígeno pode ter mais de um epítopo. Desse modo, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas de um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. Os epítopos podem ser conformacionais ou lineares. Um epítopo conformacional é produzido por aminoácidos justapostos espacialmente de diferentes segmentos da cadeia polipeptídica linear. Um epítopo linear é aquele produzido por resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica. Em certa circunstância, um epítopo pode incluir porções químicas de sacarídeos, grupos fosforila ou grupos sulfonila no antígeno.

[0058] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico", quando referente a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando idealmente alinhado com inserções ou deleções de nucleotídeo adequadas com outro ácido nucleico (ou seu filamento complementar), há identidade de sequência de nucleotídeo em pelo menos cerca de 95% e, mais preferencialmente, pelo menos cerca de 96%, 97%, 98% ou 99% das bases de nucleotídeo, como medido por um algoritmo bem conhecido de identidade de sequência, como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucleico que tem identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em determinados casos, codificar um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos igual ou substancialmente semelhante ao polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de referência.

[0059] Como aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeos, quando alinhadas de modo ideal, como pelos

programas GAP ou BESTFIT com o uso de ponderações de lacuna-padrão, compartilham pelo menos 95% de identidade de sequência, ainda mais preferencialmente, pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequência. Preferencialmente, as posições de resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservadoras. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição conservadora de aminoácidos não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos são diferentes entre si por substituições conservadoras, a porcentagem de identidade de sequência ou grau de similaridade pode ser ajustado de maneira ascendente para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para realizar esse ajuste são bem conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Consultar, por exemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307 a 331, no presente documento incorporado a título de referência. Os exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem (1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadeias laterais de hidroxila alifática: serina e treonina; (3) cadeias laterais que contêm amida: asparagina e glutamina; (4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; (5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato e (7) cadeias laterais que contêm enxofre: cisteína e metionina. Os grupos preferências de substituição de aminoácidos conservativas são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer alteração

que tenha um valor positivo na matriz de probabilidade de PAM250 divulgada em Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1.443 a 1.445, incorporado ao presente documento a título de referência. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração que tenha um valor não negativo na matriz PAM250 de probabilidade de log.

[0060] A similaridade de sequência para polipeptídeos, que também é chamada de identidade de sequência, é tipicamente medida com o uso de software de análise de sequência. O software de análise de proteína corresponde sequências similares com o uso de medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, o software GCG contém programas, tais como GAP e BESTFIT, que podem ser usados com parâmetros-padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e uma muteína da mesma. Consultar, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos também podem ser comparadas com o uso de FASTA com parâmetros recomendados ou padrão; um programa no GCG Versão 6.1. O FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e percentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson (2000) supra). Outro algoritmo preferencial quando uma sequência da invenção é comparada a uma base de dados que contém um grande número de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente, BLASTP ou TBLASTN, com o uso de parâmetros-padrão. Consulte, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 a 410 e Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3.389 a 3.402, cada um do quais incorporado ao presente documento a título de

referência.

MUTAÇÕES DE LINHAGEM GERMINATIVA

[0061] Os anticorpos anti-CD3 divulgados no presente documento compreendem uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos nas regiões de arcabouço e/ou CDR de domínios variáveis de cadeia pesada em comparação com as sequências de linhagem germinativa correspondentes das quais os anticorpos foram derivados.

[0062] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que são derivados de qualquer uma das sequências de aminoácidos divulgadas no presente documento, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões de arcabouço e/ou CDR são mutados para o resíduo (ou resíduos) correspondente da sequência de linhagem germinativa da qual o anticorpo foi derivado, ou para o resíduo (ou resíduos) correspondente de outra sequência de linhagem germinativa humana, ou para uma substituição de aminoácido conservadora do resíduo (ou resíduos) de linhagem germinal correspondente (tais alterações de sequência são chamadas, no presente documento, coletivamente de "mutações de linhagem germinal"), e que tem ligação fraca ou não detectável a um antígeno de CD3.

[0063] Ademais, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações de linhagem germinal dentro das regiões de arcabouço e/ou CDR, por exemplo, em que certos resíduos individuais são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagem germinativa particular enquanto certos outros resíduos que diferem da sequência de linhagem germinativa original são mantidos ou são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagem germinativa diferente. Uma vez obtidos, os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno que contêm uma ou mais mutações de linhagem germinal podem ser testados quanto a uma

ou mais propriedades desejadas como especificidade de ligação aprimorada, afinidade de ligação fraca ou reduzida, propriedades farmacocinéticas aprimoradas ou intensificadas, imunogenicidade reduzida, etc. Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno obtidos dessa maneira geral, considerando-se a orientação da presente divulgação são englobados dentro da presente invenção.

[0064] A presente invenção também inclui moléculas de ligação a antígeno que compreendem um domínio de ligação a antígeno com uma sequência de aminoácidos de HCVR e/ou CDR que é substancialmente idêntica a qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR e/ou CDR divulgadas no presente documento, enquanto mantém ou aprimora a afinidade fraca desejada ao antígeno de CD3. O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntica", em referência a uma sequência de aminoácidos significa que duas sequências de aminoácidos, quando idealmente alinhadas, como através dos programas GAP ou BESTFIT com o uso de ponderações de lacuna-padrão, compartilham pelo menos 95% de identidade de sequência, ainda mais preferencialmente pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequência. Preferencialmente, as posições de resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservadoras. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos são diferentes entre si por substituições conservadoras, a porcentagem de identidade de sequência ou grau de similaridade pode ser ajustado de maneira ascendente para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para realizar esse ajuste são bem conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Consultar, por exemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307 a 331.

[0065] A similaridade de sequência para polipeptídeos, que também é chamada de identidade de sequência, é tipicamente medida com o uso de software de análise de sequência. O software de análise de

proteína corresponde sequências similares com o uso de medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, o software GCG contém programas, tais como GAP e BESTFIT, que podem ser usados com parâmetros-padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e uma muteína da mesma. Consultar, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos também podem ser comparadas com o uso de FASTA com parâmetros recomendados ou padrão; um programa no GCG Versão 6.1. O FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e percentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson (2000) supra). Outro algoritmo preferencial quando uma sequência da invenção é comparada a uma base de dados que contém um grande número de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente, BLASTP ou TBLASTN, com o uso de parâmetros-padrão. Consultar, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 a 410 e Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3.389 a 3.402.

PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS

[0066] Como usado no presente documento, o termo "ligação" no contexto da ligação de um anticorpo, imunoglobulina, fragmento de ligação ao anticorpo, ou proteína contendo Fc, por exemplo, a um antígeno predeterminado, como uma proteína de superfície de célula ou fragmento da mesma, tipicamente se refere a uma interação ou associação entre um mínimo de duas entidades ou estruturas moleculares, como uma interação de anticorpo-antígeno.

[0067] Por exemplo, a afinidade de ligação tipicamente corresponde a um valor de K_D de cerca de 10^{-7} M ou menos, como cerca de 10^{-8} M ou menos, como cerca de 10^{-9} M ou menos quando determinado, por exemplo, tecnologia de ressonância plasmônica de superfície (SPR) em um instrumento de BIAcore 3000 com o uso do antígeno como o ligante e o anticorpo, Ig, fragmento de ligação ao anticorpo ou proteína contendo Fc como o analito (ou antiligante). As estratégias de ligação com base em célula, como ensaios de ligação de classificação celular ativada por fluorescência (FACS), também são usadas de modo rotineiro e os dados de FACS se correlacionam bem com outros métodos como ligação de competição de radioligante e SPR Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2): 223 a 231; Geuijen, CA, *et al*. *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68 a 77).

[0068] Consequentemente, o anticorpo ou proteína de ligação a antígeno da invenção se liga ao antígeno predeterminado ou (receptor de) molécula de superfície celular que tem uma afinidade correspondente a um valor de K_D que é pelo menos dez vezes inferior à sua afinidade para ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína). De acordo com a presente invenção, a afinidade de um anticorpo correspondente a um valor de K_D que é igual a ou menos do que dez vezes inferior a um antígeno não específico pode ser considerada uma ligação não detectável, entretanto, tal anticorpo pode ser emparelhado com um segundo braço de ligação de antígeno para a produção de um anticorpo biespecífico da invenção.

[0069] O termo "K_D" (M) se refere à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, ou à constante de equilíbrio de dissociação de um anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo que se liga a um antígeno. Há uma relação inversa entre K_D e afinidade de ligação, portanto, quanto menor o valor de K_D, maior, isto é, mais forte, a afinidade. Assim, os termos "afinidade mais

alta" ou "afinidade mais forte" se relacionam a uma capacidade mais alta de formar uma interação e, portanto, um valor K_D menor e, inversamente, os termos "afinidade mais baixa" ou "afinidade mais fraca" se referem a uma capacidade mais baixa de formar uma interação e, portanto, um valor K_D maior. Em algumas circunstâncias, uma afinidade mais alta de ligação (ou K_D) de uma molécula particular (por exemplo, anticorpo) à sua molécula parceira interativa (por exemplo, antígeno X) comparada com a afinidade de ligação da molécula (por exemplo, anticorpo) a outra molécula parceira interativa (por exemplo, antígeno Y) pode ser expressada como uma razão de ligação determinada dividindo-se um valor de K_D maior (afinidade mais baixa ou mais fraca) pela K_D menor (afinidade mais alta ou mais forte), por exemplo, expressada como uma afinidade de ligação 5 vezes ou 10 vezes maior, de acordo com o caso.

[0070] O termo "k_d" (s -1 ou 1/s) se refere à constante de taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, ou a constante de taxa de dissociação de um anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo. O dito valor também é chamado de valor de $k_{desativado}$.

[0071] O termo "k_a" (M-1 x s-1 ou 1/M) se refere à constante de taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, ou a constante de taxa de associação de um anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo.

[0072] O termo "K_A" (M-1 ou 1/M) se refere à constante de equilíbrio de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, ou à constante de equilíbrio de associação de um anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo. A constante de equilíbrio de associação é obtida dividindo-se a k_a pela k_d.

[0073] O termo "EC50" ou "EC_{50}" se refere à meia concentração eficaz máxima, que inclui a concentração de um anticorpo que induz

uma resposta intermediária entre a linha de base e o máximo após um tempo de exposição especificado. A EC_{50} essencialmente representa a concentração de um anticorpo em que 50% de seu efeito máximo é observado. Em certas modalidades, o valor de EC_{50} é igual à concentração de um anticorpo da invenção que dá metade da ligação máxima a células que expressam CD3 ou antígeno associado a tumor (por exemplo, BCMA), conforme determinado por, por exemplo, um ensaio de ligação FACS. Portanto, a ligação reduzida ou mais fraca é observada com uma EC_{50} aumentada, ou um valor de meia concentração eficaz máxima.

[0074] Em uma modalidade, a ligação reduzida pode ser definida como uma anticorpo concentração de EC_{50} aumentada que possibilita a ligação à meia quantidade máxima de células-alvo.

[0075] Em outra modalidade, o valor de EC_{50} representa a concentração de um anticorpo da invenção que suscita a meia depleção máxima de células-alvo por atividade de citotoxicidade de célula T. Portanto, a atividade de citotoxicidade aumentada (por exemplo, a morte de célula de tumor mediada por célula T) é observada com uma EC_{50} reduzida ou um valor de meia concentração eficaz máxima.

MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO BIESPECÍFICO

[0076] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos ou multiespecíficos. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítopos de um polipeptídeo-alvo ou podem conter domínios de ligação a antígeno específico para mais de um polipeptídeo-alvo. Consultar, por exemplo, Tutt *et al*., 1991, J. Immunol. 147:60 a 69; Kufer *et al*., 2004, Trends Biotechnol. 22:238 a 244. Os anticorpos monoespecíficos anti-BCMA ou anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 da presente invenção podem ser ligados a ou coexpressados com outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína. Por exemplo, um anticorpo ou

fragmento do mesmo pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, como outro anticorpo ou fragmento de anticorpo para produzir um anticorpo biespecífico ou multiespecífico com uma segunda especificidade de ligação ou uma especificidade de ligação adicional.

[0077] O uso da expressão "anticorpo anti-CD3" ou "anticorpo anti-BCMA" no presente documento é destinado a incluir tanto anticorpos monoespecíficos anti-CD3 quanto anti-BCMA, assim como anticorpos biespecíficos que compreendem um braço de ligação ao CD3 e um braço de ligação a BCMA. Portanto, a presente invenção inclui anticorpos biespecíficos em que um braço de uma imunoglobulina se liga ao CD3 humano, e o outro braço da imunoglobulina é específico para BCMA humano. O braço de ligação a BCMA pode compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR ou CDR como apresentado na Tabela 3 no presente documento, ou os anticorpos anti-CD3 divulgados no documento WO 2014/047231 ou WO 2017/053856.

[0078] Em certas modalidades, o braço de ligação ao CD3 se liga ao CD3 humano e induz a ativação de célula T humana. Em certas modalidades, o braço de ligação ao CD3 se liga fracamente ao CD3 humano e induz a ativação de célula T humana. Em outras modalidades, o braço de ligação ao CD3 se liga fracamente ao CD3 humano e induz a morte de células que expressam antígenos associados a tumor no contexto de um anticorpo biespecífico ou multiespecífico. Em outras modalidades, o braço de ligação ao CD3 se liga ou é associado fracamente ao CD3 humano ou cinomolgo (de macaco), contudo a interação de ligação não é detectável por ensaios *in vitro* conhecidos na técnica. O braço de ligação a BCMA pode compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR ou CDR como

apresentado na Tabela 1 no presente documento.

[0079] De acordo com certas modalidades exemplificativas, a presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecífico que se ligam especificamente ao CD3 e a BCMA. Tais moléculas podem ser referidas no presente documento como, por exemplo, moléculas biespecíficas "anti-BCMA x anti-CD3" ou "anti-CD3/anti-BCMA" ou "anti-CD3xBCMA" ou "CD3xBCMA" ou outra terminologia semelhante (por exemplo, anti-BCMA/anti-CD3).

[0080] O termo "BCMA", conforme no presente documento utilizado, refere-se à proteína de BCMA humano, a menos que seja especificada como sendo de uma espécie não humana (por exemplo, "BCMA de camundongo", "BCMA de macaco", etc.). A proteína de BCMA humano tem a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 115.

[0081] As moléculas de ligação a antígeno biespecíficas supracitadas que se ligam especificamente ao CD3 e a BCMA podem compreender uma molécula de ligação a antígeno anti-CD3 que se liga ao CD3 com uma afinidade de ligação fraca como exibindo uma K_D maior do que cerca de 40 nM, como medido por um ensaio de ligação de afinidade *in vitro*.

[0082] Como usado no presente documento, a expressão "molécula de ligação a antígeno" significa uma proteína, um polipeptídeo ou complexo molecular que compreende ou consiste em pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) que, sozinha ou em combinação com uma ou mais CDRs adicionais e/ou regiões de arcabouço (FRs), se liga especificamente a um antígeno particular. Em certas modalidades, uma molécula de ligação a antígeno é um anticorpo ou um fragmento de um anticorpo, como aqueles termos são definidos em outro local no presente documento.

[0083] Como usado no presente documento, a expressão "molécula

de ligação a antígeno biespecífico" significa uma proteína, um polipeptídeo ou complexo molecular que compreende pelo menos um primeiro domínio de ligação a antígeno e um segundo domínio de ligação a antígeno. Cada domínio de ligação a antígeno dentro da molécula de ligação a antígeno biespecífico compreende pelo menos uma CDR que, sozinha ou em combinação com uma ou mais CDRs e/ou FRs adicionais, se liga especificamente a um antígeno particular. No contexto da presente invenção, o primeiro domínio de ligação a antígeno se liga especificamente a um primeiro antígeno (por exemplo, BCMA) e o segundo domínio de ligação a antígeno se liga especificamente a um segundo antígeno distinto (por exemplo, CD3).

[0084] Em certas modalidades exemplificativas da presente invenção, a molécula de ligação a antígeno biespecífico é um anticorpo biespecífico. Cada domínio de ligação a antígeno de um anticorpo biespecífico compreende um domínio variável de cadeia pesada (HCVR) e um domínio variável de cadeia leve (LCVR). No contexto de uma molécula de ligação a antígeno biespecífico compreendendo um primeiro e um segundo domínio de ligação a antígeno (por exemplo, um anticorpo biespecífico), os CDRs do primeiro domínio de ligação a antígeno podem ser designados com o prefixo "D1" e os CDRs de o segundo domínio de ligação a antígeno pode ser designado com o prefixo "D2". Portanto, as CDRs do primeiro domínio de ligação a antígeno podem ser chamadas, no presente documento, de D1-HCDR1, D1-HCDR2 e D1-HCDR3; e as CDRs do segundo domínio de ligação a antígeno podem ser chamadas, no presente documento, D2-HCDR1, D2-HCDR2 e D2-HCDR3.

[0085] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende: (a) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1,

HCDR2 e HCDR3) contidas dentro de uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; e (b) três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em uma região variável de cadeia leve (LCVR) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende uma HCDR1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, uma HCDR2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 e uma HCDR3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 72. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende uma LCDR1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, uma LCDR2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 e uma LCDR3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0086] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende: (a) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas dentro de uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 ou SEQ ID NO: 98; e (b) três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em uma região variável de cadeia leve (LCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende: (a) uma HCDR1

que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 ou SEQ ID NO: 100; (b) uma HCDR2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 94 ou SEQ ID NO: 102; e (c) uma HCDR3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 ou SEQ ID NO: 104. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende uma LCDR1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, uma LCDR2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 e uma LCDR3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende: (a) domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 94, 96; e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; ou (b) domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 100, 102, 104; e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende: (a) uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90 e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82; ou (b) uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0087] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 68, 70, 72, e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de

aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende os domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 92, 94, 96 e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo o aminoácido sequências de SEQ ID NOs: 84, 86, 88. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0088] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende HCDR1, HCDR2, domínios HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 68, 70, 72, e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende os domínios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 100, 102, 104 e domínios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo o aminoácido sequências de SEQ ID NOs: 84, 86, 88. Em alguns casos, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende uma

HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82.

[0089] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compreende: (a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao BCMA humano e compreende as CDRs de uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 122 e 124, e as CDRs de uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 82, 123 e 125; e (b) um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao CD3 humano. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende as CDRs de um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 e 124/82. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende domínios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, selecionados a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64, 68-70-72-76-78-80, 4-6-8-84-86-88, 20-22-24-84-86-88, 36-38-40-84-86-88, 52-54-56-84-86-88 e 68-70-72-84-86-88. Em alguns casos, o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 e 124/82. Em alguns casos, o segundo domínio de ligação a antígeno compreende as CDRs de um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID

NOs: 90/82 e 98/82.

[0090] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compete pela ligação a BCMA, ou se liga ao mesmo epítopo em BCMA como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende um par HCVR/LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 66/82 e um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende um par HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 90/82 ou SEQ ID NOs: 98/82.

[0091] Em certas modalidades exemplificativas, a molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado compete pela ligação ao CD3 humano ou se liga ao mesmo epítopo no CD3 humano como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende um par HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 66/82 e um segundo domínio de ligação a antígeno compreendendo um par HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 90/82 ou SEQ ID NOs: 98/82.

[0092] As moléculas de ligação a antígeno biespecíficas discutidas acima ou aqui podem ser anticorpos biespecíficos. Em alguns casos, o anticorpo biespecífico compreende uma região constante de cadeia pesada de IgG humana. Em alguns casos, a região constante da cadeia pesada de IgG humana é isotipo IgG1. Em alguns casos, a região constante da cadeia pesada de IgG humana é isotipo IgG4. Em várias modalidades, o anticorpo biespecífico compreende uma dobradiça quimérica que reduz a ligação do receptor Fcɣ em relação a uma dobradiça de tipo selvagem do mesmo isotipo.

[0093] O primeiro domínio de ligação a antígeno e o segundo domínio de ligação a antígeno podem ser direta ou indiretamente

conectados um ao outro para formar uma molécula de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção. Alternativamente, o primeiro domínio de ligação a antígeno e o segundo domínio de ligação a antígeno podem, cada um, ser conectados a um domínio de multimerização separado. A associação de um domínio de multimerização com outro domínio de multimerização facilita a associação entre os dois domínios de ligação a antígeno, formando assim uma molécula de ligação a antígeno biespecífico. Como usado aqui, um "domínio de multimerização" é qualquer macromolécula, proteína, polipeptídeo, peptídeo ou aminoácido que tem a capacidade de se associar a um segundo domínio de multimerização da estrutura ou constituição igual ou semelhante. Por exemplo, um domínio de multimerização pode ser um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H3 de imunoglobulina. Um exemplo não limitante de um componente de multimerização é uma porção de Fc de uma imunoglobulina (que compreende um domínio de C_H2-C_H3), por exemplo, um domínio de Fc de uma IgG selecionada a partir dos isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, assim como qualquer alótipo dentro de cada grupo de isotipo.

[0094] As moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção irão compreender tipicamente dois domínios de multimerização, por exemplo, dois domínios de Fc que são cada parte individualmente de uma cadeia pesada de anticorpo separado. O primeiro e o segundo domínios de multimerização podem ser do mesmo isotipo de IgG como, por exemplo, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Alternativamente, o primeiro e o segundo domínios de multimerização podem ser de isotipos de IgG diferentes como, por exemplo, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, etc.

[0095] Em certas modalidades, o domínio de multimerização é um fragmento de Fc ou uma sequência de aminoácidos de 1 a cerca de 200 aminoácidos em comprimento contendo pelo menos um resíduo de

cisteína. Em outras modalidades, o domínio de multimerização é um resíduo de cisteína ou um peptídeo contendo cisteína curta. Outros domínios de multimerização incluem peptídeos ou polipeptídeos que compreendem ou consistem em um zíper de leucina, um motivo de hélice-laço ou a motivo de bobina bobinada.

[0096] Qualquer formato ou tecnologia de anticorpo biespecífico pode ser usado para produzir as moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo que tem um primeiro antígeno especificidade de ligação pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, como outro anticorpo ou fragmento de anticorpo que tem uma segunda especificidade de ligação a antígeno para produzir uma molécula de ligação a antígeno biespecífico. Os formatos biespecíficos exemplificativos específicos que podem ser usados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, formatos biespecíficos de diacorpo ou à base de scFv, IgG-scFv fusions, Ig de domínio variável duplo (DVD), Quadroma, empacotamentos tipo *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com empacotamentos tipo *knobs-into-holes*, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED) corpo, zíper de leucina, Duocorpo, IgG1/IgG2, Fab de atuação dupla (DAF)-IgG e formatos biespecíficos de Mab^2 (consultar, por exemplo, Klein *et al*. 2012, mAbs 4:6, 1 a 11, e referências citadas no presente documento, para uma revisão dos formatos supracitados).

[0097] No contexto de moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção, os domínios de multimerização, por exemplo, domínios de Fc, pode compreender uma ou mais alterações de aminoácido (por exemplo, inserções, deleções ou substituições) em comparação com a versão de ocorrência natural de tipo selvagem do

domínio de Fc. Por exemplo, a invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecífico que compreendem uma ou mais modificações no domínio de Fc que resulta em um domínio de Fc modificado que tem uma interação de ligação modificada (por exemplo, intensificada ou reduzida) entre Fc e FcRn. Em uma modalidade, a molécula de ligação a antígeno biespecífico compreende uma modificação em uma região C_H2 ou C_H3, em que a modificação aumenta a afinidade do domínio Fc para FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossomo onde o pH varia de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Exemplos não limitativos de tais modificações do Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T), e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, H/F ou Y); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F), e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende a modificação de 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação de 428L, 259I (por exemplo, V259I), e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação de 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação de 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação de 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P).

[0098] A presente invenção também inclui moléculas de ligação a antígeno biespecífico que compreendem um primeiro domínio de C_H3 e um segundo domínio de C_H3 de Ig, em que o primeiro e o segundo domínios de C_H3 de Ig diferem um do outro em pelo menos um aminoácido e em que pelo menos uma diferença de aminoácido reduz a ligação do anticorpo biespecífico à Proteína A em comparação com

um anticorpo biespecífico desprovido da diferença de aminoácido. Em uma modalidade, o primeiro domínio de C_H3 de Ig se liga à Proteína A e o segundo domínio de C_H3 de Ig contém uma mutação que reduz ou abole a ligação de Proteína A como uma modificação de H95R (por numeração de éxon de IMGT; H435R por numeração de EU). O segundo C_H3 pode compreender adicionalmente uma modificação Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Ver, por exemplo, Patente nº US 8.586.713. As modificações adicionais que podem ser encontrados dentro do segundo C_H3 incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M e V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG1; N44S, K52N e V82I (IMGT; N384S, K392N e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG4.

[0099] Em certas modalidades, o domínio de Fc pode ser quimérico, combinando sequências Fc derivadas de mais de um isotipo de imunoglobulina. Por exemplo, um domínio de Fc quimérico pode compreender parte ou a totalidade de uma sequência de C_H2 derivada de uma região de C_H2 de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, e parte ou a totalidade de uma sequência de C_H3 derivada de uma IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. Um domínio Fc quimérico também pode conter uma região de dobradiça quimérica. Por exemplo, uma dobradiça quimérica pode compreender uma sequência de "dobradiça superior", derivada de uma região de dobradiça de IgG1 humano, um IgG2 humano ou um IgG4 humano, combinada com uma sequência de "dobradiça inferior", derivada de uma região de dobradiça de IgG1 humano, um IgG2 humano ou um IgG4 humano. Um exemplo particular de um domínio Fc quimérico que pode ser incluído em qualquer uma das moléculas de ligação a antígeno aqui estabelecidas compreende, de N a C-terminal: [IgG4 C_H1] - [dobradiça superior IgG4]

- [dobradiça inferior IgG2] - [IgG4 CH2] - [IgG4 CH3]. Outro exemplo de um domínio Fc quimérico que pode ser incluído em qualquer uma das moléculas de ligação a antígeno aqui estabelecidas compreende, do terminal N ao C: [IgG1 C_H1] - [dobradiça superior IgG1] - [dobradiça inferior IgG2] - [IgG4 CH2] - [IgG1 CH3]. Esses e outros exemplos de domínios Fc quiméricos que podem ser incluídos em qualquer uma das moléculas de ligação a antígeno da presente invenção são descritos na Publicação US 2014/0243504, publicada em 28 de agosto de 2014, que é aqui incorporada em sua totalidade. Os domínios de Fc quiméricos que têm essas disposições estruturais gerais, e variantes das mesmas, podem ter ligação de receptor de Fc alterada, que, por sua vez, afeta a função efetora de Fc.

VARIANTES DE SEQUÊNCIA

[00100] Os anticorpos e moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos nas regiões de arcabouço e/ou CDR dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve em comparação com as sequências de linhagem germinativa correspondentes a partir das quais os domínios de ligação a antígeno individuais foram derivados. Tais mutações podem ser prontamente apuradas comparando-se as sequências de aminoácidos divulgadas no presente documento com sequências de linhagem germinativa disponíveis a partir de, por exemplo, bancos de dados públicos de sequência de anticorpo. As moléculas de ligação a antígeno da presente invenção podem compreender domínios de ligação a antígeno que são derivados de qualquer uma das sequências de aminoácidos exemplificativas divulgadas neste documento, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões estruturais e/ou CDR são mutadas para o resíduo (ou resíduos) correspondente da sequência da linhagem germinativa a partir da qual o anticorpo foi derivado, ou ao resíduo (ou

resíduos) correspondente de outra sequência da linhagem germinativa humana, ou a uma substituição conservativa de aminoácidos do resíduo (ou resíduos) da linhagem germinativa correspondente (tais alterações de sequência são referidas no presente documento coletivamente como "mutações da linhagem germinativa"). Uma pessoa versada na técnica, começando com as sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e leve divulgadas no presente documento, pode produzir facilmente inúmeros anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que compreendem uma ou mais mutações de linhagem germinativa individual ou suas combinações dos mesmos. Em determinadas modalidades, todos os resíduos de arcabouços e/ou de CDR dentro dos domínios V_H e/ou V_L sofrem mutação de volta para os resíduos constatados na sequência original de linhagens germinativas da qual o domínio de ligação a antígeno foi derivado. Em outras modalidades, apenas determinados resíduos sofrem mutação de volta para a sequência original de linhagens germinativas, por exemplo, apenas os resíduos que sofreram mutação constatados nos primeiros 8 aminoácidos do FR1 ou nos últimos 8 aminoácidos do FR4, ou apenas os resíduos que sofreram mutação constatados no CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais dos resíduos de arcabouço e/ou de CDR sofrem mutação para o resíduo correspondente (ou resíduos correspondentes) de uma sequência diferentes de linhagens germinativas (isto é, uma sequência de linhagens germinativas que é diferente da sequência de linhagens germinativas da qual o domínio de ligação a antígeno derivou originalmente). Ademais, os domínios de ligação a antígeno podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações de linhagem germinal dentro das regiões de arcabouço e/ou CDR, por exemplo, em que certos resíduos individuais são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagem germinativa particular enquanto certos outros resíduos que diferem da

sequência de linhagem germinativa original são mantidos ou são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagem germinativa diferente. Uma vez obtidos, os domínios de ligação a antígeno que contêm uma ou mais mutações germinativas podem ser facilmente testados para uma ou mais propriedades desejadas, tais como especificidade de ligação melhorada, afinidade de ligação aumentada, propriedades biológicas agonísticas ou antagonistas melhoradas ou aumentadas (conforme o caso), imunogenicidade reduzida, etc. Moléculas de ligação a antígeno biespecíficas compreendendo um ou mais domínios de ligação a antígeno obtidos desta maneira geral estão incluídas na presente invenção.

LIGAÇÃO DEPENDENTE DE PH

[00101] A presente invenção inclui anticorpos anti-BCMA e moléculas de ligação a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3, com características de ligação dependentes do pH. Por exemplo, um anticorpo anti-BCMA da presente invenção pode exibir ligação reduzida a BCMA em pH ácido em comparação com o pH neutro. Alternativamente, os anticorpos anti-BCMA da invenção podem exibir ligação intensificada a BCMA em pH ácido em comparação com o pH neutro. A expressão "pH ácido" inclui valores de pH menores do que cerca de 6,2, por exemplo, cerca de 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 ou menos. Tal como utilizado no presente documento, a expressão "pH neutro" significa um pH de cerca de 7,0 a cerca de 7,4. A expressão "pH neutro" inclui valores de pH de cerca de 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 e 7,4.

[00102] Em certos casos, "ligação reduzida em pH ácido em comparação com o pH neutro" é expressado em termos de uma razão do valor de K_D da ligação de anticorpo ao seu antígeno em pH ácido para o valor de K_D da ligação de anticorpo ao seu antígeno em pH neutro

(ou vice-versa). Por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo pode ser considerado como exibindo "ligação reduzida a BCMA em pH ácido em comparação com pH neutro" para os fins da presente invenção se o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo exibir uma razão K_D ácida/neutra de cerca de 3,0 ou superior. Em certas modalidades exemplificativas, a razão de K_D ácida/neutra para um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno da presente invenção pode ser cerca de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 ou maior.

[00103] Os anticorpos com características de ligação dependente de pH podem ser obtidos, por exemplo, examinando-se uma população de anticorpos para ligação reduzida (ou intensificada) a um antígeno particular em pH ácido em comparação com o pH neutro. Adicionalmente, as modificações do domínio de ligação a antígeno no nível de aminoácido podem render anticorpos com características dependentes de pH. Por exemplo, substituindo um ou mais aminoácidos de um domínio de ligação a antígeno (por exemplo, dentro de uma CDR) por um resíduo de histidina, um anticorpo com ligação a antígeno reduzida em pH ácido em relação ao pH neutro pode ser obtido.

ANTICORPOS QUE COMPREENDEM VARIANTES DE FC

[00104] De acordo com certas modalidades da presente invenção, anticorpos anti-BCMA e moléculas de ligação a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-BCMA são fornecidos que compreendem um domínio de Fc que compreende uma ou mais mutações que intensificam ou diminuem a ligação de anticorpo ao receptor de FcRn, por exemplo, em pH ácido em comparação com o pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos que compreendem uma mutação na região de C_H2 ou a C_H3 do domínio de Fc, em que a mutação (ou mutações) aumenta a afinidade do domínio de Fc ao FcRn em um ambiente ácido

(por exemplo, em um endossomo em que as faixas de pH de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento na meia-vida sérica do anticorpo quando administradas a um animal. Exemplos não limitativos de tais modificações do Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T), e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, H/F ou Y); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F), e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende a modificação de 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação de 428L, 259I (por exemplo, V259I), e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação de 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação de 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação de 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P).

[00105] Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-BCMA, e moléculas de ligação a antígeno biespecífico anti-CD3/anti-BCMA, que compreendem um domínio de Fc que compreende um ou mais pares ou grupos de mutações selecionadas a partir do grupo que consiste em: 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Todas as combinações possíveis das mutações de domínio de Fc supracitadas, e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpo divulgados no presente documento, são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS ANTICORPOS E

MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO BIESPECÍFICO

[00106] A presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam a BCMA humano com alta afinidade (por exemplo, valores de K_D nanomolares e subnanomolares).

[00107] De acordo com certas modalidades, a presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de anticorpos que se ligam a BCMA humano (por exemplo, em 25°C) com uma K_D menor do que cerca de 5 nM como medido por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno da presente invenção ligam BCMA com um K_D inferior a cerca de 20 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 8 nM, inferior a cerca de 7 nM, inferior a cerca de 6 nM, menos do que cerca de 5 nM, menos do que cerca de 4 nM, menos do que cerca de 3 nM, menos do que cerca de 2 nM, menos do que cerca de 1 nM, menos do que cerca de 800 pM, menos do que cerca de 700 pM, menos do que cerca de 500 pM, menos do que cerca de 400 pM, menos do que cerca de 300 pM, menos do que cerca de 200 pM, menos do que cerca de 100 pM, menos do que cerca de 50 pM, ou menos do que cerca de 25 pM conforme medido pela ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, usando um formato de ensaio conforme definido no Exemplo 4 aqui, ou um ensaio substancialmente semelhante. A presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecífico (por exemplo, anticorpos biespecíficos que se ligam a BCMA humano com um K_D menor do que cerca de 25 pM, e que liga BCMA de macaco com um K_D menor do que 170 pM, como medido por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento ou um ensaio substancialmente similar.

[00108] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos

de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam a BCMA com uma meia vida dissociativa (t½) maior do que cerca de 10 minutos ou maior do que cerca de 125 minutos, como medido por ressonância plasmônica de superfície a 25°C, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento, ou um ensaio substancialmente similar. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno da presente invenção se ligam a BCMA com uma t½ maior do que cerca de 3 minutos, maior do que cerca de 4 minutos, maior do que cerca de 10 minutos, maior do que cerca de 20 minutos, maior do que cerca de 30 minutos, maior do que cerca de 40 minutos, maior do que cerca de 50 minutos, maior do que cerca de 60 minutos, maior do que cerca de 70 minutos, maior do que cerca de 80 minutos, maior do que cerca de 90 minutos, maior do que cerca de 100 minutos, maior do que cerca de 110 minutos ou maior do que cerca de 120 minutos, como medido por ressonância plasmônica de superfície a 25 °C, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento ou um ensaio substancialmente similar. A presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecífico (por exemplo, anticorpos biespecíficos que se ligam a BCMA com uma maior do que cerca de 10 minutos como medido por ressonância plasmônica de superfície a 25°C, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento, ou um ensaio substancialmente similar.

[00109] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam especificamente às linhagens celulares humanas que expressam BCMA endógeno (por exemplo, NCI-H929, MOLP-8 ou OMP-2), como determinado por um ensaio de ligação a FACS como apresentado no Exemplo 6 ou um ensaio substancialmente similar.

[00110] A presente invenção também inclui moléculas de ligação a

antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 que exibem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em: (a) inibir o crescimento do tumor em camundongos imunocomprometidos com xenoenxertos de mieloma múltiplo humano; (b) suprimir o crescimento do tumor de tumores estabelecidos em camundongos imunocomprometidos com xenoenxertos de mieloma múltiplo humano (ver, por exemplo, Exemplos 10 a 15), e (c) suprimir o crescimento do tumor de melanoma singênico e células de carcinoma do cólon geneticamente modificadas para expressar BCMA humano em camundongos imunocompetentes expressando CD3 humano.

[00111] A presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam ao CD3 humano com alta afinidade. A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam ao CD3 humano com afinidade média ou baixa, dependendo do contexto terapêutico e propriedades de alvejamento particulares que são desejadas. Em alguns casos, a afinidade baixa inclui anticorpos que se ligam ao CD3 com uma K_D ou EC_{50} (por exemplo, como medido em um ensaio de ressonância plasmônica de superfície) maior do que 300 nM, maior do que 500 nM ou maior do que 1 µM. A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam ao CD3 humano sem afinidade mensurável. Por exemplo, no contexto de uma molécula de ligação a antígeno biespecífico, em que um braço se liga ao CD3 e outro braço se liga a um antígeno-alvo (por exemplo, BCMA), pode ser desejável que o braço de ligação a antígeno-alvo se ligue ao antígeno-alvo com alta afinidade enquanto o braço anti-CD3 se liga ao CD3 apenas com afinidade moderada ou afinidade baixa ou sem afinidade. Dessa maneira, o alvejamento preferencial da molécula de ligação a antígeno a células que expressam o antígeno-alvo pode ser alcançado enquanto se evita a ligação ao CD3 geral/não

alvejado e os efeitos colaterais adversos consequentes associados à mesma.

[00112] A presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) que são capazes de se ligarem simultaneamente ao CD3 humano e um BCMA humano. O braço de ligação que interage com células que expressam o CD3 pode ter uma ligação fraca a não detectável como medido em um ensaio de ligação *in vitro* adequado. A extensão à qual uma molécula de ligação a antígeno biespecífico se liga às células que expressam CD3 e/ou BCMA pode ser avaliada por classificação de célula ativada por fluorescência (FACS), como ilustrado nos Exemplos 5 e 6 no presente documento.

[00113] Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno e anticorpos biespecíficos dos mesmos que se ligam especificamente às linhagens de célula T humana que expressam CD3, porém, não expressam BCMA (por exemplo, Jurkat) e/ou células que expressam BCMA.

[00114] A presente invenção inclui anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno e anticorpos biespecíficos dos mesmos que se ligam ao CD3 humano com afinidade fraca (isto é, baixa) ou até mesmo afinidade não detectável.

[00115] A presente invenção inclui anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno e anticorpos biespecíficos dos mesmos que se ligam ao CD3 de macaco (isto é, cinomolgo) CD3 com afinidade fraca (isto é, baixa) ou até mesmo sem afinidade detectável.

[00116] A presente invenção inclui anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno e anticorpos biespecíficos dos mesmos que se ligam ao CD3 humano e induzem a ativação de célula T.

[00117] A presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 que são capazes de esgotar ou

reduzir as células de tumor que expressam antígeno em um indivíduo (consultar, por exemplo, Exemplos 8 a 16, ou um ensaio substancialmente similar). Por exemplo, de acordo com certas modalidades, as moléculas de ligação a antígeno biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 são fornecidas, em que uma única administração ou múltiplas administrações de 0,04 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 4 mg/kg da molécula de ligação a antígeno biespecífico a um indivíduo causa uma redução no número de células que expressam BCMA no indivíduo (por exemplo, crescimento de tumor no indivíduo é suprimido ou inibido).

MAPEAMENTO DE EPÍTOPO E TECNOLOGIAS RELACIONADAS

[00118] O epítopo em CD3 e/ou BCMA ao qual as moléculas de ligação a antígeno da presente invenção se ligam pode consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos de uma proteína de CD3 ou BCMA. Alternativamente, o epítopo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos) de CD3 ou BCMA. Os anticorpos da invenção podem interagir com aminoácidos contidos dentro de uma única cadeia de CD3 (por exemplo, CD3-épsilon, CD3-delta ou CD3-gama), ou podem interagir com aminoácidos em duas ou mais cadeias de CD3 diferentes. O termo "epítopo" como usado no presente documento, se refere a um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação de antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um único antígeno pode ter mais de um epítopo. Desse modo, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas de um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. Os epítopos podem ser conformacionais ou lineares. Um epítopo conformacional é produzido por aminoácidos justapostos espacialmente de diferentes segmentos da cadeia polipeptídica linear. Um epítopo linear é aquele produzido por resíduos de aminoácidos adjacentes em

uma cadeia polipeptídica. Em certas circunstâncias, um epítopo pode incluir porções químicas de sacarídeos, grupos fosforila ou grupos sulfonila no antígeno.

[00119] Várias técnicas conhecidas por pessoas versadas na técnica podem ser usadas para determinar se um domínio de ligação a antígeno de um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos" dentro de um polipeptídeo ou proteína. As técnicas exemplificativas incluem, por exemplo, ensaio de bloqueio transversal de rotina como aquele descrito em Antibodies, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análise mutacional de varredura de alanina, análise de manchamentos de peptídeo (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443 a 463) e análise de clivagem de peptídeo. Adicionalmente, podem ser empregados métodos, tais como excisão de epítopos, extração de epítopo e modificação química de antígenos (Tomer, 2000, Protein Science 9:487 a 496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um domínio de ligação a antígeno de um anticorpo interage é troca de hidrogênio/deutério detectado por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de troca de hidrogênio/deutério envolve a identificar com deutério a proteína de interesse, seguido pela ligação do anticorpo à proteína marcada com deutério. Em seguida, o complexo proteína/anticorpo é transferido para água para permitir que a troca de hidrogênio-deutério ocorra em todos os resíduos, exceto para os resíduos protegidos pelo anticorpo (que permanecem marcados com deutério). Após a dissociação do anticorpo, a proteína-alvo é submetida à análise de clivagem de protease e espectrometria de massa, revelando, assim, os resíduos identificados com deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais o anticorpo interage. Consultar, por exemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2): 252 a 259; Engen e Smith (2001) *Anal. Chem. 73*:256A a 265A.

A cristalografia de raios X do complexo de antígeno/anticorpo também pode ser usada para os propósitos de mapeamento de epítopo.

[00120] A presente invenção inclui adicionalmente anticorpos anti-BCMA que se ligam ao mesmo epítopo que qualquer um dos anticorpos exemplificativos específicos descritos no presente documento (por exemplo, anticorpos que compreendem qualquer uma das sequências de aminoácidos como apresentado na Tabela 1 no presente documento). De modo similar, a presente invenção também inclui anticorpos anti-BCMA que competem pela ligação a BCMA com qualquer um dentre os anticorpos exemplificativos específicos descritos no presente documento (por exemplo, anticorpos que compreendem qualquer uma das sequências de aminoácidos como apresentado na Tabela 1 no presente documento).

[00121] A presente invenção também inclui moléculas de ligação a antígeno biespecíficos compreendendo um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente a CD3 humano e/ou CD3 de cinomolgo com baixa ou nenhuma afinidade de ligação detectável e um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente a BCMA humano, em que o segundo domínio de ligação a antígeno se liga ao mesmo epítopo em CD3 que qualquer um dos domínios de ligação a antígeno específicos de CD3 exemplificativos específicos aqui descritos e/ou em que o segundo domínio de ligação a antígeno se liga ao mesmo epítopo em BCMA como qualquer um dos domínios de ligação a antígeno específicos para BCMA exemplificativos específicos aqui descritos.

[00122] Da mesma forma, a presente invenção também inclui moléculas de ligação a antígeno biespecífico compreendendo um primeiro domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao BCMA humano e um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao CD3 humano, em que o primeiro domínio de ligação

a antígeno compete pela ligação ao BCMA com qualquer um dos domínios de ligação a antígeno específicos de BCMA exemplificativos específicos descritos neste documento e/ou em que o segundo domínio de ligação a antígeno compete pela ligação a CD3 com qualquer um dos domínios de ligação a antígeno específicos de CD3 exemplificativos específicos descritos neste documento.

[00123] É facilmente possível determinar se uma molécula particular de ligação a antígeno (por exemplo, anticorpo) ou domínio de ligação a antígeno da mesma se liga ao mesmo epítopo que, ou compete pela ligação com, uma molécula de ligação a antígeno de referência da presente invenção com o uso de métodos de rotina conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epítopo no BCMA (ou CD3) que uma molécula de ligação a antígeno biespecífico de referência da presente invenção, a molécula biespecífica de referência primeiro pode se ligar a uma proteína de BCMA (ou proteína de CD3). Em seguida, a habilidade de um anticorpo de teste para se ligar à molécula de BCMA (ou CD3) é avaliada. Se o anticorpo de teste puder se ligar a BCMA (ou CD3) após a ligação de saturação com a molécula de ligação a antígeno biespecífico de referência, pode ser concluído que o anticorpo de teste se liga a um epítopo diferente de BCMA (ou CD3) do que a molécula de ligação a antígeno biespecífico de referência. Por outro lado, se o anticorpo de teste não puder se ligar à molécula de BCMA (ou CD3) após a ligação de saturação com a molécula de ligação a antígeno biespecífico de referência, então, o anticorpo de teste pode se ligar ao mesmo epítopo de BCMA (ou CD3) que o epítopo ligado pela molécula de ligação a antígeno biespecífico de referência da invenção. A experimentação de rotina adicional (por exemplo, as análises de mutação e ligação de peptídeo) pode, então, ser executada para confirmar se a falta observada de ligação do anticorpo de teste é, de fato, devido à ligação

ao mesmo epítopo que a molécula de ligação a antígeno biespecífico de referência ou se o bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável pela falta de ligação observada. Os experimentos desse tipo podem ser realizados com o uso de ELISA, RIA, Biacore, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio de ligação a anticorpo quantitativo ou qualitativo na técnica. De acordo com certas modalidades da presente invenção, duas proteínas de ligação a antígeno se ligam ao mesmo (ou se sobrepõe ao) epítopo se, por exemplo, um excesso de 1, 5, 10, 20 ou 100 vezes de uma proteína de ligação a antígeno inibe a ligação do outro em pelo menos 50%, mas, preferencialmente, 75%, 90% ou até mesmo 99%, conforme medido em um teste de ligação competitivo (consultar, por exemplo, Junghans *et al*., Cancer Res. 1990 50:1.495 a 1.502). Alternativamente, duas proteínas de ligação a antígeno são consideradas como ligando-se ao mesmo epítopo se essencialmente todas as mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de uma proteína de ligação a antígeno reduzem ou eliminam a ligação da outra. Considera-se que duas proteínas de ligação a antígeno tenham "epítopos sobrepostos" se apenas um subconjunto das mutações de aminoácido que reduz ou elimina a ligação de uma proteína de ligação a antígeno reduz ou elimina a ligação da outra.

[00124] Para determinar se um anticorpo ou domínio de ligação a antígeno do mesmo compete pela ligação com uma molécula de ligação a antígeno de referência, a metodologia de ligação acima descrita é realizada em duas orientações: em uma primeira orientação, a molécula de ligação a antígeno de referência pode se ligar a uma proteína BCMA (ou proteína CD3) sob condições de saturação seguida pela avaliação da ligação do anticorpo de teste à molécula BCMA (ou CD3). Em uma segunda orientação, o anticorpo de teste pode se ligar a uma molécula de BCMA (ou CD3) sob condições de saturação, seguido pela avaliação

da ligação da molécula de ligação a antígeno de referência à molécula de BCMA (ou CD3). Se, em ambas as orientações, apenas a primeira molécula de ligação a antígeno (saturante) é capaz de se ligar à molécula BCMA (ou CD3), então conclui-se que o anticorpo de teste e a molécula de ligação a antígeno de referência competem pela ligação a BCMA (ou CD3). Como será observado por uma pessoa de versado na técnica, um anticorpo que compete pela ligação com uma molécula de ligação a antígeno de referência por não se ligar necessariamente ao mesmo epítopo que o anticorpo de referência, porém, pode bloquear estericamente a ligação do anticorpo de referência através da ligação de um epítopo sobreposto ou adjacente.

PREPARAÇÃO DE DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO E CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS

[00125] Os domínios de ligação a antígeno específicos para antígenos particulares podem ser preparados por qualquer tecnologia geradora de anticorpo conhecida na técnica. Uma vez obtidos, dois domínios de ligação a antígeno diferentes, específicos para dois antígenos diferentes (por exemplo, CD3 e BCMA), podem ser adequadamente arranjados um em relação ao outro para produzir uma molécula de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção usando métodos de rotina. (Uma discussão de formatos de anticorpo biespecífico exemplificativos que podem ser usados para construir as moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção é fornecida em outra parte no presente documento). Em certas modalidades, um ou mais dos componentes individuais (por exemplo, cadeias pesadas e leves) das moléculas de ligação a antígeno multiespecíficas da invenção são derivados de anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos. Os métodos para a preparação de tais anticorpos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, uma ou mais dentre as cadeias pesadas e/ou leves das moléculas de ligação

a antígeno biespecífico da presente invenção podem ser preparadas com o uso de tecnologia de VELOCIMMUNE™. Usando a tecnologia VELOCIMMUNE™ (ou qualquer outra tecnologia de geração de anticorpo humano), anticorpos quiméricos de alta afinidade para um antígeno particular (por exemplo, CD3 ou BCMA) são inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Os anticorpos são caracterizados e selecionados por características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, epítopo, etc. As regiões constantes de camundongo são substituídas por uma região constante humana desejada para gerar cadeias pesadas e/ou leves totalmente humanas que podem ser incorporadas nas moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção.

[00126] Os animais geneticamente modificados pode ser usado para produzir moléculas de ligação a antígeno biespecífico humano. Por exemplo, um camundongo geneticamente modificado pode ser usado, o qual é incapaz de redispor e expressar uma sequência variável de cadeia leve de imunoglobulina de camundongo endógena, em que o camundongo expressa apenas um ou dois domínios variáveis de cadeia leve humana codificados por sequências de imunoglobulina humanas operacionalmente ligadas ao gene constante tipo kapa de camundongo no locus kapa de camundongo endógeno. Tais camundongos geneticamente modificados podem ser usados para produzir moléculas de ligação a antígeno biespecífico totalmente humanas que compreendem duas cadeias pesadas diferentes que se associam a uma cadeia leve idêntica que compreende um domínio variável derivado de um dentre dois segmentos de gene diferentes de região variável de cadeia leve humana. (Consultar, por exemplo, o documento nº US 2011/0195454). Totalmente humano se refere a um anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno ou domínio de imunoglobulina do mesmo, que compreende uma sequência de aminoácidos codificada

por um DNA derivado a partir de uma sequência humana ao longo de todo o comprimento de cada polipeptídeo do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno ou domínio de imunoglobulina do mesmo. Em alguns casos, a sequência totalmente humana é derivada de uma proteína endógena a um humano. Em outros casos, a proteína totalmente humana ou a sequência de proteínas compreende uma sequência quimérica em que cada sequência componente é derivada da sequência humana. Embora não se atenha a nenhuma teoria, proteínas quiméricas ou sequência quiméricas são geralmente projetadas para minimizar a criação de epítopos imunogenéticos nas junções de sequências componentes, por exemplo, comparadas com quaisquer regiões ou domínios de imunoglobulina humana de tipo selvagem.

BIOEQUIVALENTES

[00127] A presente invenção abrange moléculas de ligação a antígeno com sequências de aminoácidos que variam daquelas das moléculas exemplificativas aqui divulgadas, mas que retêm a capacidade de se ligar a CD3 e/ou BCMA. Tais moléculas variantes podem compreender uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos quando comparadas com a sequência parental, porém, exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente àquela das moléculas de ligação a antígeno biespecífico descritas.

[00128] A presente invenção inclui moléculas de ligação a antígeno que são bioequivalentes a qualquer uma dentre as moléculas de ligação a antígeno exemplificativas apresentadas no presente documento. Duas proteínas de ligação a antígeno, ou anticorpos são considerados bioequivalentes se, por exemplo, forem equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e extensão de absorção não mostram uma diferença significativa quando administradas à mesma dose molar sob condições experimentais similares, tanto does únicas quanto múltiplas doses. Algumas proteínas de ligação a antígeno serão

consideradas equivalentes ou alternativas farmacêuticas se forem equivalentes na extensão de sua absorção, porém, não em sua taxa de absorção e, contudo, podem ser consideradas bioequivalentes visto que tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na identificação, não são essenciais para a obtenção de concentrações de fármaco para corpo eficazes, por exemplo, no uso crônico, e são consideradas medicamente insignificantes para o produto de fármaco particular estudado.

[00129] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se não houver diferenças clinicamente significativas em sua segurança, pureza e potência.

[00130] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se um paciente puder comutar uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma alteração clinicamente significativa na imunogenicidade ou eficácia reduzida, em comparação com a terapia continuada sem tal comutação.

[00131] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se ambas atuarem por um mecanismo ou mecanismos comuns de ação para a condição ou condições de uso, ao ponto em que tais mecanismos são conhecidos.

[00132] A bioequivalência pode ser demonstrada por métodos in vivo e in vitro. As medidas de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, em que a concentração do anticorpo ou seus metabólitos é medida no sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico como uma função de tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado a e é razoavelmente preditivo de dados de biodisponibilidade *in vivo* humanos; (c) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos em que o efeito farmacológico agudo adequado do anticorpo (ou seu alvo) é medido como uma função

de tempo; e (d) em um teste clínico vem controlado que estabelece segurança, eficácia ou biodisponibilidade ou bioequivalência de uma proteína de ligação a antígeno.

[00133] As variantes bioequivalentes das moléculas de ligação a antígeno biespecífico exemplificativas apresentadas no presente documento podem ser construídas, por exemplo, produzindo-se várias substituições de resíduos ou sequências ou deletando-se resíduos terminais ou internos ou sequências não necessárias para a atividade biológica. Por exemplo, os resíduos de cisteína não essenciais para atividade biológica podem ser deletados ou substituídos por outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes de dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas mediante a renaturação. Em outros contextos, proteínas de ligação a antígeno bioequivalentes podem incluir variantes das moléculas de ligação a antígeno biespecíficas exemplificativas aqui apresentadas, compreendendo mudanças de aminoácidos que modificam as características de glicosilação das moléculas, por exemplo, mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

SELETIVIDADE DE ESPÉCIES E REATIVIDADE CRUZADA DE ESPÉCIES

[00134] De acordo com certas modalidades da invenção, são fornecidas moléculas de ligação a antígeno que se ligam ao CD3 humano, porém, não ao CD3 de outras espécies. Também são fornecidas moléculas de ligação a antígeno que se ligam ao BCMA humano, mas não ao BCMA de outras espécies. A presente invenção também inclui moléculas de ligação a antígeno que se ligam ao CD3 humano e ao CD3 de uma ou mais espécies não humanas; e/ou moléculas de ligação a antígeno que se ligam ao BCMA humano e ao BCMA de uma ou mais espécies não humanas.

[00135] De acordo com certas modalidades exemplificativas da

invenção, moléculas de ligação a antígeno são fornecidas que se ligam a CD3 humano e/ou BCMA humano e podem se ligar ou não, conforme o caso, a um ou mais de camundongo, rato, porquinho-da-índia, hamster, gerbil, porco, gato, cachorro, coelho, cabra, ovelha, vaca, cavalo, camelo, cinomolgo, sagui, rhesus ou chimpanzé CD3 e/ou BCMA. Por exemplo, em modalidades exemplificativas são fornecidas compreendendo um primeiro domínio de ligação a antígeno que se liga a BCMA humano e BCMA de cinomolgo, e um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente a CD3 humano, ou moléculas de ligação a antígeno biespecíficas compreendendo um primeiro domínio de ligação a antígeno que se liga a BCMA humano e BCMA de cinomolgo, e um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao CD3 humano.

FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO TERAPÊUTICA

[00136] A presente invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem as moléculas de ligação a antígeno da presente invenção. As composições farmacêuticas da invenção são formuladas com veículos, excipientes e outros agentes que fornecem transferência, entrega, tolerância e similares aprimorados. Uma multiplicidade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido por todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geleias, ceras, óleos, lipídios, lipídios (catiônicos ou aniônicos) contendo vesículas (como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões óleo-em-água e água-em-óleo, emulsões carbowax (polietilenoglicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas contendo carbowax. Consultar também Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238 a 311.

[00137] A dose de molécula de ligação a antígeno administrada a um paciente pode variar dependendo da idade e do tamanho do paciente, da doença-alvo, afecções, via de administração e similares. A dose preferencial é tipicamente calculada de acordo com o peso corporal ou a área de superfície corporal. Quando uma molécula de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção é usada para fins terapêuticos em um paciente adulto, pode ser vantajoso administrar por via intravenosa a molécula de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção normalmente em uma dose única de cerca de 0,01 a cerca de 20 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente cerca de 0,02 a cerca de 7, cerca de 0,03 a cerca de 5, ou cerca de 0,05 a cerca de 3 mg/kg de peso corporal. Dependendo da gravidade da afecção, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustadas. As dosagens e horários eficazes para administrar uma molécula de ligação a antígeno biespecífico podem ser determinados empiricamente; por exemplo, o progresso do paciente pode ser monitorado por avaliação periódica e a dose ajustada em conformidade. Além disso, o escalonamento interespécies de dosagens pode ser realizado usando métodos bem conhecidos na técnica (por exemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res. 8*:1.351).

[00138] Vários sistemas de entrega são conhecidos e podem ser usados para administrar a composição farmacêutica da invenção, por exemplo, encapsulamento em lipossomos, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutantes, a endocitose mediada por receptor (consultar, por exemplo, Wu *et al*., 1987, J. Biol. Chem. 262:4.429 a 4.432). Os métodos de introdução incluem, mas sem limitações, vias intradérmicas, intramusculares, intraperitoneais, intravenosas, subcutâneas, intranasais, epidurais e orais. A composição pode ser administrada por qualquer via conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bolo,

por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e pode ser administrada juntamente com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local.

[00139] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser entregue de modo subcutâneo ou intravenoso com uma seringa ou agulha-padrão. Além disso, em relação à entrega subcutânea, um dispositivo de entrega por caneta prontamente tem aplicações na entrega de uma composição farmacêutica da presente invenção. Tal dispositivo de entrega por caneta pode ser reutilizável ou descartável. Um dispositivo de entrega por caneta reutilizável geralmente utiliza um cartucho substituível que contém uma composição farmacêutica. Uma vez que toda a composição farmacêutica dentro do cartucho tenha sido administrada, e o cartucho esteja vazio, o cartucho vazio pode ser facilmente descartado e substituído por um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de entrega por caneta pode ser reusado. Em um dispositivo de entrega por caneta descartável, não há cartucho substituível. Pelo contrário, o dispositivo de entrega por caneta descartável vem pré-carregado com a composição farmacêutica mantida em um reservatório dentro do dispositivo. Uma vez que o reservatório é esvaziado da composição farmacêutica, todo o dispositivo é descartado.

[00140] Inúmeros dispositivos de entrega de caneta e de autoinjetor reutilizáveis têm aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Os exemplos incluem, mas sem limitações, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suíça), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta HUMALOG™, caneta HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly e Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™

(Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ e OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemanha) para mencionar apenas alguns. Os exemplos de dispositivos de entrega por caneta descartáveis que têm aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, mas sem limitações, a caneta SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), o FLEXPEN™ (Novo Nordisk) e o KWIKPEN™ (Eli Lilly), o autoinjetor SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), o PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemanha), o EPIPEN (Dey, L.P.) e a caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), para mencionar apenas alguns.

[00141] Em certas situações, a composição farmacêutica pode ser entregue em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada (consultar Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Em outra modalidade, os materiais poliméricos podem ser usados; consultar, Medical Applications of Controlled Release, Langer e Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado próximo ao alvo da composição, exigindo, assim, apenas uma fração da dose sistêmica (consultar, por exemplo, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, páginas 115 a 138). Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer, 1990, Science 249:1527 a 1533.

[00142] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosas, subcutâneas, intracutâneas e intramusculares, infusões em gotas, etc. Essas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos publicamente conhecidos. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, dissolvendo-se, suspendendo-se ou emulsificando-se o

anticorpo ou seu sal descrito acima em um meio aquoso estéril ou um meio oleoso convencionalmente usado para injeções. Como o meio aquoso para injeções, há, por exemplo, solução salina fisiológica, uma solução isotônica que contém glucose e outros agentes auxiliares etc., que podem ser usados em combinação com um agente de solubilização apropriado, tal como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, propilenoglicol, polietilenoglicol), um tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) aduto de óleo de rícino hidrogenado)] etc. Como meio oleoso, são empregados, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de soja etc., que pode ser usado em combinação com um agente solubilizante tal como benzoato de benzila, álcool benzílico etc. A injeção assim preparada é, preferencialmente, preenchida em uma ampola apropriada.

[00143] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para uso oral ou parenteral descritas acima são preparadas em formas de dosagens em uma dose unitária adequada para ajustar uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagens em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios etc. A quantidade do anticorpo contido é geralmente de cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente na forma de injeção, é preferencial que o anticorpo esteja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para as outras formas de dosagens.

USOS TERAPÊUTICOS DAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO

[00144] A presente invenção inclui métodos que compreendem a administração a um indivíduo em necessidade de uma composição terapêutica compreendendo um anticorpo anti-BCMA ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, ou uma molécula de ligação a antígeno biespecíficoque se liga especificamente a CD3 e BCMA. A composição

terapêutica pode compreender qualquer um dentre os anticorpos ou moléculas de ligação a antígeno biespecífico como divulgado no presente documento e um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Tal como aqui utilizado, a expressão "um indivíduo em necessidade" significa um animal humano ou não humano que exibe um ou mais sintomas ou indícios de câncer (por exemplo, um indivíduo que expressa um tumor ou sofre de qualquer um dos cânceres mencionados aqui abaixo), ou que de outra forma se beneficiariam de uma inibição ou redução na atividade de BCMA ou de uma depleção de células BCMA+ (por exemplo, células de mieloma múltiplo).

[00145] Os anticorpos e moléculas de ligação a antígeno biespecífico da invenção (e composições terapêuticas que compreendem os mesmos) são úteis, entre outros, para tratar qualquer doença ou distúrbio em que o estímulo, ativação e/ou alvejamento de uma resposta imunológica será benéfico. Em particular, os anticorpos anti-BCMA ou as moléculas de ligação a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 da presente invenção podem ser usados para o tratamento, prevenção e/ou melhoria de qualquer doença ou distúrbio associado ou mediado pela expressão de BCMA ou atividade ou proliferação de células BCMA+. O mecanismo de ação pelo qual os métodos terapêuticos da invenção são alcançados incluem a morte das células que expressam BCMA na presença de células efetoras, por exemplo, por CDC, apoptose, ADCC, fagocitose ou por uma combinação de dois ou mais destes mecanismos. As células que expressam BCMA que podem ser inibidas ou mortas com o uso das moléculas de ligação a antígeno biespecífico da invenção incluem, por exemplo, células de mieloma múltiplo .

[00146] As moléculas de ligação a antígeno da presente invenção podem ser usadas para tratar uma doença ou distúrbio associado à expressão de BCMA, incluindo, por exemplo, um câncer incluindo

mieloma múltiplo ou outras células B ou cânceres de células plasmáticas, como macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B, linfoma não Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma de zona marginal, linfoma linfoplasmocitário e linfoma de Hodgkin. De acordo com certas modalidades da presente invenção, os anticorpos anti-BCMA ou anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 são úteis para o tratamento de um paciente que sofre de mieloma múltiplo. De acordo com outras modalidades relacionadas da invenção, os métodos são fornecidos compreendendo a administração de um anticorpo anti-BCMA ou uma molécula de ligação a antígeno biespecífica anti-BCMA x anti-CD3 conforme divulgado neste documento a um paciente que sofre de mieloma múltiplo. Métodos analíticos/diagnósticos conhecidos na técnica, tais como varredura de tumor, etc., podem ser usados para determinar se um paciente possui mieloma múltiplo ou outro câncer de linhagem de células B.

[00147] A presente invenção também inclui métodos para tratar câncer residual em um indivíduo. Como usado no presente documento, o termo "câncer residual" significa que a existência ou persistência de uma ou mais células cancerígenas em um indivíduo após o tratamento com uma terapia anticâncer.

[00148] De acordo com certos aspectos, a presente invenção fornece métodos para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão de BCMA (por exemplo, mieloma múltiplo) compreendendo a administração de um ou mais dos anti-BCMA ou moléculas de ligação a antígeno biespecíficos descritas em outro lugar neste documento a um indivíduo após o indivíduo ter sido determinado como tendo mieloma múltiplo. Por exemplo, a presente invenção inclui métodos para o tratamento de mieloma múltiplo compreendendo a administração de um anticorpo anti-BCMA ou uma molécula de ligação a antígeno

biespecífico anti-BCMA x anti-CD3 a um paciente 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 ano ou mais após o indivíduo ter recebido outra imunoterapia ou quimioterapia.

TERAPIAS E FORMULAÇÕES DE COMBINAÇÃO

[00149] A presente invenção fornece métodos que compreendem administrar uma composição farmacêutica que compreende qualquer um dentre os anticorpos exemplificativos e moléculas de ligação a antígeno biespecífico descritos no presente documento em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Os agentes terapêuticos adicionais exemplares que podem ser combinados ou administrados em combinação com uma molécula de ligação a antígeno da presente invenção incluem, por exemplo, um agente antitumoral (por exemplo, agentes quimioterápicos incluindo melfalano, vincristina (Oncovina), ciclofosfamida (Citoxano), etopósido (VP-16), doxorrubicina (Adriamicina), doxorrubicina lipossomal (Doxila), obendamustina (Treanda) ou qualquer outro conhecido por ser eficaz no tratamento de um tumor de células plasmáticas em um indivíduo.). Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende esteroides. Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende terapias direcionadas, incluindo talidomida, lenalidomida e bortezomibe, que são terapias aprovadas para tratar pacientes recém-diagnosticados. Lenalidomida, pomalidomida, bortezomibe, carfilzomibe, panobinostate, ixazomibe, elotuzumabe e daratumumabe são exemplos de um segundo agente terapêutico eficaz para o tratamento de mieloma recorrente. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é um regime que compreende radioterapia ou um transplante de células-tronco. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um agente imunomodulador. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um inibidor de

proteassoma, incluindo bortezomibe (Velcade), carfilzomibe (Kyprolis), ixazomibe (Ninlaro). Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um inibidor de histona desacetilase, como panobinostat (Farydak). Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um anticorpo monoclonal, um conjugado de fármaco de anticorpo, um conjugado de anticorpo biespecífico a um agente antitumoral, um inibidor de ponto de verificação ou combinações dos mesmos. Outros agentes que podem ser administrados de forma benéfica em combinação com as moléculas de ligação a antígeno da invenção incluem inibidores de citocinas, incluindo inibidores de citocinas de pequenas moléculas e anticorpos que se ligam a citocinas, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL- 4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 ou para seus respectivos receptores. As composições farmacêuticas da presente invenção (por exemplo, composições farmacêuticas compreendendo uma molécula de ligação a antígeno biespecífico anti-BCMA x anti-CD3 como divulgado aqui) também podem ser administradas como parte de um regime terapêutico compreendendo uma ou mais combinações terapêuticas selecionadas a partir de uma molécula monoclonal anticorpo diferente daqueles aqui descritos, que pode interagir com um antígeno diferente na superfície da célula plasmática, um anticorpo biespecífico, que tem um braço que se liga a um antígeno na superfície da célula tumoral e o outro braço se liga a um antígeno em uma célula T, um conjugado de anticorpo e fármaco, um anticorpo biespecífico conjugado com um agente antitumoral, um inibidor de ponto de verificação, por exemplo, um que tem como alvo PD-1 ou CTLA-4, ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, os inibidores de ponto de verificação podem ser selecionados a partir de inibidores PD-1, como pembrolizumabe (Keytruda), nivolumabe (Opdivo) ou cemiplimabe (REGN2810). Em certas modalidades, os inibidores de ponto de verificação podem ser

selecionados a partir de inibidores PD-L1, como atezolizumabe (Tecentriq), avelumabe (Bavencio) ou Durvalumabe (Imfinzi)). Em certas modalidades, os inibidores de ponto de verificação podem ser selecionados a partir de inibidores de CTLA-4, como ipilimumabe (Yervoy). Outras combinações que podem ser utilizadas em conjunto com um anticorpo da invenção são descritas acima.

[00150] A presente invenção também inclui combinações terapêuticas que compreendem qualquer uma dentre as moléculas de ligação a antígeno mencionadas no presente documento e um inibidor de um ou mais dentre VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR-α, PDGFR-β, FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplaquina, ou qualquer uma dentre as citocinas supracitadas, em que o inibidor é um aptâmero, uma molécula antissenso, uma ribozima, um siRNA, um pepticorpo, um nanocorpo ou um fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de Fab; fragmento de $F(ab')_2$; fragmento de Fd; fragmento de Fv; scFv; fragmento de dAb; ou outras moléculas geneticamente modificadas, como diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos e unidades de reconhecimento mínimo). As moléculas de ligação a antígeno da invenção também podem ser administradas e/ou coformuladas em combinação com antivirais, antibióticos, analgésicos, corticosteroides e/ou NSAIDs. As moléculas de ligação a antígeno da invenção também podem ser administradas como parte de um regime de tratamento que também inclui tratamento de radiação e/ou quimioterapia convencional.

[00151] O componente (ou componentes) terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado imediatamente antes de, simultaneamente com ou logo após a administração de uma molécula de ligação a antígeno da presente invenção; (para propósitos da presente divulgação, tais regimes de administração são considerados a

administração de uma molécula de ligação a antígeno "em combinação com" um componente terapeuticamente ativo adicional).

[00152] A presente invenção inclui composições farmacêuticas em que uma molécula de ligação a antígeno da presente invenção é coformulada com um ou mais dentre o componente (ou componentes) terapeuticamente ativo adicional como descrito em outra parte no presente documento.

REGIMES DE ADMINISTRAÇÃO

[00153] De acordo com certas modalidades da presente invenção, doses múltiplas de uma molécula de ligação a antígeno (por exemplo, um anticorpo anti-BCMA ou uma molécula de ligação a antígeno biespecífica que liga especificamente BCMA e CD3) podem ser administradas a um indivíduo ao longo de um curso de tempo definido. Os métodos de acordo com o presente aspecto da invenção compreendem administrar sequencialmente a um indivíduo múltiplas doses de uma molécula de ligação a antígeno da invenção. Tal como aqui utilizado, "administração sequencial" significa que cada dose de uma molécula de ligação a antígeno é administrada ao indivíduo em um ponto diferente no tempo, por exemplo, em dias diferentes separados por um intervalo predeterminado (por exemplo, horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui métodos que compreendem administrar sequencialmente ao paciente uma única dose inicial de uma molécula de ligação a antígeno, seguida por uma ou mais doses secundárias da molécula de ligação a antígeno, e opcionalmente seguido por uma ou mais doses terciárias da molécula de ligação a antígeno.

[00154] Os termos "dose inicial", "doses secundárias" e "doses terciárias", se referem à sequência temporal de administração da molécula de ligação a antígeno da invenção. Portanto, a "dose inicial" é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também

chamada de uma "dose de linha de base"); as "doses secundárias" são as doses que são administradas após a dose inicial; e as "doses terciárias" são as doses que são administradas após as doses secundárias. As doses inicial, secundária e terciária podem conter a mesma quantidade da molécula de ligação a antígeno, mas geralmente podem diferir umas das outras em termos de frequência de administração. Em certas modalidades, no entanto, a quantidade de uma molécula de ligação a antígeno contida nas doses inicial, secundária e/ou terciária varia uma da outra (por exemplo, ajustada para cima ou para baixo conforme apropriado) durante o curso do tratamento. Em certas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4 ou 5) doses são administradas no início do regime de tratamento como "doses de carregamento" seguidas por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente (por exemplo, "doses de manutenção").

[00155] Em uma modalidade exemplificativa da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada de 1 a 26 (por exemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ ou mais) semanas após a dose imediatamente anterior. A frase "a dose imediatamente anterior", como usada no presente documento, significa, em uma sequência de múltiplas administrações, a dose de molécula de ligação a antígeno que é administrada a um paciente antes da administração da dose imediatamente a seguir, em sequência sem doses de intervenção.

[00156] Os métodos de acordo com esse aspecto da invenção podem compreender a administração a um paciente de qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de uma molécula de ligação a antígeno (por exemplo, um anticorpo anti-BCMA ou uma

molécula de ligação a antígeno biespecífico que se liga especificamente ao BCMA e CD3). Por exemplo, em certas modalidades, apenas uma única dose secundária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais doses secundárias (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) são administradas ao paciente. Do mesmo modo, em determinadas modalidades, apenas uma única dose terciária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) doses terciárias são administradas ao paciente.

[00157] Em modalidades que envolvem múltiplas doses secundárias, cada dose secundária pode ser administrada com a mesma frequência que as outras doses secundárias. Por exemplo, cada dose secundária pode ser administrada ao paciente 1 a 2 semanas após a dose imediatamente anterior. Da mesma forma, em modalidades envolvendo múltiplas doses terciárias, cada dose terciária pode ser administrada na mesma frequência que as outras doses terciárias. Por exemplo, cada dose terciária pode ser administrada ao paciente 2 a 4 semanas após a dose imediatamente anterior. Alternativamente, a frequência com que as doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente pode variar ao longo do regime de tratamento. A frequência de administração também pode ser ajustada durante o curso do tratamento por um médico, dependendo das necessidades do paciente individual após o exame clínico.

USOS DE DIAGNÓSTICO DOS ANTICORPOS

[00158] Os anticorpos anti-BCMA da presente invenção também podem ser usados para detectar e/ou medir BCMA ou células que expressam BCMA em uma amostra, por exemplo, para fins de diagnóstico. Por exemplo, um anticorpo anti-BCMA, ou fragmento do mesmo, pode ser usado para diagnosticar uma condição ou doença caracterizada por expressão aberrante (por exemplo, superexpressão,

subexpressão, falta de expressão, etc.) de BCMA. Os ensaios de diagnóstico exemplificadores para BCMA podem compreender, por exemplo, o contato de uma amostra, obtida de um paciente, com um anticorpo anti-BCMA da invenção, em que o anticorpo anti-BCMA é marcado com um marcador detectável ou molécula repórter. Alternativamente, um anticorpo anti-BCMA não identificado pode ser usado em aplicações de diagnóstico em combinação com um anticorpo secundário que é, em si, identificado de modo detectável. A identificação detectável ou molécula-repórter pode ser um radioisótopo, como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S ou ^{125}I; uma porção química fluorescente ou quimioluminescente como isotiocianato de fluoresceína ou rodamina; ou uma enzima como alcalino fosfatase, beta-galactosidase, peroxidase de raiz forte ou luciferase. Outro exemplo de uso de diagnóstico dos anticorpos anti-BCMA da invenção inclui ^{89}Zr marcado, como ^{89}Zr desferrioxamina marcado, anticorpo para o propósito de identificação não invasiva e rastreamento de células tumorais em um indivíduo (por exemplo, imageamento de tomografia por emissão de pósitrons (PET)). (Consultar, por exemplo, Tavare, R. et al. Cancer Res. 2016 Jan 1;76(1):73 a 82; e Azad, BB. *et al.* Oncotarget. 15 de março de 2016; 7(11): 12.344 a 12.358). Ensaios exemplificadores específicos que podem ser usados para detectar ou medir BCMA em uma amostra incluem ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e classificação de células ativadas por fluorescência (FACS).

[00159] As amostras que podem ser utilizadas em ensaios de diagnóstico de BCMA de acordo com a presente invenção incluem qualquer tecido ou amostra de fluido obtida de um paciente que contenha quantidades detectáveis de proteína BCMA, ou fragmentos desta, em condições normais ou patológicas. Geralmente, os níveis de BCMA em uma amostra particular obtida de um paciente saudável (por

exemplo, um paciente não afetado por uma doença ou condição associada a níveis ou atividades anormais de BCMA) serão medidos para estabelecer inicialmente um nível de BCMA de linha de base ou padrão. Esse nível de linha de base de BCMA pode então ser comparado com os níveis de BCMA medidos em amostras obtidas de indivíduos suspeitos de ter uma doença relacionada com BCMA (por exemplo, um tumor contendo células que expressam BCMA) ou condição.

EXEMPLOS

[00160] Os exemplos a seguir são apresentados de modo a fornecer às pessoas versadas na técnica uma divulgação e descrição completas de como produzir e usar os métodos e composições da invenção e não devem a limitar o escopo do que os inventores consideram sua invenção. Foram realizados esforços para assegurar a precisão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), porém, alguns erros e desvios experimentais devem ser considerados. Exceto se indicado de outro modo, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura é em graus Centígrados e a pressão é à pressão atmosférica ou próxima à mesma.

EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-BCMA

[00161] Os anticorpos anti-BCMA foram obtidos por imunização de um camundongo geneticamente modificado com um antígeno BCMA humano (por exemplo, hBCMA, SEQ ID NO: 115) ou por imunização de um camundongo projetado compreendendo DNA que codifica regiões variáveis de cadeia pesada e leve kappa de imunoglobulina humana com um antígeno de BCMA humano.

[00162] Após a imunização, os esplenócitos foram colhidos de cada camundongo e (1) fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar sua viabilidade e formar células de hibridoma e

rastreados quanto à especificidade de BCMA, ou (2) células B classificadas (conforme descrito no documento US 2007/0280945A1) usando um fragmento de BCMA humano como o reagente de classificação que se liga e identifica anticorpos reativos (células B antígeno-positivas).

[00163] Os anticorpos quiméricos para BCMA foram inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Os anticorpos foram caracterizados e selecionados pelas características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, etc. Se necessário, as regiões constantes de camundongo foram substituídas por uma região constante humana desejada, por exemplo, tipo selvagem ou IgG1 modificada ou região constante de IgG4, para gerar uma região constante totalmente humana anticorpo anti-BCMA. Embora a região constante selecionada possa variar de acordo com o uso específico, características de ligação a antígeno de alta afinidade e de especificidade-alvo permanecem na região variável.

[00164] ***Sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos da região variável da cadeia pesada e leve de anticorpos anti-BCMA***: A Tabela 1 apresenta os identificadores da sequência de aminoácidos das regiões variáveis da cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-BCMA selecionados da invenção. Os identificadores de sequência de ácido nucleico correspondentes são apresentados na Tabela 2.

TABELA 1: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

	SEQ ID NOs:							
Designação de Anticorpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80
mAb21587	122				123			
mAb21589	124				125			

TABELA 2: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

	SEQ ID NOs:							
Designação de Anticorpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

EXEMPLO 2: GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD3

[00165] Os anticorpos anti-CD3 foram gerados conforme descrito no documento WO 2017/053856, que é aqui incorporado por referência. Dois desses anticorpos anti-CD3 foram selecionados a partir da produção de anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 de acordo com a presente invenção. A Tabela 3 apresenta os identificadores de sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-CD3 selecionados. Os identificadores de sequência de ácido nucleico correspondentes são apresentados na Tabela 4. Outros anticorpos anti-CD3 para uso na preparação de anticorpos biespecíficos de acordo com a presente invenção podem ser encontrados, por exemplo, no documento WO 2014/047231.

TABELA 3: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

	SEQ ID NOs:							
Designação de Anticorpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb7221G	90	92	94	96	82	84	86	88
mAb7221G20	98	100	102	104	82	84	86	88

TABELA 4: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

	SEQ ID NOs:							
Designação de Anticorpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb7221G	89	91	93	95	81	83	85	87
mAb7221G20	97	99	101	103	81	83	85	87

EXEMPLO 3: GERAÇÃO DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS QUE SE LIGAM A BCMA E CD3

[00166] A presente invenção fornece moléculas de ligação a antígeno biespecíficos que se ligam a CD3 e BCMA; tais moléculas de ligação a antígeno biespecíficos também são referidas aqui como "moléculas biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 ou anti-CD3xBCMA ou anti-BCMA x anti-CD3". A porção anti-BCMA da molécula biespecífica anti-BCMA x anti-CD3 é útil para direcionar células tumorais que expressam BCMA (também conhecido como CD269), e a porção anti-CD3 da molécula biespecífica é útil para ativar células T. A ligação simultânea de BCMA em uma célula de tumor e CD3 em uma célula T facilita o extermínio direcionado (lise celular) da célula de tumor alvejada pela célula T ativada.

[00167] Os anticorpos biespecíficos que compreendem um domínio de ligação específico anti-BCMA e um domínio de ligação específico anti-CD3 foram construídos com o uso de metodologias-padrão, em que o domínio de ligação a antígeno anti-BCMA e o domínio de ligação a antígeno anti-CD3, cada um, compreendem diferentes HCVRs distintas emparelhadas com uma LCVR comum. Em anticorpos biespecíficos exemplificados, as moléculas foram construídas com a utilização de uma cadeia pesada a partir de um anticorpo anti-CD3, uma cadeia pesada a partir de um anticorpo anti-BCMA e uma cadeia leve comum do anticorpo anti-CD3 (10082). Em outros casos, os anticorpos biespecíficos podem ser construídos utilizando uma cadeia pesada de um anticorpo anti-CD3, uma cadeia pesada de um anticorpo anti-BCMA e uma cadeia leve de anticorpo conhecida por ser indiscriminada ou emparelhar de forma eficaz com uma variedade de braços de cadeia pesada.

TABELA 5: SUMÁRIO DE PARTES DE COMPONENTES DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3

Identificador de Anticorpo Biespecífico	**Anti-BCMA**	**Anti-CD3**	**Região Variável Comum de Cadeia Leve**
	Domínio de ligação a antígeno	**Domínio de ligação a antígeno**	
	Região Variável de Cadeia Pesada	***Região Variável de Cadeia Pesada***	
bsAb25441D9 (também referido como REGN5458)	mAb21581	mAb7221G	mAb7221G
bsAb25442D (também referido como REGN5459)	mAb21581	mAb7221G20	mAb7221G20

[00168] A Tabela 6 mostra os identificadores de sequência de aminoácidos para os anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 aqui exemplificados.

TABELA 6: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3

Identificador de Anticorpo Biespecífico	Anti-BCMA Primeiro Domínio de ligação a antígeno				Anti-CD3 Segundo Domínio de ligação a antígeno				Comum Região Variável de Cadeia Leve			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bsAb25441D (REGN5458)	66	68	70	72	90	92	94	96	82	84	86	88
bsAb25442D (REGN5459)	66	68	70	72	98	100	102	104	82	84	86	88

EXEMPLO 4: AFINIDADES DE LIGAÇÃO DERIVADAS DE RESSONÂNCIA PLASMÁTICA DE SUPERFÍCIE E CONSTANTES CINÉTICAS DE ANTICORPOS ANTI-BCMA E ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3

[00169] As constantes de dissociação de equilíbrio (valores K_D) para hBCMA.mmh (SEQ ID NO: 106) que se ligam a mAbs anti-BCMA purificados e mAbs biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 foram determinados usando um biossensor de ressonância de plasmon de superfície em tempo real usando um instrumento Biacore 4000. A superfície do sensor CM5 Biacore foi derivada por acoplamento de

amina com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-Fc humano (GE, nº BR-1008-39) para capturar mAbs anti-BCMA purificados e mAbs biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3. Todos os estudos de ligação Biacore foram realizados em um tampão composto por 0,01 M de HEPES; pH 7,4, NaCl a 0,15 M, EDTA a 3 mM, 0,05% v/v de tensoativo P20 (tampão de corrida HBS-ET). Para afinidades monoméricas, diferentes concentrações do domínio extracelular de BCMA humano expresso com etiqueta myc-myc-hexa-histidina de terminal C (BCMA-MMH humano; SEQ ID NO: 106) ou BCMA de macaco expresso com etiqueta myc-myc-hexa-histidina de terminal C (macaco BCMA-MMH; SEQ ID NO: 110) foram preparados em tampão de corrida HBS-ET (variando de 90 a 1,11 nM, diluições de 3 vezes). Para afinidades diméricas, diferentes concentrações do domínio extracelular de BCMA humano expresso com etiqueta mFc de terminal C (BCMA-MFC humano; SEQ ID NO: 108) BCMA de macaco expresso com etiqueta mFc de terminal C (macaco BCMA-MFC; SEQ ID NO: 112) preparado em tampão de corrida HBS-ET (variando de 30 a 0,37 nM, diluições de 3 vezes) ou BCMA 30 nM expresso com etiqueta mFc de terminal C (BCMA-MFC de camundongo; SEQ ID NO: 114). Amostras de antígeno foram então injetadas sobre as superfícies capturadas de mAbs biespecíficos anti-BCMA e anti-BCMA x anti-CD3 a uma taxa de fluxo de 30 µl/minuto. A associação anticorpo-reagente foi monitorada por 5 minutos, enquanto a dissociação em tampão de corrida HBS-ET foi monitorada por 10 minutos. Todos os experimentos de cinética de ligação foram realizados a 25°C. A associação cinética (k_a) e constantes de taxa de dissociação (k_d) foram determinadas adaptando-se os sensogramas em tempo real a um modelo de ligação de 1:1 com o uso de software de adaptação de curva de Scrubber 2.0c. As constantes de equilíbrio de dissociação de ligação (K_D) e meias vidas dissociativas (t½) foram calculadas a partir das constantes de taxa de cinética como:

$$K_D\ (M) = \frac{kd}{ka}\ ,\ e\ t½\ (min) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

[00170] Como mostrado na Tabela 7, a 25°C, todos os anticorpos anti-BCMA da invenção se ligaram ao BCMA-MMH humano com valores de K_D variando de 1,06 nM a 3,56 nM. Conforme mostrado na Tabela 8, a 25°C, todos os anticorpos anti-BCMA da invenção se ligaram ao BCMA-MFC humano com valores de K_D variando de 22,3 pM a 103 pM. Conforme mostrado na Tabela 9, a 25°C, dois dos anticorpos anti-BCMA da invenção ligaram-se ao macaco BCMA-MMH com valores de K_D variando de 38,8 nM a 49,92 nM. Como mostrado na Tabela 10, a 25°C, quatro dos anticorpos anti-BCMA da invenção ligaram-se ao BCMA-MFC de macaco com valores de K_D variando de 148 pM a 14,7 nM. Como mostrado na Tabela 11, a 25°C, quatro dos anticorpos anti-BCMA da invenção ligaram-se a BCMA-MFC de camundongo com valores de K_D variando de 677 pM a 18,8 nM.

TABELA 7: PARÂMETROS DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-BCMA QUE SE LIGAM A BCMA-MMH HUMANO A 25 °C

Nº REGN	Nº Ab PID	Absorção de mAb (RU)	Ligação de hBCMA.mmh 90 nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	437,5 ± 1,1	19,9	8,27E+05	8,74E-04	1,06E-09	13,2
REGN5459	bsAb25442D	384,8 ± 1,4	17,0	7,30E+05	1,01E-03	1,38E-09	11,5
	mAb16711	275,0 ± 2,8	22,2	2,01E+06	3,47E-03	1,73E-09	3,3
	mAb16716	310,3 ± 2,2	26,4	8,41E+05	2,99E-03	3,56E-09	3,9
REGN4514	mAb16732	284,1±0,9	25,3	1,06E+06	2,85E-03	2,69E-09	4,1
REGN4515	mAb16747	332,5 ± 0,9	31,4	8,69E+05	2,47E-03	2,84E-09	4,7

TABELA 8: PARÂMETROS DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-BCMA QUE SE LIGAM A BCMA-MFC HUMANO A 25°C

Nº REGN	Nº Ab PID	Absorção de mAb (RU)	Ligação de hBCMA.mFc 30nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	437,9 ± 0,1	106,8	4,48E+05	≤ 1E-5	2,23E-11	≤1.155
REGN5459	bsAb25442D	385,2 ± 0,1	96,8	4,49E+05	≤ 1E-5	2,23E-11	≤1.155
	mAb16711	268,9 ± 1,4	113,5	1,85E+06	1,90E-04	1,03E-10	60,8
	mAb16716	303,4 ± 1,2	120,3	8,62E+05	8,35E-05	9,68E-11	138,4
REGN4514	mAb16732	282,3 ± 1,0	124,1	1,07E+06	4,53E-05	4,22E-11	255,2
REGN4515	mAb16747	327,3 ± 1,5	146,0	1,41E+06	8,95E-05	6,33E-11	129,0

TABELA 9: PARÂMETROS DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-BCMA LIGAÇÃO AO BCMA-MMH DE MACACO A 25 °C

Nº REGN	Nº Ab PID	Absorção de mAb (RU)	Ligação de mfBCMA.mmh 90 nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	438,2 ± 0,9	14,8	1,82E + 05	9,09E-03	4,99E-08	1,3
REGN5459	bsAb25442D	384,6 ± 1,4	12,7	2,23E+05	8,64E-03	3,88E-08	1,3
	mAb16711	263,5 ± 1,7	-0,5	NB	NB	NB	NB
	mAb16716	301,8 ± 0,5	0,8	NB	NB	NB	NB
REGN4514	mAb16732	279,1 ± 0,8	1,1	NB	NB	NB	NB
REGN4515	mAb16747	326,2 ± 0,5	1,9	NB	NB	NB	NB

TABELA 10: PARÂMETROS DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-BCMA LIGAÇÃO AO BCMA-MFC DE MACACO A 25 °C

Nº REGN	Nº Ab PID	Absorção de mAb (RU)	Ligação de mfBCMA.mFc 30 nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	437,9 ± 1,1	107,7	5,28E+05	8,80E-05	1,67E-10	131,2
REGN5459	bsAb25442D	386,2 ± 0,22	97,0	4,82E+05	7,15E-05	1,48E-10	161,6
	mAb16711	259,4 ± 1,4	0,9	NB	NB	NB	NB
	mAb16716	300,8 ± 0,6	3,2	IC	IC	IC	IC
REGN4514	mAb16732	276,9 ± 1,1	40,3	4,92E+05	7,24E-03	1,47E-08	1,6
REGN4515	mAb16747	324,4 ± 0,7	101,3	2,13E+06	7,16E-03	3,37E-09	1,6

TABELA 11: PARÂMETROS DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-BCMA LIGAÇÃO A BCMA-MFC DE CAMUNDONGO A 25 °C

Nº REGN	Nº Ab PID	Absorção de mAb (RU)	Ligação de mBCMA.mFc 30 nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	438,8	2,7	NB	NB	NB	NB
REGN5459	bsAb25442D	383,9	2,4	NB	NB	NB	NB
	mAb16711	257,0	90,0	1,07E+06	1,10E-03	1,02E-09	10,5
	mAb16716	300,0	33,4	2,05E+05	3,85E-03	1,88E-08	3,0
REGN4514	mAb16732	276,1	109,6	3,97E+05	2,69E-04	6,77E-10	43,0
REGN4515	mAb16747	323,1	107,6	9,47E+05	4,18E-03	4,42E-09	2,8

EXEMPLO 5: LIGAÇÃO DE FACS DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 A CÉLULAS HUMANAS E DE CINOMOLGO QUE EXPRESSAM CD3

[00171] A análise de citometria de fluxo foi utilizada para determinar a ligação de anticorpos biespecíficos BCMAxCD3 a CD3 humano e de cinomolgo (células Jurkat, células Jurkat geneticamente modificadas com mfCD3, células T CD8+ humanas primárias e células T CD8+ de cinomolgo). Resumidamente, 1e05 células/poço foram incubadas na presença de lavagem FACS com bloco (PBS + 1% FBS filtrado + 5% de soro de camundongo) com uma diluição em série de BCMAxCD3 e anticorpos de controle por 30 minutos em gelo. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com lavagem FACS fria (PBS + 1% FBS filtrado) e o anticorpo ligado foi detectado por incubação com anticorpo secundário anti-humano conjugado com Alexa647 em gelo por mais 30 minutos. Os poços que não continham anticorpo ou apenas secundário também foram usados como controles. Para a detecção de células T de macaco e humanas, um coquetel de anticorpos humanos e de cinomolgo de reação cruzada para CD4, CD8 e CD16 foi adicionado ao secundário anti-humano. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em 200 µl de PBS gelado contendo 1% de FBS filtrado e analisadas por citometria de fluxo em um BD FACS Canto II. As células foram fechadas pelo FSC-H pelo FSC-A para selecionar eventuais singletos, seguido por dispersões laterais e para frente para selecionar eventos ao vivo. Para células T de macaco, foi realizado o fechamento adicional em células CD8+/CD16-.

[00172] Os valores de EC50 para ligação FACS foram calculados

usando análise de regressão não linear de 4 parâmetros no software Prism.

[00173] As células Jurkat são uma linhagem de células linfoblásticas de células T que expressam CD3 humano. REGN5458 ligou-se a CD3 humano em células Jurkat e células T CD8+ humanas primárias com EC50s médias $1,50x10^{-8}$ M e $3,20x10^{-8}$ M, respectivamente. A ligação de REGN5459 foi ao CD3 humano mais fraca, com EC50 média de $5,58x10^{-7}$ M para células Jurkat e $4,71x10^{-6}$ para células T CD8+ humanas primárias. Utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, uma linhagem de células Jurkat foi geneticamente modificada para expressar cadeias CD3ε e CD3δ de cinomolgo no lugar das versões humanas. A EC50 média de ligação de REGN5458 à linhagem de células Jurkat geneticamente modificadas com mfCD3 foi de $1,51x10^{-8}$ M e às células T CD8+ de cinomolgo primárias foi de $4,66x10^{-8}$ M. REGN5459 não se ligou a células que expressam mfCD3.

[00174] Não foi observada ligação em qualquer linhagem celular para o anticorpo de controle de isotipo negativo, designado mAb15260.

TABELA 12: LIGAÇÃO A CÉLULAS QUE EXPRESSAM CD3: EC50 MEDIANA

	Jurkat-hCD3		Jurkat-mfCD3		Células T CD8+ humanas		Células T CD8+ Mf (Cino)	
REGN	EC50 [M]	n	EC50 [M]	n	EC50 [M]	n	EC50 [M]	n
REGN5458	1,50E-08	5	1,51E-08	2	3,20E-08	1	4,66E-08	1
REGN5459	5,58E-07	5	Sem ligação	2	4,71E-06	1	Sem ligação	1

EXEMPLO 6: ENSAIO DE LIGAÇÃO FACS PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE CELULAR

[00175] A capacidade do anticorpo anti-BCMA x CD3, mAb25442D, de se ligar à superfície de mieloma múltiplo positivo de BCMA (NCI-H929, MM.1S, OPM-2 e RPMI-8226), linfoma positivo de BCMA (Raji e Daudi), e células negativas para BCMA (HEK293) foram determinadas

por citometria de fluxo. As células foram colhidas dos frascos usando tampão de dissociação celular (Millipore, nº Cat S-004-C) e semeadas em tampão de coloração (PBS, sem cálcio e magnésio (Irving 9240) + 2% de FBS (ATCC 30-2020) a uma densidade de 500.000 células por poço em uma placa V-Bottom de 96 poços. As células foram coradas por 30 minutos a 4 °C com diluições em série de duas vezes de um anticorpo anti-BCMA x CD3 conjugado com Alexa647 (mAb25442D-A647) ou um controle de isotipo conjugado com Alexa 647 com o mesmo braço de ligação de CD3 emparelhado com um braço de direcionamento de tumor irrelevante (Isotipo-A647). As células foram lavadas duas vezes com tampão de coloração e rotulado com o kit de coloração de células mortas verdes fixas LIVE/DEAD™ (Invitrogen, L34970) de acordo com as instruções do fabricante para discriminar entre células vivas e mortas. As células foram então lavadas e fixadas por 25 minutos a 4 °C usando uma solução a 50% de BD Cytofix (BD, nº CAT 554655) diluída em PBS. As amostras foram executadas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) e analisadas em Flowjo 10.2 (Tree Star). Após o fechamento para células vivas e células individuais, a intensidade fluorescente média (MFI) foi determinada, e os valores de MFI foram plotados no Graphpad Prism usando uma equação logística de quatro parâmetros sobre uma curva de resposta de 10 pontos para calcular EC_{50}s. A condição zero para cada curva de dose-resposta também é incluída na análise como uma continuação da diluição em série de duas vezes e é representada como a dose mais baixa. O sinal para ruído (S/N) é determinado tomando a razão do mAb25442D-A647 MFI para o Isotipo-A647 MFI. (Tabela 13). O mAb25442D-A647 S/N variou de 2 a 470 e os valores de EC_{50} variaram de 27 a 83 nM. Nenhuma ligação detectável foi observada em células HEK293.

TABELA 13: LIGAÇÃO ÀS CÉLULAS

Linhagem celular	mAb25442D-A647 S/N	mAb25442D-A647 EC_{50} (nM)
NCI-H929	470	79
MM.1S	43	83
OPM-2	19	57
RPMI-8226	9	27
Daudi	3	ND
Raji	2	ND
HEK293	1	ND

ND = não determinado devido a curvas não sigmoidais

EXEMPLO 7: ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T VIA ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 NA PRESENÇA DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM BCMA

[00176] A atividade dos anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 foi avaliada em um bioensaio repórter Jurkat/NFATLuc utilizando várias linhagens celulares com níveis variados de expressão de superfície BCMA. As células Jurkat foram geneticamente modificadas para expressar um repórter NFAT-luciferase (Jurkat/NFATLuc.3C7) e 50.000 células repórter Jurkat foram combinadas com 50.000 BCMA positivo (Daudi, MM1-S, NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226, MOLP-8 ou Raji) ou células negativas para BCMA (HEK293) em placas de micropoços brancas de 96 poços Thermo Nunclon delta (Thermo Scientific, nº CAT 136102) em 50 ul de meio de ensaio (meio RPMI com 10% de FBS e 1% P/S/G). Diluições em série de três vezes dos anticorpos biespecíficos BCMA x CD3 (mAb25441D ou mAb25442D), ou um anticorpo bivalente anti-BCMA (mAb21581) foram adicionados imediatamente em 50 ul de tampão de ensaio. As placas foram suavemente agitadas e incubadas em 37 °C, incubador 5% de CO_2 durante 4 a 6 horas. A atividade de NFAT-luciferase foi determinada usando Promega One-Glo (nº CAT E6130) e um leitor de placas Perkin

Elmer Envision. RLU foram plotados no GraphPad Prism usando uma equação logística de quatro parâmetros sobre uma curva de resposta de 12 pontos para calcular os valores de EC_{50}. A condição sem tratamento com anticorpos para cada curva de dose-resposta também está incluída na análise como uma continuação da diluição em série de três vezes e é representada como a dose mais baixa. O sinal para ruído (S:N) é determinado tomando a razão do maior RLU na curva para o mais baixo.

[00177] As células Jurkat/NFATLuc ativaram mAb25441D na presença de células expressando BCMA com EC50s variando de 0,61 nM a 2,1 nM e S:N variando de 8 a 123. As células Jurkat/NFATLuc ativaram mAb25442D na presença de células expressando BCMA com EC50s variando de 2,6 nM a 11 nM e S:N variando de 7 a 120. O mAb25441D biespec. BCMA x CD3 com o braço de ligação de CD3 de maior afinidade foi consistentemente mais potente do que mAb25442D com um braço de ligação de CD3 de menor afinidade; enquanto o S:N foi semelhante para os dois biespecíficos. Nenhum anticorpo ativou células Jurkat/NFATLuc na presença de células HEK293 e os anticorpos biespecíficos de controle não aumentaram significativamente a atividade repórter Jurkat com qualquer uma das linhagens celulares testadas. Os resultados são mostrados nas Tabelas 14A e 14B, abaixo.

TABELA 14A: ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

	Daudi		MM1-S		NCI-H929		OPM-2	
Anticorpos	**EC50**	**S:N**	**EC50**	**S:N**	**EC50**	**S:N**	**EC50**	**S:N**
bsAb25441D	2,1E-9	43	1,2E-9	165	6,8E-10	39	6,6E-10	8
bsAb25442D	7,9E-9	25	4,4E-9	120	2,7E-9	32	2,6E-9	7
mAb21581	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1

TABELA 14B: ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

	RPMI-8226		MOLP-8		Raji		HEK293	
Anticorpos	**EC50**	**S:N**	**EC50**	**S:N**	**EC50**	**S:N**	**EC50**	**S:N**
bsAb25441D	6,1E-10	55	1,4E-9	32	1,6E-9	123	ND	1

bsAb25442D	2,6E-9	42	1,1E-8	31	7,4E-9	78	ND	1
mAb21581	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1

EXEMPLO 8: ENSAIO DE CITOTOXICIDADE BASEADO EM FACS PARA AVALIAR A MORTE MEDIADA POR CÉLULAS T DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLO QUE EXPRESSAM BCMA NA PRESENÇA DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3

[00178] A capacidade de ligação ao anticorpo (ABC) de um anticorpo BCMA anti-humano disponível comercialmente (clone 19F2) foi determinada em um painel de linhagens de células de mieloma múltiplo usando um kit IgG anti-humano Quantum Simply Cellular e seguindo as instruções do fabricante (Bangs Laboratories).

[00179] Resumidamente, linhagens celulares de mieloma múltiplo (MM) (H929, MM1S, U266, MOLP8 e RPMI8226) e esferas Quantum Simply Cellular foram incubadas por 30 minutos a 4°C com uma titulação de anticorpo anti-hBCMA-19F2 conjugado com APC. Após a incubação, as células e esferas foram lavadas três vezes, ressuspensas em 200 µl de PBS gelado contendo 1% de FBS filtrado e analisadas por citometria de fluxo. Usando o modelo QuickCal® (Bangs Labs), o ABC de um nível de saturação de anti-BCMA 19F2 para cada linhagem celular foi interpolado a partir da curva padrão gerada pela intensidade do canal das populações de esferas em saturação.

[00180] A morte de células-alvo que expressam BCMA por células T humanas ou de macaco cinomolgo em repouso foi determinada por citometria de fluxo. Resumidamente, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanas ou de macaco cinomolgo foram plaqueadas em meio RPMI (humano) ou X-Vivo (cino) suplementado a 1x106 células/ml e incubadas durante a noite a 37°C, a fim de enriquecer para linfócitos por esgotamento do aderente macrófagos, células dendríticas e alguns monócitos. No dia seguinte, as células-alvo que expressam

BCMA foram marcadas com 1 uM de Violet CellTrace e coincubadas com PBMC depletados de células aderentes (razão efetor/célula-alvo 4:1) e uma diluição em série de biespecíficos BCMAxCD3 ou anticorpos de controle a 37°C. Após 48 a 72 horas, as células foram removidas das placas de cultura de células, coradas com um coquetel de anticorpos de fenotipagem e corante de viabilidade de células vivas/mortas e analisadas por FACS. A fim de quantificar o número de células-alvo vivas presentes nos poços, 20 µl de esferas de contagem absoluta CountBright foram adicionados aos poços imediatamente antes da aquisição. Para a avaliação da especificidade da morte, as células foram bloqueadas em populações marcadas com rastreador de células Violet. A porcentagem de sobrevivência das células-alvo foi calculada da seguinte forma: Sobrevivência do alvo = (R_1/R_2)*100, onde R_1 = número absoluto de células-alvo vivas na presença de células efetoras e anticorpo, e R_2 = número de alvo vivo células apenas (cultivadas sem células efetoras ou anticorpo de teste).

[00181] As células T CD8+ humanas foram classificadas como CD45+/CD14-/CD4-/CD8+. As células T CD8+ de cinomolgo foram bloqueadas como células T CD45+/CD20-/CD14-/CD4-/CD8+. A ativação das células T foi relatada como a porcentagem de células T CD25+ ou CD69+ do total de células T CD8+.

[00182] Os valores de EC50 para a sobrevivência da célula-alvo e ativação de células T foram calculados usando análise de regressão não linear de 4 parâmetros no software Prism.

[00183] Os anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 foram testados quanto à sua capacidade de ativar células T humanas e de cinomolgo em repouso para matar um painel de células que expressam BCMA com diferentes níveis de BCMA de superfície. Com células T humanas em repouso como células efetoras, REGN5458 mediou a morte de 5 linhagens celulares BCMA diferentes com valores de EC50

variando de 7,07x10^{-10} M a 3,45x10^{-11} M. REGN5459 mostrou morte das mesmas 5 linhagens celulares com valores de EC50s variando de 1,66x10^{-9} M a 1,06x10^{-10} M. EC50s para ativação de células T, conforme medido pela suprarregulação de CD25 em células T CD8+ foram semelhantes a matar EC50s. Ativação modesta de células T foi observada na presença de mAb17664D de controle de isotipo CD3 de 1 braço, mas apenas para a linhagem de células U266. Nenhuma citotoxicidade foi observada para os controles de isotipo testados.

[00184] A morte mediada por BCMAxCD3 por células T de cinomolgo foi testada apenas na linhagem de células MM H929. A EC_{50} para citotoxicidade mediada por REGN5458 e REGN5459 foi de 2,34x10^{-11} e 6,92x10^{-11}, respectivamente. Nenhuma citotoxicidade ou ativação de células T foi observada para o anticorpo de controle de isotipo mAb15260 com células efetoras humanas ou de cinomolgo. Os resultados são mostrados nas Tabelas 15A, 15B e 16, abaixo.

TABELA 15A: EC_{50} MEDIANA, CÉLULAS EFETORAS HUMANAS

	H929 (40000 ABC)			MM1S (18000 ABC)			U266 (13000 ABC)		
Nº REGN	n	% de Sobrevivência	% de ativação T	n	% de Sobrevivência	% de ativação T	n	% de Sobrevivência	% de ativação T
REGN5458	3	1,03E-10	2,11E-10	2	6,46E-11	7,06E-11	1	3,28E-10	1,07E-10
REGN5459	4	3,01E-10	3,00E-10	2	2,88E-10	4,58E-10	1	1,66E-09	4,69E-10

TABELA 15B: EC_{50} MÉDIA, CÉLULAS EFETORAS HUMANAS

	RPMI8226 (10000 ABC)			Molp8 (2000 ABC)		
Nº REGN	n	% de Sobrevivência	% de ativação T	n	% de Sobrevivência	% de ativação T
REGN5458	1	3,45E-11	6,49E-11	2	7,07E-10	1,10E-9
REGN5459	1	1,06E-10	7,50E-10	3	1,36E-09	6,47E-9

TABELA 16: EC_{50} MÉDIA, CÉLULAS EFETORAS DE CINOMOLGO

	H929		
Nº REGN	n	% de Sobrevivência	% de ativação T
REGN5458	4	2,34E-11	6,83E-11
REGN5459	4	6,92E-11	1,58E-10

EXEMPLO 9: ENSAIO DE CITOTOXICIDADE FACS PARA MORTE MEDIADA POR CÉLULAS T AUTÓLOGAS DE CÉLULAS BLÁSTICAS DE MIELOMA MÚLTIPLO PRIMÁRIO NA PRESENÇA DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3

[00185] A fim de monitorar a morte específica de células de mieloma múltiplo por citometria de fluxo, células mononucleares da medula óssea (BMMC) de pacientes com mieloma múltiplo foram semeadas em células estromais humanas (HS5) e repousadas durante a noite a 37°C. Separadamente, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) correspondentes do paciente foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI suplementado a $1x10^6$ células/ml durante a noite a 37°C, a fim de enriquecer para linfócitos pela depleção das células aderentes. No dia seguinte, as BMMC foram coincubadas com PBMC não expostas depletadas de células aderentes em células do estroma (HS5) e uma diluição em série de 10x de BCMAxCD3 biespecífico ou controle de isotipo CD3 de 1 braço (concentração inicial de 66,7 nM) a 37°C. As células foram removidas das placas de cultura de células no dia 3, 4 ou 7 e analisadas por FACS. Para a avaliação da especificidade de morte, as células de mieloma múltiplo foram classificadas como únicas, vivas, CD90 negativas (para excluir células estromais), CD2 negativas, CD56 positivas. O CD45 estava baixo em células de mieloma múltiplo na maioria das amostras, exceto MM455. A porcentagem de células-alvo vivas foi relatada para o cálculo da sobrevivência ajustada da seguinte forma: Sobrevivência ajustada = (R1/R2)*100, em que R1 = % de células-alvo vivas na presença de anticorpo e R2 = % de células-alvo vivas na ausência do anticorpo de teste.

[00186] As células T foram classificadas como CD2 positivas, CD56 negativas e CD4 ou CD8 positivas. A ativação de células T foi relatada como a porcentagem de células T CD25+ CD4 ou CD8 do total de

células T CD4 ou CD8.

[00187] Os anticorpos biespecíficos BCMAxCD3 foram testados quanto à sua capacidade de redirecionar a morte de células blásticas de mieloma múltiplo primário por PBMC de doadores autólogos. A citotoxicidade máxima mediada por BCMAxCD3 de blast MM primário variou de 52-96%, com EC50s variando de $9,89x10^{-11}$ M a $3,67x10^{-9}$ M para REGN5458 e $4,96x10^{-10}$ M a $7,94x10^{-8}$ M para REGN5459. A ativação de células T foi medida avaliando a regulação positiva de CD25 em células T CD8+. EC50s de ativação de células T variaram de $3,23x10^{-9}$ a $1,69x10^{-10}$. Citotoxicidade modesta e ativação de células T foram observadas para o controle de isotipo CD3 de 1 braço (sem ligação ao alvo). Os resultados são mostrados nas Tabelas 17A e 17B, abaixo.

TABELA 17A: % DE LISE DE MM

ID de amostra	Estágio da doença	Razão E:T	Duração do tratamento	% de lise de MM em 66nM REGN5458	% de lise de MM em 66nM REGN5459	% de lise MM em 66nM Isotipo
MM2	recém-diagnosticado	1,4	7 dias	88	85	27,5
MM369	recém-diagnosticado	0,3	3 dias	96	94	0
MM453	recém-diagnosticado	2,4	3 dias	82	80	40
MM455	progressão, tratado	0,4	3 dias	63	52	24

TABELA 17B: EC50 DE LISE DE MM E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

ID de amostra	Estágio da doença	Razão E:T	duração do tratamento	EC50 de lise de MM REGN5458	EC50 de lise de MM REGN5459	Regulação ascendente de CD25 EC50 REGN5456	Regulação ascendente de CD25 EC50 REGN5456
MM2	recém-diagnosticado	1,4	7 dias	7,47E-10	7,24E-09	Não realizado	Não realizado
MM369	recém-diagnosticado	0,3	3 dias	1,07E-10	4,96E-10	1,69E-10	2,03E-10
MM453	recém-diagnosticado	2,4	3 dias	9,89E-11	1,19E-09	1,71E-10	3,23E-9
MM455	progressão, tratado	0,4	3 dias	3,67E-09	7,94E-08	2,06E-10	1,16E-9

EXEMPLO 10: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 PREVENEM O CRESCIMENTO DE TUMORES QUE EXPRESSAM BCMA (NCI-H929) *IN VIVO* EM UM MODELO DE TUMOR XENOGÊNICO

[00188] Para determinar a eficácia *in vivo* de anticorpos biespecíficos BCMAxCD3 (Abs), um estudo de tumor xenogênico foi realizado. Os camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)

foram implantados subcutaneamente com uma mistura de $10x10^6$ células de mieloma múltiplo NCI-H929 expressando BCMA e $0,5x10^6$ células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) isoladas de um doador normal. Os camundongos (n = 7 por grupo) foram imediatamente administrados com um controle de veículo PBS, um Ab de controle de isotipo bivalente anti-FelD1 irrelevante (REGN2759), um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (mAb17664D), um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458), ou um Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a uma dose de 4 mg/kg. Os camundongos foram administrados com Abs duas vezes por semana durante um total de três semanas, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo de 40 dias. Enquanto os tumores $BCMA^+$ cresceram de forma semelhante nos camundongos tratados com veículo, controle de isotipo e controle de ligação a CD3, ambos os Abs de BCMAxCD3 que foram testados evitaram o crescimento de tumores *in vivo*.

[00189] *Implantação e medição de tumores singênicos:* camundongos NSG foram implantados por via subcutânea com uma mistura de $10x10^6$ células de mieloma múltiplo NCI-H929 que expressam BCMA e $0,5x10^6$ PBMC derivadas de um doador normal. Os camundongos (n = 7 por grupo) foram imediatamente administrados com um controle de veículo PBS, um Ab de controle de isotipo bivalente anti-FelD1 irrelevante (REGN2759), um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (mAb17664D), um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458), ou um Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a uma dose de 4 mg/kg. Os camundongos foram administrados com Abs duas vezes por semana durante um total de três semanas. O crescimento do tumor foi medido com compassos duas vezes por semana durante a experiência. Os camundongos foram sacrificados 40 dias após a implantação de tumor.

[00190] *Cálculo do crescimento e inibição do tumor singênico*: Para

determinar o volume do tumor por paquímetro externo, foram determinados o maior diâmetro longitudinal (comprimento em mm) e o maior diâmetro transversal (largura em mm). Os volumes do tumor com base nas medições do calibrador foram calculados pela fórmula: Volume (mm^3) = (comprimento x $largura^2$)/2.

[00191] Os Abs biespecíficos BCMAxCD3 impediram o crescimento de tumores $BCMA^+$ NCI-H929 *in vivo* em um modelo de tumor xenogênico. Os resultados são mostrados na Tabela 18, abaixo.

TABELA 18: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 4**
PBS (controle do veículo)	67,1 ± 5,9
REGN2759 (controle de isotipo)	62,6 ± 3,7
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	76,1 ± 7,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	39,5 ± 9,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	26,5 ± 6,2

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 7**
PBS (controle do veículo)	123,0 ± 25,2
REGN2759 (controle de isotipo)	109,7 ± 20,3
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	182,0 ± 19,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 11**
PBS (controle do veículo)	361,5 ± 35,7
REGN2759 (controle de isotipo)	415,3 ± 11,4
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	449,6 ±46,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 14**
PBS (controle do veículo)	581,4 ± 57,9
REGN2759 (controle de isotipo)	734,3 ± 41,8
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	741,2 ± 56,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 18**
PBS (controle do veículo)	1033,4 ± 143,7
REGN2759 (controle de isotipo)	1586,1 ± 101,4
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	1511,4 ± 80,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 21**
PBS (controle do veículo)	1730,9 ± 244,8
REGN2759 (controle de isotipo)	2554,7 ± 148,8
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	2474,0 ± 132,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 28**
PBS (controle do veículo)	Eutanizado - não medido
REGN2759 (controle de isotipo)	Eutanizado - não medido

mAb17664D (controle de ligação de CD3)	Eutanizado - não medido
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Anticorpo (4 mg/kg)	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 40**
PBS (controle do veículo)	Eutanizado - não medido
REGN2759 (controle de isotipo)	Eutanizado - não medido
mAb17664D (controle de ligação de CD3)	Eutanizado - não medido
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

EXEMPLO 11: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 PREVINEM O CRESCIMENTO DE TUMORES QUE EXPRESSAM BCMA (NCI-H929) DE UMA MANEIRA DEPENDENTE DE DOSE EM UM MODELO DE TUMOR XENOGÊNICO *IN VIVO*

[00192] Para determinar a eficácia *in vivo* de anticorpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, foi realizado um estudo de tumor xenogênico. Camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) foram implantados subcutaneamente com uma mistura de 10x10^6 células tumorais de mieloma múltiplo humano expressando BCMA NCI-H929 e 0,5x10^6 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) isoladas de um doador normal e saudável. Os camundongos (n=7 por grupo) foram então imediatamente administrados com um controle de veículo PBS, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 4 mg/kg, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G20; REGN4460) a uma dose de 4 mg/kg, um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) em doses de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg, ou um Ab biespecífico

de BCMAxCD3 (G20; REGN5459) em doses de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos foram administrados estes Abs duas vezes por semana para um total de sete doses, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo de 60 dias. Enquanto os tumores $BCMA^+$ NCI-H929 cresceram de forma semelhante nos camundongos tratados com veículo e controle de ligação de CD3, ambos os Abs anti-BCMA x anti-CD3 que foram testados preveniram o crescimento de tumores de uma maneira dependente da dose *in vivo*.

[00193] *Implantação e medição de tumores xenogênicos:* camundongos NSG foram implantados subcutaneamente com uma mistura de $10x10^6$ células de mieloma múltiplo NCI-H929 que expressam BCMA e $0,5x10^6$ PBMC derivadas de um doador normal e saudável. Os camundongos (n = 7 por grupo) foram imediatamente administrados com um controle de veículo PBS, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D), um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G20; REGN4460), um BCMAxCD3 (G; REGN5458) Ab biespecífico, ou um Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459). mAb17664D e REGN4460 foram administrados em 4 mg/kg, enquanto REGN5458 e REGN5459 foram administrados em 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos receberam Abs duas vezes por semana para um total de sete doses. O crescimento do tumor foi medido com compassos duas vezes por semana durante a experiência.

[00194] *Cálculo do crescimento e inibição do tumor xenogênico*: Para determinar o volume do tumor por compasso externo, foram determinados o maior diâmetro longitudinal (comprimento em mm) e o maior diâmetro transversal (largura em mm). Os volumes do tumor com base nas medições do calibrador foram calculados pela fórmula: Volume (mm^3) = (comprimento x $largura^2$)/2.

[00195] Os Abs biespecíficos BCMAxCD3 preveniram o crescimento

de tumores BCMA$^+$ NCI-H929 de uma maneira dependente da dose neste modelo de tumor *in vivo* xenogênico. Os resultados são mostrados na Tabela 19, abaixo, e ilustrados nas Figuras 1 e 2.

TABELA 19: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 4**
PBS (Controle do veículo)	60,1 ± 7,9
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	42,5 ± 4,7
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	52,0 ± 5,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	18,0 ± 1,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	31,9 ± 2,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	32,0 ± 2,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	21,8 ± 3,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	19,6 ± 4,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	33,0 ± 4,4
Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 7**
PBS (Controle do veículo)	138,2 ± 25,1
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	108,6 ± 17,8
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	132,4 ± 21,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,3 ± 1,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	11,3 ± 3,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	30,8 ± 5,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	8,0 ± 4,3

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	7,3 ± 3,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	8,4 ± 4,0

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 12**
PBS (Controle do veículo)	545,4 ± 88,7
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	493,4 ± 67,5
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	616,2 ± 84,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,6 ± 1,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	71,5 ± 22,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	1,7 ± 1,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	0 ± 0

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 15**
PBS (Controle do veículo)	921,4 ± 147,5
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	874,8 ± 86,6
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	1190,7 ± 91,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	133,4 ± 50,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	7,9 ± 7,9

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 19**
PBS (Controle do veículo)	1785,3 ± 282,2
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	1833,4 ± 186,6
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	2336,5 ± 188,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	413,7 ± 162,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	23,1 ± 23,1

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 22**
PBS (Controle do veículo)	2601,5 ± 414,5
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	2878,5 ± 257,6
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	3374,3 ± 267,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	669,4 ± 248,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	69,5 ± 69,5

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 26**
PBS (Controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1167,0 ± 431,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	156,7 ± 156,7

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 29**
PBS (Controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1781,8 ± 620,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	226,6 ± 226,6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 34**
PBS (Controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 39**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 42**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 46**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 55**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 60**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

EXEMPLO 12: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 REDUZEM O TAMANHO E PREVINEM O CRESCIMENTO DE

TUMORES QUE EXPRESSAM BCMA ESTABELECIDOS (NCI-H929) DE MANEIRA DEPENDENTE DE DOSE EM UM MODELO DE TUMOR *IN VIVO* XENOGÊNICO

[00196] Para determinar a eficácia *in vivo* de anticorpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, foi realizado um estudo de tumor xenogênico. Camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) foram implantados subcutaneamente com uma mistura de 10x10^6 células tumorais de mieloma múltiplo humano expressando BCMA NCI-H929 e 0,5x10^6 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) isoladas de um doador normal e saudável. Os tumores foram deixados crescer e se estabelecer por 5 dias até que tivessem aproximadamente 70 mm^3 em tamanho. No dia 5, os camundongos (n = 7 a 8 por grupo) foram então administrados com um controle de veículo PBS, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 4 mg/kg, um controle biespecífico de ligação a CD3 Ab (G20; REGN4460) a uma dose de 4 mg/kg, um Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) em doses de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg, ou um BCMAxCD3 (G20; REGN5459) Ab biespecífico em doses de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos foram administrados estes Abs duas vezes por semana para um total de sete doses, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo de 55 dias. Enquanto os tumores BCMA$^+$ NCI-H929 cresceram de forma semelhante nos camundongos tratados com veículo e controle de ligação de CD3, ambos os Abs BCMAxCD3 que foram testados diminuíram os tumores estabelecidos e preveniram o crescimento de tumores de uma maneira dependente da dose *in vivo*.

[00197] *Implantação e medição de tumores xenogênicos:* camundongos NSG foram implantados subcutaneamente com uma mistura de 10x10^6 células de mieloma múltiplo NCI-H929 que expressam BCMA e 0,5x10^6 PBMC derivadas de um doador normal e

saudável. Os tumores foram deixados crescer e se estabelecer por 5 dias até que tivessem aproximadamente 70 mm^3 em tamanho. No dia 5, os camundongos (n = 7-8 por grupo) foram então administrados com um controle de veículo PBS, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D), um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G20; REGN4460), a BCMAxCD3 (G; REGN5458) Ab biespecífico, ou um Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459). mAb17664D e REGN4460 foram administrados em 4 mg/kg, enquanto REGN5458 e REGN5459 foram administrados em 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos receberam Abs duas vezes por semana para um total de sete doses. O crescimento do tumor foi medido com compassos duas vezes por semana durante a experiência.

[00198] *Cálculo do crescimento e inibição do tumor xenogênico*: Para determinar o volume do tumor por compasso externo, foram determinados o maior diâmetro longitudinal (comprimento em mm) e o maior diâmetro transversal (largura em mm). Os volumes do tumor com base nas medições do calibrador foram calculados pela fórmula: Volume (mm^3) = (comprimento x $largura^2$)/2.

[00199] Os anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 reduziram o tamanho e impediram o crescimento de tumores $BCMA^+$ NCI-H929 estabelecidos de uma maneira dependente da dose neste modelo de tumor xenogênico *in vivo*. Os resultados são mostrados na Tabela 20, abaixo, e ilustrados nas Figuras 3 e 4.

TABELA 20: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 5**
PBS (controle do veículo)	61,5 ± 6,4
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4	63,7 ± 5,4

mg/kg	
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	62,6 ± 3,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	71,9 ± 10,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	69,3 ± 7,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	58,1 ± 5,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	61,8 ± 5,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	69,5 ± 4,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	74,9 ± 6,4

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 8**
PBS (controle do veículo)	124,3 ± 17,3
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	145,3 ± 22,0
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	170,7 ± 15,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	64,7 ± 16,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	120,3 ± 16,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	130,3 ± 16,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	45,8 ± 9,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	171,9 ± 23,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	152,3 ± 20,0

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 12**
PBS (controle do veículo)	565,7 ± 64,7
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	585,0 ± 64,4

REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	706,8 ± 46,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	19,5 ± 10,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	262,7 ± 61,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	525,9 ± 71,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	11,5 ± 8,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	233,8 ± 63,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	462,5 ± 57,7

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 15**
PBS (controle do veículo)	1150,4 ± 105,7
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	1041,4 ± 101,3
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	1298,4 ± 71,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	25,6 ± 19,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	476,2 ± 133,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1031,2 ± 164,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	327,2 ± 135,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	1094,2 ± 78,9

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 19**
PBS (controle do veículo)	2621,3 ± 190,9
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	2557,5 ± 241,1
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	3383,3 ± 183,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	40,6 ± 32,8

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1347,5 ± 334,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2467,5 ± 370,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	606,2 ± 288,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	2412,5 ± 184,6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 22**
PBS (controle do veículo)	3717,9 ± 214,5
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	3688,9 ± 272,0
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	4492,2 ± 344,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	78,3 ± 60,8
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	2068,5 ± 465,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	3745,7 ± 541,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	815,4 ± 387,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	3285,9 ± 227,3

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 27**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	252,3 ± 185,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	3463,9 ± 1025,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1589,1 ± 0

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	1849,9 ± 903,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 30**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	411,3 ± 307,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	2144,2 ± 2144,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2886,5 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	661,8 ± 490,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 35**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	633,5 ± 473,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	996,8 ± 771,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 40**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	369,5 ± 369,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	375,6 ± 375,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 55**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

EXEMPLO 13: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 PREVINEM O CRESCIMENTO DE TUMORES QUE EXPRESSAM BCMA (MOLP-8) DE UMA FORMA DEPENDENTE DE DOSE EM UM MODELO DE TUMOR XENOGÊNICO *IN VIVO*

[00200] Para determinar a eficácia *in vivo* de anticorpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, foi realizado um estudo de tumor xenogênico. Camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) foram implantados subcutaneamente com uma mistura de 5x10^6 células tumorais de mieloma múltiplo humano que expressam BCMA MOLP-8 e 1x10^6 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) isoladas de um doador saudável normal. Os camundongos (n=7 por grupo) foram então imediatamente administrados com um controle de veículo PBS, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 4 mg/kg, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G20; REGN4460) a uma dose de 4 mg/kg, um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) em doses de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg, ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G20; REGN5459) em doses de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos foram administrados estes Abs duas vezes por semana para um total de sete doses, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo de 56 dias. Enquanto os tumores BCMA$^+$ MOLP-8 cresceram de forma semelhante nos camundongos tratados com veículo e controle de ligação a CD3, ambos os Abs BCMAxCD3 que foram testados preveniram o crescimento de tumores de uma maneira dependente da dose *in vivo*.

[00201] *Implantação e medição de tumores xenogênicos:* camundongos NSG foram implantados por via subcutânea com uma mistura de 5x10^6 células de mieloma múltiplo MOLP-8 que expressam BCMA e 1x10^6 PBMC derivadas de um doador normal e saudável. Os camundongos (n = 7 por grupo) foram imediatamente administrados

com um controle de veículo PBS, um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D), um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G20; REGN4460), um BCMAxCD3 (G; REGN5458) Ab biespecífico, ou um Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459). mAb17664D e REGN4460 foram administrados em 4 mg/kg, enquanto REGN5458 e REGN5459 foram administrados em 4 mg/kg, 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos receberam Abs duas vezes por semana para um total de sete doses. O crescimento do tumor foi medido por calibrador duas vezes por semana durante a experiência.

[00202] *Cálculo do crescimento e inibição do tumor xenogênico*: Para determinar o volume do tumor por compasso externo, foram determinados o maior diâmetro longitudinal (comprimento em mm) e o maior diâmetro transversal (largura em mm). Os volumes do tumor com base nas medições do calibrador foram calculados pela fórmula: Volume (mm^3) = (comprimento x largura^2)/2.

[00203] Os anticorpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 impediram o crescimento de tumores $BCMA^+$ MOLP-8 de uma maneira dependente da dose neste modelo de tumor xenogênico *in vivo*. Os resultados são mostrados na Tabela 21, abaixo, e ilustrados nas Figuras 5 e 6.

TABELA 21: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 3**
PBS (controle do veículo)	10,3 ± 3,0
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	11,6 ± 2,0
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	14,1 ± 3,9

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	12,5 ± 1,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	13,5 ± 1,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	9,3 ± 2,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	12,9 ± 1,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	14,0 ± 1,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	11,7 ± 2,1

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 7**
PBS (controle do veículo)	73,4 ± 13,5
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	50,0 ± 6,6
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	45,7 ± 6,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	18,3 ± 5,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0,6 ± 0,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	37,0 ± 5,7

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 10**
PBS (controle do veículo)	249,9 ± 47,6
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	125,0 ± 6,8
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	173,9 ± 99
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	73,9 ± 25,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	104 ± 23,0

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 14**
PBS (controle do veículo)	677,0 ± 62,7
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	530,0 ± 44,6
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	549,1 ± 59,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	255,4 ± 79,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	356,7 ± 84,6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 17**
PBS (controle do veículo)	1349,5 ± 149,7
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	935,3 ± 71,3
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	1027,1 ± 86,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	14,5 ± 7,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,7 ± 1,7

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	494,3 ± 144,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	645,6 ± 140,9

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 21**
PBS (controle do veículo)	2990,9 ± 291,7
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	2249,6 ± 113,5
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	2473,4 ± 170,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	102,7 ± 66,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,3 ± 5,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1373,0 ± 366,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	1442,4 ± 310,7

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 23**
PBS (controle do veículo)	4155,1 ± 401,8
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	3288,4 ± 204,6
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	3592,7 ± 224,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	193,3 ± 117,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	9,7 ± 9,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1882,3 ± 551,5

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	2124,4 ± 444,1

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 28**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	627,4 ± 318,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	47,4 ± 47,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2542,5 ± 613,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	1,9 ± 1,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	1939,3 ± 840,6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 31**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1018,5 ± 498,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	104,7 ± 92,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2906,1 ± 532,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	3,8 ± 3,0

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	2688,7 ± 1176,6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 35**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1342,9 ± 629,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	375,1 ± 307,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	3538,0 ± 0,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	9,3 ± 7,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	612,1 ± 0

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 42**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	2363,0 ± 890,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	968,8 ± 689,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	12,8 ± 12,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 49**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1683,5 ± 1683,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	Sem Gravação
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	Sem Gravação
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	Sem Gravação
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 56**
PBS (controle do veículo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN4460 (Controle de ligação de CD3-G20) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	3108,1 ± 3108,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1742,4 ± 635,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	17,2 ± 17,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animais Eutanasiados

EXEMPLO 14: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 ATRASAM O CRESCIMENTO DE TUMORES QUE EXPRESSAM BCMA (MOLP-8) EM UM MODELO DE TUMOR *IN VIVO* XENOGRÁFICO

[00204] Para determinar a eficácia in vivo de anticorpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, foi realizado um estudo de tumor xenogênico. No dia -11, camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) foram injetados intraperitonealmente com 4x10^6 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) de um doador normal e saudável. No dia 0, os camundongos foram administrados por via intravenosa com 2x10^6 células tumorais de mieloma múltiplo humano de BCMA$^+$ MOLP-8 que foram geneticamente modificadas para também expressar luciferase de vagalume (células MOLP-8-luciferase). Os camundongos (n = 5 por grupo) foram então imediatamente administrados com um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 4 mg/kg ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) a uma dose de 4 mg/kg. Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 3 e 7, para um total de três doses. O crescimento do tumor foi avaliado ao longo de 48 dias medindo a bioluminescência do tumor (BLI) em animais anestesiados. Como um controle positivo, um grupo de camundongos (n = 5) recebeu apenas células MOLP-8-luciferase, mas não PBMC ou anticorpo. A fim de medir os níveis de fundo de BLI, um grupo de camundongos (n = 5) não foi tratado e não recebeu tumores, PBMC ou anticorpo. Enquanto os tumores BCMA$^+$ MOLP-8-luciferase cresceram progressivamente nos camundongos tratados com controle de ligação a CD3, o tratamento com BCMAxCD3 Ab com REGN5458 atrasou o crescimento de tumores *in vivo*.

[00205] *Implantação e medição de tumores xenogênicos:* No dia -11, camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)

foram injetados intraperitonealmente com $5x10^6$ PBMC humano de um doador normal e saudável. No dia 0, os camundongos foram administrados por via intravenosa com $2x10^6$ células $BCMA^+$ MOLP-8-luciferase. Os camundongos (n = 5 por grupo) foram então imediatamente administrados com um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 4 mg/kg ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) a uma dose de 4 mg/kg. Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 3 e 7, para um total de três doses. O crescimento do tumor foi avaliado ao longo de 48 dias medindo o BLI do tumor em animais anestesiados. Como um controle positivo, um grupo de camundongos (n = 5) recebeu apenas células MOLP-8-luciferase, mas não PBMC ou anticorpo. A fim de medir os níveis de fundo de BLI, um grupo de camundongos (n = 5) não foi tratado e não recebeu tumores, PBMC ou anticorpo.

[00206] *Medição do crescimento do tumor xenogênico:* o imageamento de BLI foi usado para medir a carga do tumor. Os camundongos foram injetados IP com 150 mg/kg do substrato de luciferase D-luciferina suspenso em PBS. Cinco minutos após esta injeção, a imagem BLI dos camundongos foi realizada sob anestesia com isoflurano usando o sistema Xenogen IVIS. A aquisição das imagens foi realizada com o campo de visão em D, altura do indivíduo de 1,5 cm e nível de binning médio com tempo de exposição automático determinado pelo Living Image Software. Os sinais BLI foram extraídos usando o software Living Image: as regiões de interesse foram desenhadas ao redor de cada massa tumoral e as intensidades dos fótons foram registradas como p/s/cm2/sr.

[00207] O anticorpo biespecífico anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 atrasou o crescimento de tumores de $BCMA^+$ MOLP-8-luciferase neste modelo de tumor xenogênico *in vivo*. Os resultados são mostrados na Tabela 22, abaixo.

TABELA 22: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR (POR RADIÂNCIA) EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 8 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	4,93E+05 ± 1,66E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	5,73E+05±5,27E+04
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	6,08E+05±5,16E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	5,66E+05 ± 1,97E+04

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 15 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	5,37E+05 ± 1,46E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	1,24E+06 ± 9,67E+04
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	1,61E+06 ± 9,64E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	5,28E+05 ± 4,13E+04

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 22 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	7,00E+05 ± 1,03E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	1,23E+07 ± 1,02E+06
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	1,98E+07 ± 8,86E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,08E+06 ± 1,71E+05

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 24 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	5,24E+05 ± 1,86E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	1,56E+07 ± 1,29E+06
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	5,26E+07 ± 1,91E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,02E+06 ± 1,99E+05

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 28 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	7,09E+05 ± 2,28E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	3,01E+07 ± 4,78E+06
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	5,69E+07 ± 2,77E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	3,56E+06 ± 6,34E+05

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 30 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,44E+05 ± 4,56E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	6,92E+06 ± 1,40E+06

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 34 dias**

	pós-implantação (média ± SEM)
Sem tumor (fundo BLI)	7,78E+05 ± 3,02E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	2,65E+07 ± 1,36E+07

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 37 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	7,59E+05 ± 2,96E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	4,52E+07 ± 1,40E+07

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 43 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,26E+05 ± 4,18E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,06E+08 ± 3,43E+07

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 48 dias pós-implantação (média ± SEM)**

Sem tumor (fundo BLI)	8,24E+05 ± 1,73E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	3,22E+08 ± 1,27E+08

EXEMPLO 15: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 REDUZEM CARGAS DE TUMOR (OPM-2) PARA NÍVEIS DE FUNDO *IN VIVO*

[00208] Para determinar a eficácia *in vivo* de anticorpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, foi realizado um estudo de tumor xenogênico. No dia 0, camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) foram administrados por via intravenosa $2x10^6$ BCMA$^+$ OPM-2 células tumorais de mieloma múltiplo humano que foram geneticamente modificadas para também expressar luciferase de vagalume (células OPM-2-luciferase). No dia 10, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com $4x10^6$ células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) de um doador normal e saudável. No dia 21, os camundongos (n=5 por grupo) receberam um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 0,4 mg/kg, um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) a 0,4 mg/kg, ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a 0,4 mg/kg. Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 25 e 28, para um total de três doses. O crescimento do tumor foi avaliado ao longo do dia 61 medindo a bioluminescência do tumor (BLI) em animais anestesiados. Como um controle positivo, um grupo de camundongos (n = 5) recebeu apenas células OPM-2-luciferase, mas não PBMC ou anticorpo. A fim de medir os níveis de fundo de BLI, um grupo de camundongos (n = 5) não foi tratado e não recebeu tumores, PBMC ou anticorpo. Enquanto os tumores BCMA$^+$ OPM-2-luciferase cresceram progressivamente nos camundongos tratados com controle

de ligação de CD3, o tratamento com BCMAxCD3 Ab com REGN5458 e REGN5459 reduziu a carga tumoral para níveis de fundo na maioria dos animais.

[00209] *Implantação e medição de tumores xenogênicos:* No dia 0, camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) receberam por via intravenosa 2x10^6 células tumorais de mieloma múltiplo humano BCMA$^+$ OPM-2 que foram geneticamente modificadas para também expressar luciferase de vagalume (células OPM-2-luciferase). No dia 10, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 4x10^6 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) de um doador normal e saudável. No dia 21, os camundongos (n=5 por grupo) receberam um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 0,4 mg/kg, um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) a 0,4 mg/kg, ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a 0,4 mg/kg. Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 25 e 28, para um total de três doses. O crescimento do tumor foi avaliado ao longo do dia 61 medindo a bioluminescência do tumor (BLI) em animais anestesiados. Como um controle positivo, um grupo de camundongos (n = 5) recebeu apenas células OPM-2-luciferase, mas não PBMC ou anticorpo. A fim de medir os níveis de fundo de BLI, um grupo de camundongos (n = 5) não foi tratado e não recebeu tumores, PBMC ou anticorpo.

[00210] *Medição do crescimento do tumor xenogênico: a* imagem BLI foi usada para medir a carga do tumor. Os camundongos foram injetados IP com 150 mg/kg do substrato de luciferase D-luciferina suspenso em PBS. Cinco minutos após esta injeção, a imagem BLI dos camundongos foi realizada sob anestesia com isoflurano usando o sistema Xenogen IVIS. A aquisição das imagens foi realizada com o campo de visão em D, altura do indivíduo de 1,5 cm e nível de binning

médio com tempo de exposição automático determinado pelo Living Image Software. Os sinais BLI foram extraídos usando o software Living Image: as regiões de interesse foram desenhadas ao redor de cada massa tumoral e as intensidades dos fótons foram registradas como p/s/cm2/sr.

[00211] Enquanto os tumores $BCMA^+$ OPM-2-luciferase cresceram progressivamente nos camundongos tratados com controle de ligação de CD3, o tratamento com BCMAxCD3 Ab com REGN5458 e REGN5459 reduziu a carga tumoral para níveis de fundo na maioria dos animais. Os resultados são mostrados na Tabela 23, abaixo, e ilustrados na Figura 7.

TABELA 23: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR (POR RADIÂNCIA) EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 5 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,22E+05 ± 2,77E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	5,62E+05 ± 2,75E+04
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	5,73E+05 ± 3,02E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,87E+05 ± 2,40E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	5,09E+05 ± 3,56E+04

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 11 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,90E+05 ± 3,64E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	6,22E+05 ± 3,34E+04
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	6,25E+05 ± 3,80E+04

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	6,19E+05 ± 4,39E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	6,45E+05 ± 2,39E+04

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 20 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	7,59E+05 ± 5,82E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	2,32E+06 ± 2,94E+05
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	2,36E+06 ± 5,46E+05
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,81E+06 ± 2,37E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	2,13E+06 ± 1,69E+05

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 26 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	5,51E+05 ± 2,51E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	5,96E+06 ± 8,74E+05
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	6,05E+06 ± 1,32E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,73E+06 ± 8,69E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	1,28E+06 ± 7,36E+05

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 31 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,62E+05 ± 3,35E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	1,58E+07 ± 4,84E+06
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	1,35E+07 ± 2,35E+06

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	3,50E+06 ± 2,42E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	1,98E+06 ± 1,36E+06

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 34 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	4,57E+05 ± 1,04E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	3,36E+07 ± 1,27E+07
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	2,35E+07 ± 5,72E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	4,85E+06 ± 3,24E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	4,24E+06 ± 3,69E+06
Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 38 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,60E+05 ± 3,13E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	3,91E+07 ± 6,87E+06
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	4,84E+07 ± 1,65E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,30E+06 ± 3,44E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	3,21E+06 ± 2,52E+06

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 40 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	5,39E+05 ± 9,67E+03
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animais Eutanasiados

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,06E+06 ± 3,36E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	3,84E+06 ± 3,34E+06

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 47 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	7,73E+05 ± 1,91E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	7,76E+05 ± 7,85E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	7,34E+05 ± 2,62E+04

Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 54 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animais Eutanasiados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,78E+05 ± 1,15E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	6,41E+05 ± 5,96E+04
Tratamento de Anticorpo	**Radiância [p/s/cm2²/sr] 61 dias pós-implantação (média ± SEM)**
Sem tumor (fundo BLI)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Sem PBMC/Anticorpo (controle positivo)	Animais Eutanasiados
mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animais Eutanasiados

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,23E+05 ± 4,10E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	6,03E+05 ± 5,29E+04

EXEMPLO 16: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS BCMAXCD3 SUPRIMEM O CRESCIMENTO DE TUMORES SINGÊNICOS *IN VIVO* DE UMA FORMA DEPENDENTE DE DOSE

[00212] Para determinar a eficácia *in vivo* de anticorpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, um estudo de tumor singênico foi realizado em camundongos que expressam CD3 humano. Os camundongos C57BL/6 que expressam CD3deg humano no lugar de CD3deg murino (camundongos humanizados com CD3) foram implantados subcutaneamente com $0,5x10^6$ células de melanoma B16 que foram projetadas para expressar BCMA humano de comprimento total (células B16/BCMA) ou $1x10^6$ células de carcinoma do cólon MC38 que foram geneticamente modificadas para expressar BCMA humano de comprimento total (MC38/BCMA). Os camundongos (n = 7 por grupo) foram então imediatamente administrados com um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 0,4 mg/kg ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) em doses de 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 4 e 7 para um total de três doses, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo do experimento. Enquanto os tumores B16/BCMA e os tumores MC38/BCMA cresceram nos camundongos tratados com controle de ligação de CD3, BCMAxCD3 REGN5458 foi capaz de suprimir o crescimento de ambas as linhagens de tumor de uma maneira dependente da dose *in vivo*.

[00213] *Implantação e medição de tumores singênicos:* camundongos C57BL/6 que expressam CD3deg humano no lugar de CD3deg murino (camundongos humanizados CD3) foram implantados subcutaneamente com $0,5x10^6$ células de melanoma B16F10 que foram projetadas para expressar BCMA humano de comprimento total

(B16/Células BCMA) ou $1x10^6$ células de carcinoma do cólon MC38 que foram geneticamente modificadas para expressar BCMA humano de comprimento total (MC38/BCMA). Os camundongos (n = 7 por grupo) foram então imediatamente administrados com um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; mAb17664D) a uma dose de 0,4 mg/kg ou um Ab biespecífico de BCMAxCD3 (G; REGN5458) em doses de 0,4 mg/kg ou 0,04 mg/kg. Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 4 e 7 para um total de três doses, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo do experimento.

[00214] *Cálculo de crescimento e inibição de tumor singênico*: A fim de determinar o volume do tumor com um compasso externo, o maior diâmetro longitudinal (comprimento em mm) e o maior diâmetro transversal (largura em mm) foram determinados. Os volumes do tumor com base nas medições do calibrador foram calculados pela fórmula: Volume (mm^3) = (comprimento x largura^2)/2.

[00215] Enquanto os tumores B16/BCMA e os tumores MC38/BCMA cresceram nos camundongos tratados com controle de ligação de CD3, BCMAxCD3 REGN5458 foi capaz de suprimir o crescimento de ambas as linhagens de tumor de uma maneira dependente da dose *in vivo*. Os resultados são mostrados na Tabela 24, abaixo.

TABELA 24: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 5**
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	25,6 ± 2,7
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0,0 ± 0,0
Tumor B16/BCMA	3,3 ± 2,2

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	29,3 ± 4,4
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,4 ± 1,4
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	11,9 ± 2,9

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 10**
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	179,2 ± 30,6
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0,0 ± 0,0
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	15,4 ± 12,5
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	123,1 ± 14,6
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0,0 ± 0,0
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	66,7 ± 22,5

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 14**
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	763,1 ± 156,2

Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	8,1 ± 4,4
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	81,4 ± 49,2
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	477,1 ± 77,1
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	2,9 ± 2,9
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	273,3 ± 115,3

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 18**
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	2068,9 ± 357,7
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	47,1 ± 17,0
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	127,2 ± 63,9
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Controle de ligação de CD3-G) - 0,4 mg/kg	1432,5 ± 231,6
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	7,5 ± 7,5
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	641,5 ± 309,8

EXEMPLO 17: MAPEAMENTO DE EPÍTOPO DE LIGAÇÃO REGN5458 A BCMA POR TROCA DE HIDROGÊNIO E DEUTÉRIO

[00216] O mapeamento de epítopo de troca H/D com espectrometria de massa (HDX-MS) foi realizado para determinar os resíduos de

aminoácidos de BCMA (BCMA humano recombinante, sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115) interagindo com REGN5458 (anticorpo biespecífico BCMA x CD3). Uma descrição geral do método de troca de H/D é apresentada em, por exemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252 a 259; e Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A a 265A.

[00217] Os experimentos de HDX-MS foram realizados em uma plataforma HDX/MS integrada, consistindo em um sistema Leaptec HDX PAL para a marcação e extinção de deutério, um Waters Acquity M-Class (gerenciador de solvente auxiliar) para a digestão e carregamento de amostras, um Waters Acquity Classe M (gerenciador de solvente µBinary) para o gradiente analítico e espectrômetro de massa Thermo Q Exactive HF para medição de massa de peptídeo.

[00218] A solução de marcação foi preparada como tampão PBS em D_2O a pD 7,0 (tampão fosfato a 10 mM, NaCl a 140 mM e KCl a 3 mM, equivalente a pH 7,4 a 25°C). Para a marcação de deutério, 10 µl de hBCMA.hFc (REGN2746, 54,5 µM; SEQ ID NO: 120 ou hBCMA.hFc pré-misturado com REGN5458 na razão molar de 1:2 (complexo Ag-Ab) foi incubado a 20 °C com 90 µl de solução de rotulagem D_2O para vários pontos de tempo em duplicatas (por exemplo, controle não deuterado = 0 segundo; rotulado com deutério por 5 minutos e 10 minutos). A reação de deuteração foi extinta pela adição de 100 µl de tampão de extinção pré-resfriado (TCEP-HCl a 0,5 M, ureia a 8 M e 1% de ácido fórmico) a cada amostra para uma incubação de 5 minutos a 20°C. A amostra arrefecida bruscamente foi, então, injetada em um Gerenciador de HDX de Waters para digestão de pepsina/protease XIII online. Os peptídeos digeridos foram separados por uma coluna C8 (1,0 mm x 50 mm, NovaBioassays) com um gradiente de 13 minutos de 10% a 32% B (fase móvel A: 0,5% de ácido fórmico em água, fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). Os peptídeos eluídos foram analisados por uma

espectrometria de massa de Thermo Q Exactive HF no modo LC-MS/MS ou LC-MS.

[00219] Os dados LC-MS/MS da amostra de BCMA não deuterada foram pesquisados em um banco de dados incluindo BCMA e sua sequência aleatória usando mecanismo de busca Byonic (Protein Metrics). Os parâmetros de pesquisa (em ELN) foram definidos como padrão usando digestão enzimática não específica e glicosilação humana como modificação de variável comum. A lista de peptídeos identificados foi então importada para o software HDX Workbench (versão 3.3) para calcular a absorção de deutério de cada peptídeo detectado por LC-MS de todas as amostras deuteradas. Para um determinado peptídeo, a massa centroide (massa média ponderada por intensidade) em cada ponto de tempo foi usada para calcular a absorção de deutério (D) e a porcentagem de absorção de deutério (% D):

Absorção de deutério (absorção D)	=	Massa média (deuterada) - Massa média (não deuterada)
Porcentagem de absorção de deutério (%D)	=	Absorção de deutério para peptídeo em cada ponto de tempo X 100% / Máxima absorção de D do peptídeo (definido em ELN)

[00220] Um total de 8 peptídeos de hBCMA.hFc foram identificados a partir de hBCMA.hFc sozinho e hBCMA.hFc em complexo com amostras REGN5458, representando 100% de cobertura de sequência de hBCMA. O desvio-padrão médio (DP) de todos os peptídeos foi avaliado em 1,4% (cálculos detalhados foram definidos em ELN e Pascal, BD et al (2012) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23(9):1.512 a 1.521). Portanto, qualquer peptídeo que exibiu uma percentagem diferencial de valores de absorção de D acima de 4,2% (3 vezes do SD médio) foi definido como significativamente

protegido. Para hBCMA.hFc, os peptídeos correspondentes aos aminoácidos 1-43 da SEQ ID NO: 106 (MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNA; SEQ ID NO: 121) foram significativamente protegidos por REGN5458. A proteção destes resíduos por REGN5458 foi confirmada usando hBCMA.mmH (REGN2744, sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 106).

TABELA 25: PEPTÍDEOS BCMA.HFC SELECIONADOS COM PROTEÇÃO SIGNIFICATIVA APÓS A LIGAÇÃO A REGN5458

Resíduos BCMA	5 min			10 min			-hFc
	REGN2746	REGN2746 + REGN5458		REGN2746	REGN2746 + REGN5458		
	MH^+ centroide	MH^+ centroide	ΔD	MH^+ centroide	MH^+ centroide	ΔD	Δ%D
1 a 28	3217,16	3212,39	-4,77	3218,05	3212,62	-5,43	-25,2
4 a 26	2582,03	2577,26	-4,77	2582,71	2577,45	-5,26	-31
27 a 43	1921,75	1920,69	-1,06	1922,1	1920,83	-1,27	-11,1

EXEMPLO 18: ENSAIO DE LIGAÇÃO FACS DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS BCMAXCD3 E ANTICORPOS BCMA ADICIONAIS EM LINHAGENS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLO APÓS INCUBAÇÃO NOTURNA COM ANTICORPOS ANTI-BCMA

[00221] A análise de citometria de fluxo foi utilizada para determinar o impacto da incubação durante a noite de linhagens celulares de mieloma múltiplo com anticorpos anti-BCMA no nível de BCMA de superfície. Linhagens celulares MM (H929, Molp8, U266 e MM1.S) foram lavadas duas vezes e cultivadas a 37 °C em meio R10 (RPMI + 10% FBS+pen/strep/glut) contendo 66,7 ou 667 nM de anticorpos anti-BCMA, DAPT (um inibidor da gama-secretase) ou apenas meio. Após 18 horas, os poços foram lavados com lavagem FACS fria (PBS + FBS filtrado a 1%) e ressuspensos em 667 nM do mesmo anticorpo anti-BCMA em tampão de coloração frio (Miltenyi 130-091-221) por 30 minutos em gelo. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com lavagem FACS fria (PBS + 1% FBS filtrado) e o anticorpo

ligado foi detectado por incubação com o anticorpo secundário anti-humano apropriado (anti-hIgG ou anti-HIS) em gelo por mais 30 a 45 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em 200 µl de PBS gelado contendo 1% de FBS filtrado e analisadas por citometria de fluxo em um BD FACS Canto II. O aumento de vezes na coloração foi calculado dividindo o MFI de células coradas previamente incubadas durante a noite em BCMA abs ou DAPT pelo MFI de células coradas que foram incubadas durante a noite apenas em meio.

[00222] O BCMA é rapidamente clivado da superfície das células pela enzima gama-secretase. A incubação durante a noite com os inibidores de gama-secretase, como DAPT, evita a clivagem de BCMA, resultando em níveis aumentados de BCMA na superfície celular. As Tabelas 26 a 29 relatam o aumento de vezes na intensidade mediana de fluorescência (MFI) de BCMA em células incubadas durante a noite em anticorpos anti-BCMA ou DAPT em comparação com células incubadas apenas em meio. Observamos que a incubação durante a noite com DAPT aumentou os níveis de BCMA detectados por anticorpos anti-BCMA (BCMAxCD3 biespecífico R5458, o anticorpo BCMA parental mAb15281 e outros anticorpos BCMA internos) em H929, Molp8, U266 e MM.1S, 2,3 a 4 vezes, 2,4 a 8,6 vezes, 5,3 a 9,0 vezes e 11,9 vezes, respectivamente.

[00223] De modo importante, também observamos que a incubação durante a noite de linhagens de células MM com 66,7 ou 667 nM REGN5458 ou o anticorpo anti-BCMA parental bivalente mAb21581 resultou de forma semelhante em níveis aumentados de BCMA de superfície detectado por FACS, sugerindo que a ligação de anticorpos anti-BCMA evita a clivagem de BCMA por gama-secretase. Os aumentos induzidos por anticorpos em BCMA de superfície diferiam por linhagem celular, com aumentos maiores nas células Molp8 e MM1S em comparação com H929 ou U266. O fenômeno não se limitou ao

REGN5458, como também foi observado com outros anticorpos BCMA internos.

TABELA 26: MUDANÇA DE DOBRA DE MFI SOBRE CÉLULAS INCUBADAS APENAS EM MEIO (NCI-H929)

NCI-H929		67 nM		667 nM		DAPT	
		Média	n	Média	n	Média	n
mAb21581	aBCMA (parental de R5458)	1,2	5	1,4	3	3,5	6
REGN5458	BCMAxCD3	2,0	3	3,0	1	4,0	3
mAb16749	aBCMA	1,0	2	0,8	1	2,3	3
mAb16711	aBCMA	2,8	2	2,1	1	3,8	3
mAb16747	aBCMA	1,8	2	2,1	1	3,9	3
REGN960	scFv IsoC	1,0	2	1,1	1	1,1	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,0	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1,3	2	1,0	1	1,1	3

TABELA 27: MUDANÇA DE DOBRA DE MFI SOBRE CÉLULAS INCUBADAS APENAS EM MEIO (MOLP8)

Molp8		67 nM		667 nM		DAPT	
		Média	n	Média	n	Média	n
mAb21581	aBCMA (parental de R5458)	2,3	5	3,7	3	6,3	6
REGN5458	BCMAxCD3	2,3	3	4,5	1	8,6	3
mAb16749	aBCMA	1,1	2	3,4	1	4,0	3
mAb16711	aBCMA	3,5	2	3,0	1	5,1	3
mAb16747	aBCMA	2,2	2	0,6	1	6,2	3
REGN960	scFv IsoC	1,1	2	1,0	1	1,0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,3	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	0,9	2	1,2	1	1,0	3

U266		67 nM		667 nM		DAPT	
		Média	n	Média	n	Média	n
mAb21581	aBCMA (parental de R5458)	1,8	2	2,3	1	6,7	6
REGN5458	BCMAxCD3	1,4	2	2,3	1	9,0	3
mAb16749	aBCMA	1,3	2	1,2	1	5,3	3

mAb16711	aBCMA	2,2	2	2,2	1	7,2	3
mAb16747	aBCMA	1,5	2	1,7	1	8,3	3
REGN960	scFv IsoC	1,0	2	1,0	1	1,0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,1	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1,1	2	1,1	1	1,4	3

TABELA 29: MUDANÇA DE DOBRA DE MFI SOBRE CÉLULAS INCUBADAS APENAS EM MEIO (MM1S)

MM1S		67 nM		667 nM		DAPT	
		Média	n	Média	n	Média	n
mAb21581	aBCMA (parental de R5458)	7,3	2	7,0	2	11,9	2

EXEMPLO 19: MORTE MEDIADA POR CÉLULAS T AUTÓLOGAS DE CÉLULAS DE PLASMA HUMANAS E DE MACACO CINOMOLGO NA PRESENÇA DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS BCMAXCD3

[00224] A morte específica de células plasmáticas humanas ou de macaco cinomolgo de $CD138^+$ enriquecidas por células T autólogas não estimuladas foi avaliada por citometria de fluxo. Aspirados de medula óssea humana ou de cinomolgo e sangue foram fornecidos dentro de 24 horas após a colheita. As células plasmáticas $CD138^+$ foram enriquecidas a partir da medula óssea por seleção positiva usando o kit EasySep Human $CD138^+$ Positive Selection de acordo com as instruções do fabricante. PBMC de sangue total foram isolados por separação por densidade. PBMC foram marcados com 1 µM de corante de rastreamento fluorescente Vybrant CFDA-SE. Após a marcação, $1x10^4$ de células plasmáticas $CD138^+$ enriquecidas foram colocadas em placas em de fundo redondo de placas de 96 poços a uma razão E:T de 10:1 com Vybrant CFDA-SE marcado PBMC e diluições em série de REGN5458, BsAb de controle de ligação a CD3 ou mAb de controle de ligação a BCMA por 72 horas a 37 °C em meio completo. No final da cultura, as células plasmáticas $CD138^+$ sobreviventes foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando corante LIVE/DEAD fixável e

marcadores de superfície celular específicos para células plasmáticas. A viabilidade percentual foi normalizada para a condição de controle (células plasmáticas na presença de PBMC apenas). A ativação de células T foi avaliada por citometria de fluxo. A ativação é relatada como a porcentagem de células T $CD2^+/CD4^+$ ou $CD2^+/CD8^+/CD16^-$ expressando CD25. A porcentagem de ativação de células T foi normalizada para a condição de controle (células plasmáticas na presença de PBMC apenas).

[00225] Estudos *in vitro* avaliaram o efeito de REGN5458 ou controles negativos (mAb de controle de ligação a BCMA ou bsAb de controle de ligação a CD3) na ativação de células T primárias humanas e de macaco cinomolgo e na citotoxicidade de células plasmáticas autólogas. Os valores de EC_{50} para citotoxicidade e a porcentagem de ativação de células T para cada doador estão resumidos na Tabela 30.

[00226] REGN5458 mediou a citotoxicidade de células plasmáticas primárias humanas de doadores 1 e 2 na presença de células T autólogas de uma maneira dependente da concentração com valores de EC_{50} de 42,8 pM e 191 pM, respectivamente, e resultou em uma citotoxicidade percentual máxima de 91% e 89%, respectivamente. Em paralelo, REGN5458 mediou a ativação de células T na presença de células plasmáticas humanas dos doadores 1 e 2 de maneira dependente da concentração com valores de EC_{50} de 214 pM e 860 pM para ativação de células T $CD8^+$, respectivamente, e porcentagem máxima de ativação de células T $CD8^+$ de 2 % e 36%, respectivamente. A citotoxicidade das células plasmáticas em ambos os doadores e a ativação de células T $CD8^+$ aumentada no doador 2 foram observadas apenas em concentrações nanomolares de controle de ligação a CD3. Nenhum efeito sobre a citotoxicidade ou ativação de células T foi observado com o controle de ligação de BCMA em qualquer uma das concentrações testadas em qualquer um dos doadores.

[00227] Citotoxicidade mediada por REGN5458 de células plasmáticas de cinomolgo primárias em ambos os doadores de uma maneira dependente da concentração; uma EC_{50} de 1,31 nM foi calculada para o doador 1, no entanto, uma EC_{50} não pode ser determinada para o doador 2. Em ambos os doadores, o tratamento com REGN5458 resultou no aumento da citotoxicidade das células plasmáticas (citotoxicidade percentual máxima de 94% e 91% para os doadores 1 e 2, respectivamente). Em paralelo, REGN5458 mediou a ativação de células T na presença de células plasmáticas de macaco cynomolgus dos doadores 1 e 2 de uma forma dependente da concentração com valores de EC50 de 28,1 nM e 18,1 nM para ativação de células T $CD4^+$ e 22,4 nM e 76,7 nM para ativação de células T $CD8^+$, respectivamente. A ativação máxima de células T percentual resultante foi de 9% e 16% para células T $CD4^+$ e 12% e 17% de células T $CD8^+$ para doadores 1 e 2, respectivamente.

[00228] Nenhuma morte de células-alvo foi observada com o controle de ligação a BCMA em nenhuma concentração testada em qualquer uma das linhagens celulares avaliadas. Algumas mortes de células-alvo e ativação de células T na presença de células plasmáticas do doador 2 foram observadas com controle de ligação de CD3 em concentrações nanomolares.

TABELA 30: VALORES DE EC_{50} PARA CITOTOXICIDADE E PORCENTAGEM DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T PARA CADA DOADOR

Linhagens celulares		Morte citotóxica		Ativação de Células T (% de Regulação positiva de CD25)			
				Células T $CD4^+$		Células T $CD8^+$	
Células Efetoras	Célula-alvo	EC_{50} (M)	% de Citotoxicidade Máxima	EC_{50} (M)	% de Ativação	EC_{50} (M)	% de Ativação
Células T humanas primárias[a]	Células de plasma de doador humano 1	$4,28x10^{-11}$	91	NR	NR	$2,14x10^{-10}$	2
	Células de plasma de doador humano 2	$1,91x10^{-10}$	89	NR	NR	$8,60x10^{-10}$	36
Células T primárias do macaco cinomolgo[a]	Células plasmáticas de doador de macaco cinomolgo 1	$1,31x10^{-9}$	94	$2,81x10^{-8}$	9	$2,24x10^{-8}$	12
	Células plasmáticas de doador de macaco cinomolgo 2	ND	91	~$1,81x10^{-8}$	16	$7,67x10^{-8}$	17

[a]Células plasmáticas autólogas foram testadas para cada doador.

EXEMPLO 20: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 AGEM SINERGICAMENTE COM ANTICORPOS ANTI-PD-1 PARA AUMENTAR A EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VIVO*

[00229] Para determinar se os anticorpos biespecíficos BCMAxCD3 (Abs) sinergizam com o bloqueio de PD-1 para fornecer eficácia antitumoral superior *in vivo*, um estudo de tumor singênico foi realizado em camundongos que expressam CD3 humano. Os resultados demonstram que a combinação de REGN5458 mais o bloqueio de PD-1 fornece eficácia antitumoral superior do que o bloqueio de REGN5458 ou PD-1 sozinho.

[00230] *Implantação e medição de tumores singênicos*: camundongos C57BL/6 que expressam CD3deg humano no lugar de CD3deg murino (camundongos humanizados CD3) foram implantados subcutaneamente com $1x10^6$ de células de carcinoma do cólon MC38 que foram geneticamente modificadas para expressar BCMA humano de comprimento total (MC38/BCMA). Os tumores foram autorizados a se estabelecer por 3 dias, momento em que os camundongos (n = 6 ou 7 por grupo) receberam um Ab biespecífico de controle de ligação a CD3 (G; H4sH17664D) a uma dose de 0,4 mg/kg ou um BCMAxCD3 (G; REGN5458) Ab biespecífico em doses de 0,04 mg/kg ou 0,24 mg/kg, juntamente com um anticorpo PD-1 anti-camundongo substituto (Clone RPM1-14) a 4 mg/kg ou um Ab controle de isotipo (Clone 2A3) a 4 mg/kg. Os grupos de tratamento específicos são mostrados na Tabela 31, abaixo.

TABELA 31: GRUPOS DE TRATAMENTO

Grupo	Tratamento Biespecífico	Anticorpo	n
1	H4SH17664D (0,24 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	7

2	H4SH17664D (0,24 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	7
3	REGN5458 (0,04 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	7
4	REGN5458 (0,04 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	7
5	REGN5458 (0,24 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	6
6	REGN5458 (0,24 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	6

[00231] Os camundongos receberam estes Abs duas vezes mais nos dias 7 e 11 para um total de três doses, e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo do experimento.

[00232] *Cálculo de crescimento e inibição de tumor singênico*: A fim de determinar o volume do tumor com um compasso externo, o maior diâmetro longitudinal (comprimento) e o maior diâmetro transversal (largura) foram determinados. Os volumes do tumor com base nas medições do calibrador foram calculados pela fórmula: Volume (mm^3) = (comprimento x largura^2)/2.

[00233] Os resultados demonstram que a combinação de REGN5458 mais o bloqueio de PD-1 fornece eficácia antitumoral superior do que o bloqueio de REGN5458 ou PD-1 sozinho. Em particular, os resultados demonstram que no dia 24 (o último dia para o qual os dados foram coletados para todos os grupos de tratamento) a combinação de anticorpo biespecífico BCMAxCD3 e anticorpo anti-PD-1 produziu um efeito terapêutico sinérgico estatisticamente significativo na inibição do crescimento tumoral (Tabela 32, BCMAxCD3 a 0,04 mg/kg e anti-PD-1 a 4 mg/kg). Usando um teste ANOVA de 2 vias no dia 24, $p < 0,0001$ entre (i) REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo e a combinação de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticorpo anti-PD-1 (Grupo 3 versus Grupo 4), (ii) REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo e a combinação de REGN5458 (0,24 mg/kg) + anticorpo anti-PD-1 (Grupo 5 versus Grupo 6), (iii) anti-PD-1 e a combinação de REGN5458 (0,04 mg/kg) +

anticorpo anti-PD-1 (Grupo 2 versus Grupo 6). Usando um teste ANOVA de 2 vias no dia 24, p = 0,0005 entre anti-PD-1 e a combinação de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticorpo anti-PD-1 (Grupo 2 versus Grupo 4). O aumento da dose de anticorpo biespecífico BCMAxCD3 (0,24 mg/kg) em combinação com o bloqueio de PD-1 resultou na inibição do tumor comparável à dose de anticorpo biespecífico mais baixa mais o bloqueio de PD-1 neste experimento. A sinergia demonstrada com a dose mais baixa de anticorpo biespecífico é vantajosa porque o uso de uma dose mais baixa reduz o risco de quaisquer efeitos colaterais adversos. Da mesma forma, a combinação de anticorpo biespecífico BCMAxCD3 e anticorpo anti-PD-1 mostrou um efeito terapêutico sinérgico em ambas as doses de anticorpo biespecífico (0,04 mg/kg e 0,24 mg/kg) no número de camundongos livres de tumor no final do experimento (dia 28), como mostrado na Tabela 33.

TABELA 32: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 3**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg)	16,30 ± 1,50 n=7

+ Isotipo (4 mg/kg)	
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	14,34 ± 1,17 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	15,62 ± 1,61 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	19,20 ± 2,94 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	13,13 ± 3,12 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	20,41 ± 3,15 n=6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 7**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	55,78 ± 6,61 n=7
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	43,59 ± 8,32 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	37,98 ± 3,93 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	30,30 ± 6,47 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	29,27 ± 5,00 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	29,18 ± 3,65 n=6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 11**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	145,74 ± 21,37 n=7
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	45,33 ± 11,46 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	112,53 ± 17,39 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	8,81 ± 0,88 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	36,63 ± 14,89 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	12,99 ± 4,35 n=6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 14**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	414,28 ± 46,72 n=7
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	49,50 ± 17,02 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	438,16 ± 59,56 n=7

BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	6,86 ± 3,90 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	224,33 ± 47,04 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	22,75 ± 17,62 n=6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 18**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1035,43 ± 123,41 n=6
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	100,83 ± 41,62 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1040,12 ± 61,95 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	7,81 ± 7,81 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	515,15 ± 115,38 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	57,79 ± 43,62 n=6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 21**

Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1834,87 ± 639,56 n=2
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	208,29 ± 91,80 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2133,12 ± 129,26 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	21,13 ± 21,13 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1225,47 ± 289,39 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	113,69 ± 85,39 n=6

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 24**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2358,81 ± 0,00 n=1
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	534,03 ± 205,49 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	3648,37 ± 536,71 n=3
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	53,52 ± 53,52 n=7

BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1493,26 ± 973,01 n=2
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	54,29 ± 54,29 n=5

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 28**
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	Todos os animais eutanasiados n=0
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	1196,57 ± 467,34 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	Todos os animais eutanasiados n=0
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	141,68 ± 141,68 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1371,17 ± 0,00 n=1
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	104,44 ± 104,44 n=5

TABELA 33: CAMUNDONGOS SEM TUMOR NO FINAL DA EXPERIÊNCIA

Tratamento de Anticorpo	**Número de camundongos sem tumor no**

	final da experiência (dia 28)
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 7
Controle de ligação de CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	2 de 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	6 de 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	4 de 6

EXEMPLO 21: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 AGEM SINERGICAMENTE COM ANTICORPOS ANTI-PD-1 PARA AUMENTAR A EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VIVO*

[00234] Resultados semelhantes foram obtidos em um segundo experimento, idêntico ao discutido acima no Exemplo 20, exceto que o número de camundongos por grupo = 10, e a dose mais alta de BCMAxCD3 REGN5458 foi de 0,4 mg/kg. Os grupos de tratamento específicos para a segunda experiência são mostrados na Tabela 34, abaixo.

TABELA 34: GRUPOS DE TRATAMENTO

Grupo	Tratamento Biespecífico	Anticorpo	n
1	H4SH17664D (0,4	Isotipo (4 mg/kg)	10

	mg/kg)		
2	H4SH17664D (0,4 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	10
3	REGN5458 (0,04 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	10
4	REGN5458 (0,04 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	10
5	REGN5458 (0,4 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	10
6	REGN5458 (0,4 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	10

[00235] Os resultados demonstram que a combinação de REGN5458 mais o bloqueio de PD-1 fornece eficácia antitumoral superior do que o bloqueio de REGN5458 ou PD-1 sozinho. Em particular, os resultados demonstram que no dia 21 (o último dia para o qual os dados foram coletados para todos os grupos de tratamento) a combinação de anticorpo biespecífico BCMAxCD3 e anticorpo anti-PD-1 produziu um efeito terapêutico sinérgico na inibição do crescimento tumoral (Tabela 35, BCMAxCD3 a 0,04 mg/kg e anti-PD-1 a 4 mg/kg). Usando um teste ANOVA de 2 vias no dia 21, $p<0,0001$ entre (i) REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo e a combinação de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticorpo anti-PD-1 (Grupo 3 versus Grupo 4), (ii) anti-PD-1 e a combinação de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticorpo anti-PD-1 (Grupo 2 versus Grupo 4), (iii) anti-PD-1 e a combinação de REGN5458 (0,4 mg/kg) + anticorpo anti-PD-1 (Grupo 2 versus Grupo 6). Conforme discutido acima no Exemplo 20, o aumento da dose de anticorpo biespecífico BCMAxCD3 (0,4 mg/kg) em combinação com o bloqueio de PD-1 resultou na inibição do tumor comparável à dose de anticorpo biespecífico mais baixa combinada com o bloqueio de PD-1 neste experimento. A sinergia demonstrada com a dose mais baixa de anticorpo biespecífico é vantajosa porque o uso de uma dose mais baixa reduz o risco de quaisquer efeitos colaterais adversos. Da mesma forma, a combinação de anticorpo biespecífico BCMAxCD3 e anticorpo

anti-PD-1 mostrou um efeito terapêutico sinérgico em ambas as doses de anticorpo biespecífico (0,04 mg/kg e 0,4 mg/kg) no número de camundongos livres de tumor no final do experimento (dia 25), como mostrado na Tabela 36.

TABELA 35: TAMANHO MÉDIO DO TUMOR EM VÁRIOS PONTOS DE TEMPO

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 3**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	9,85 ± 0,61 n=10
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	13,44 ± 1,44 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	12,41 ± 2,56 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	9,73 ± 1,25 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	11,22 ± 0,68 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	9,59 ± 1,78 n=10

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 6**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	40,43 ± 4,07 n=10
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	44,52 ± 2,80 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg)	38,79 ± 3,52

+ Isotipo (4 mg/kg)	n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	36,42 ± 3,51 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	16,11 ± 1,27 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	24,34 ± 1,86 n=10

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 10**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	149,41 ± 17,08 n=10
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	107,34 ± 13,73 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	116,32 ± 19,99 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	23,48 ± 3,24 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	24,27 ± 6,74 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	3,60 ± 1,92 n=10

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 13**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	386,55 ± 48,49 n=10
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	186,87 ± 41,06 n=10

BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	319,91 ± 53,05 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	10,60 ± 2,34 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	50,93 ± 20,00 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	0,74 ± 0,74 n=10

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 18**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1809,29 ± 242,64 n=9
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	688,52 ± 152,20 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1314,27 ± 211,22 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	6,28 ± 4,55 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	248,51 ± 107,21 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	3,93 ± 2,67 n=10

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 21**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	3094,87 ± 482,38 n=8
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	1425,22 ± 338,49 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2446,35 ± 395,48 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	15,03 ± 10,35 n=10

BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	453,43 ± 174,75 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	9,34 ± 7,59 n=10

Tratamento de Anticorpo	**Tamanho médio do tumor (mm3) ± SEM no dia 25**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	Animais Eutanasiados n=0
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	1918,27 ± 571,19 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2411,64 ± 451,96 n=3
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	38,96 ± 21,47 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	661,70 ± 331,60 n=8
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	32,02 ± 24,67 n=10

TABELA 36: CAMUNDONGOS SEM TUMOR NO FINAL DO EXPERIMENTO

Tratamento de Anticorpo	**Número de camundongos sem tumor no final da experiência (dia 25)**
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 10
Controle de ligação a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	1 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg)	0 de 10

+ Isotipo (4 mg/kg)	
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	7 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueio de PD-1 (4 mg/kg)	8 de 10

[00236] A presente invenção não deve ser limitada quanto ao escopo pelas modalidades específicas descritas no presente documento. De fato, várias modificações da invenção além daquelas descritas no presente documento irão se tornar evidentes àqueles versados na técnica a partir da descrição supracitada. Tais modificações devem estar dentro do escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que especificamente se liga a um antígeno de maturação de células B humanas (BCMA) em uma célula de tumor-alvo, com uma EC_{50} de menos do que cerca de 100 nM como medida por um ensaio *in vitro* de ligação FACS; e

(b) um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao CD3 humano com uma EC_{50} inferior a cerca de 10^{-6} M, conforme medido por um ensaio *in vitro* de ligação FACS.

2. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico ativa células T *in vitro* com uma EC_{50} inferior a cerca de 10^{-9} M.

3. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico medeia a morte de células T *in vitro* de linhagens de células tumorais que expressam BCMA com uma EC_{50} inferior a cerca de 10^{-9} M.

4. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico medeia a morte de células T autólogas *in vitro* de células de mieloma primárias que expressam BCMA com uma EC_{50} inferior a cerca de 10^{-8} M.

5. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico interage com os resíduos de aminoácidos 1 a 43 de BCMA conforme estabelecido na SEQ ID NO:106.

6. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a célula tumoral-alvo é uma célula plasmática.

7. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a célula tumoral-alvo é de um paciente que sofre de mieloma múltiplo ou de outro distúrbio de células B definido em parte como tendo células B que expressam BCMA.

8. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico apresenta reação cruzada com BCMA de cinomolgo.

9. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico não apresenta reação cruzada com BCMA de cinomolgo.

10. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico inibe a proliferação de células tumorais que expressam BCMA a uma dose de cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 4,0 mg/kg.

11. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico inibe a proliferação de células tumorais BCMA+ selecionadas do grupo que consiste em células de mieloma, células de linfoma e células de leucemia.

12. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno biespecífico que inibe a

proliferação de células tumorais BCMA+ selecionadas do grupo que consiste em células H929, células MOLP-8 e células OPM.

13. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende:

(a) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas em uma região variável da cadeia pesada (HCVR) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; e

(b) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas dentro de uma região variável da cadeia leve (LCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82.

14. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que compreende uma HCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, uma HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 e uma HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 72.

15. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que compreende uma LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 e uma LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 88.

16. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66 e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82.

17. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação a antígeno compreende:

(a) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas em uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 ou SEQ ID NO: 98; e

(b) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas dentro de uma região variável da cadeia leve (LCVR) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82.

18. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação a antígeno compreende:

(a) uma HCDR1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 ou SEQ ID NO: 100;

(b) uma HCDR2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 94 ou SEQ ID NO: 102; e

(c) uma HCDR3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 ou SEQ ID NO: 104.

19. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação a antígeno compreende uma LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 e uma LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88.

20. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação a antígeno compreende:

(a) domínios de HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 94, 96; e domínios de LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; ou

(b) domínios de HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 100, 102, 104; e domínios de LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88.

21. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação a antígeno compreende:

(a) uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82; ou

(b) uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, e uma LCVR que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

22. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende domínios de HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 68, 70, 72 e domínios de LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; e

(b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende domínios de HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 94,

96 e domínios de LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88.

23. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende domínios de HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 68, 70, 72 e domínios de LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88; e

(b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende domínios de HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 100, 102, 104 e domínios de LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 84, 86, 88.

24. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82; e

(b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82.

25. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que

compreende:

(a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82; e

(b) um segundo domínio de ligação a antígeno que compreende uma HCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98, e uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82.

26. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao BCMA humano e compreende as CDRs de uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 122 e 124, e as CDRs de uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 82, 123 e 125; e

(b) um segundo domínio de ligação a antígeno que se liga especificamente ao CD3 humano.

27. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende as CDRs de um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 e 124/82.

28. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende domínios de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente,

selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64, 68-70-72-76-78-80, 4-6-8-84-86-88, 20-22-24-84-86-88, 36-38-40-84-86-88, 52-54-56-84-86-88 e 68-70-72-84-86-88.

29. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação a antígeno compreende um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 e 124/82.

30. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação a antígeno compreende as CDRs de um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 90/82 e 98/82.

31. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, caracterizada pelo fato de que compete pela ligação a BCMA, ou se liga ao mesmo epítopo em BCMA como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno compreendendo um par HCVR/LCVR compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 66/82 e um segundo domínio de ligação a antígeno compreendendo um par HCVR/LCVR compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 90/82 ou SEQ ID NOs: 98/82.

32. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado caracterizada pelo fato de que compete pela ligação ao CD3 humano, ou se liga ao mesmo epítopo no CD3 humano como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação a antígeno compreendendo um par HCVR/LCVR compreendendo as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 66/82

e um segundo domínio de ligação a antígeno compreendendo um par HCVR/LCVR compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 90/82 ou SEQ ID NOs: 98/82.

33. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizada pelo fato de que é um anticorpo biespecífico.

34. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o anticorpo biespecífico compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG humana.

35. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que a região constante da cadeia pesada de IgG humana é o isotipo IgG1.

36. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que a região constante da cadeia pesada de IgG humana é o isotipo IgG4.

37. Molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 36, caracterizada pelo fato de que o anticorpo biespecífico compreende uma dobradiça quimérica que reduz a ligação do receptor Fcγ em relação a uma dobradiça de tipo selvagem do mesmo isotipo.

38. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ligação a antígeno biespecífico, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, e um diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

39. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma molécula de ligação a antígeno biespecífico, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 37.

40. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que

compreende a molécula de ácido nucleico, como definida na reivindicação 39.

41. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão, como definido na reivindicação 40.

42. Método para inibir o crescimento de um tumor de células plasmáticas em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 38, ao indivíduo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o tumor de células plasmáticas é mieloma múltiplo.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42 ou 43, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a administração de um segundo agente terapêutico ou regime terapêutico.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico ou regime terapêutico compreende um fármaco quimioterápico, alquiladores de DNA, imunomoduladores, inibidores de proteassoma, inibidores de histona desacetilase, radioterapia, um transplante de células-tronco, um anticorpo biespecífico diferente que interage com um antígeno de superfície de célula tumoral diferente e um antígeno de célula T ou de célula imunológica, um conjugado de anticorpo e fármaco, um anticorpo biespecífico conjugado a um agente antitumoral, um inibidor de ponto de verificação PD-1, PD-L1 ou CTLA-4 ou combinações dos mesmos.

46. Método de tratamento de um paciente que sofre de mieloma múltiplo, ou de outra malignidade de célula B que expressa BCMA, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou uma composição

farmacêutica, como definida na reivindicação 38, ao indivíduo.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a malignidade de células B que expressa BCMA é selecionada a partir do grupo que consiste em macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de grandes células B, linfoma não Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma da zona marginal, linfoma linfoplasmocitário e linfoma de Hodgkin.

48. Método, de acordo com a reivindicação 46 ou 47, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a administração de um segundo agente terapêutico.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico ou regime terapêutico compreende um fármaco quimioterápico, alquiladores de DNA, imunomoduladores, inibidores de proteassoma, radioterapia de inibidores de histona desacetilase, um transplante de células-tronco, um anticorpo biespecífico diferente que interage com um antígeno de superfície de célula tumoral diferente e um antígeno de célula T ou de célula imunológica, um conjugado de anticorpo e fármaco, um anticorpo biespecífico conjugado a um agente antitumoral, um inibidor de ponto de verificação PD-1, PD-L1 ou CTLA-4 ou combinações dos mesmos.

50. Método de tratamento de um paciente que sofre de um tumor que expressa BCMA, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma molécula de ligação a antígeno biespecífico isolado, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 38, ao indivíduo em combinação com um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a

antígeno é um anticorpo anti-PD-1.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é cemiplimabe (REGN2810).

53. Uso da molécula de ligação a antígeno biespecífica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão de BCMA.

54. Uso, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é câncer.

55. Uso, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o câncer é mieloma múltiplo.

56. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 55, caracterizado pelo fato de que a molécula de ligação a antígeno ou composição farmacêutica é para uso em combinação com um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

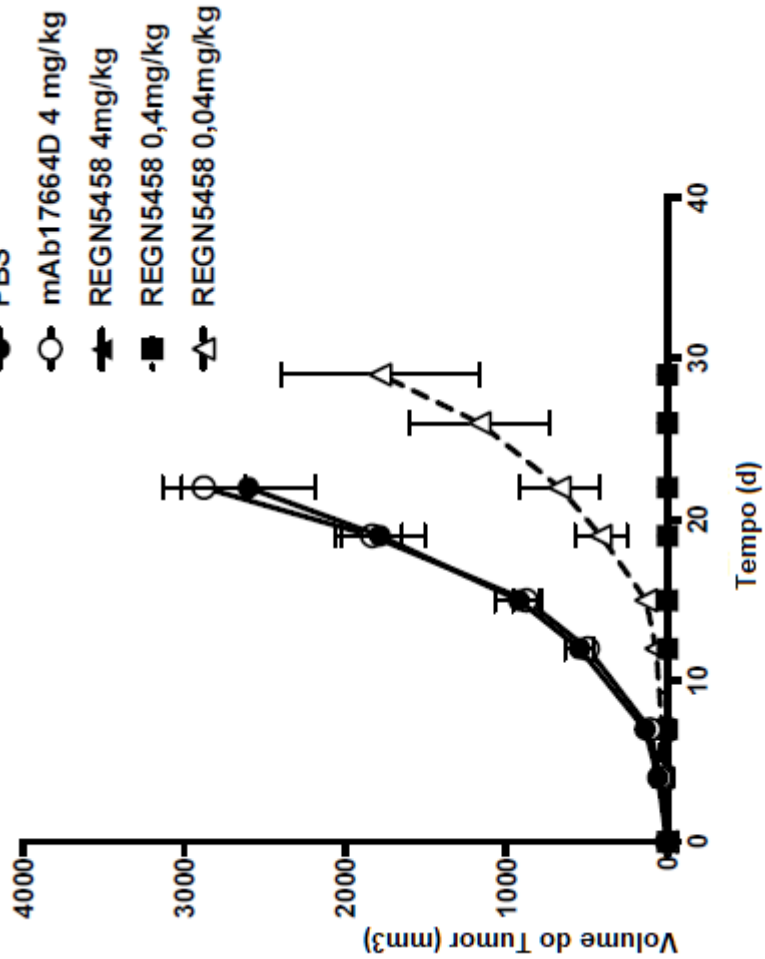

PBS
mAb17664D 4 mg/kg
REGN5458 4mg/kg
REGN5458 0,4mg/kg
REGN5458 0,04mg/kg
Volume do Tumor (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
Tempo (d)

Figura 1

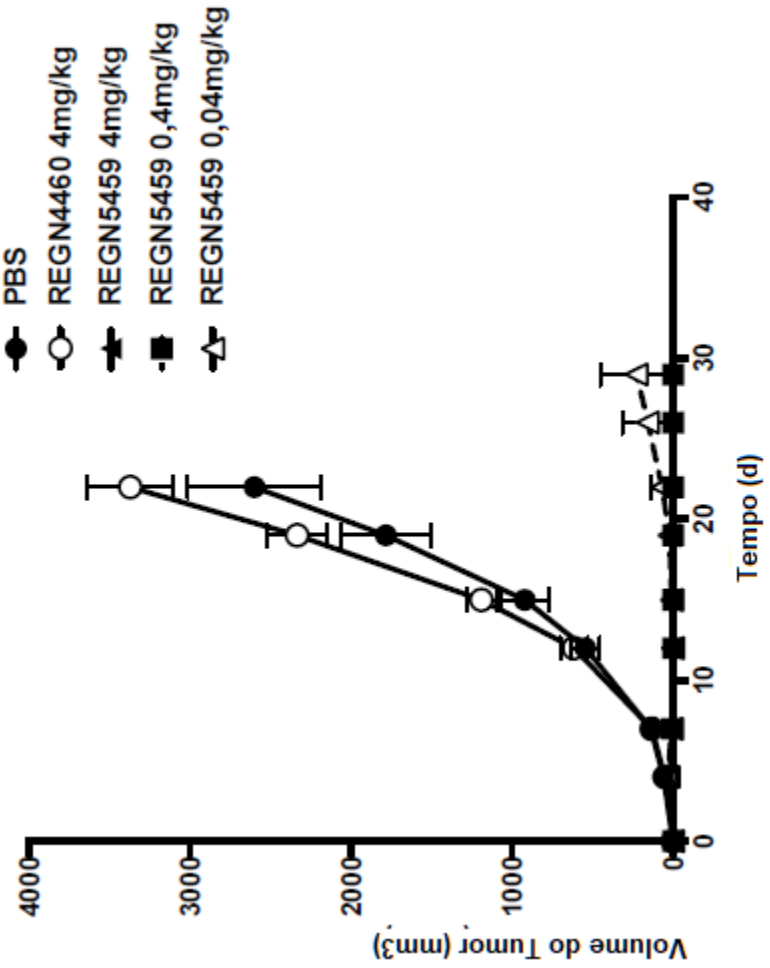

PBS
REGN4460 4mg/kg
REGN5459 4mg/kg
REGN5459 0,4mg/kg
REGN5459 0,04mg/kg
Volume do Tumor (mm3)
Tempo (d)
0
1000
2000
3000
4000
0
10
20
30
40

Figura 2

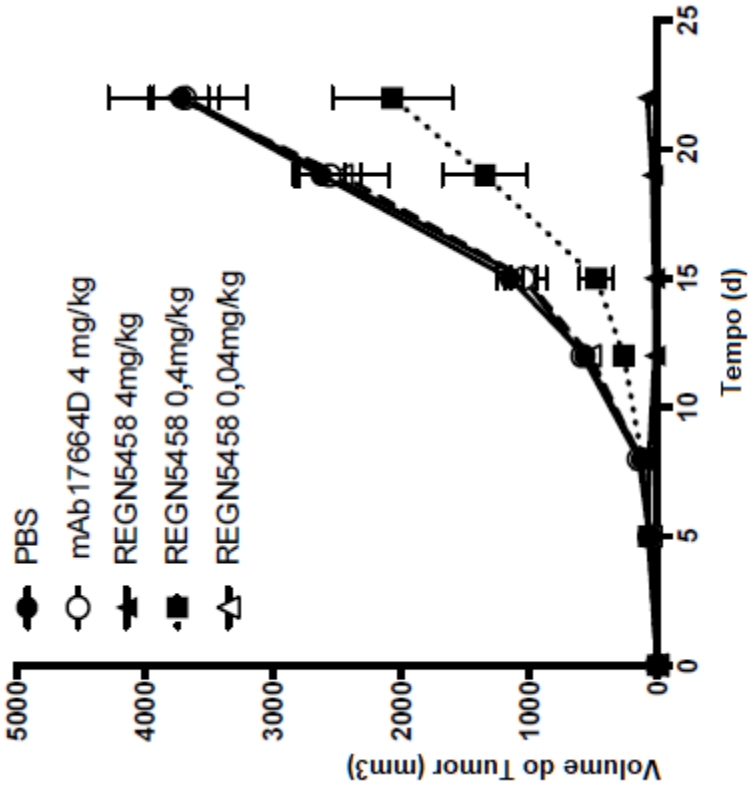

PBS
mAb17664D 4 mg/kg
REGN5458 4mg/kg
REGN5458 0,4mg/kg
REGN5458 0,04mg/kg
Volume do Tumor (mm3)
Tempo (d)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
5
10
15
20
25

Figura 3

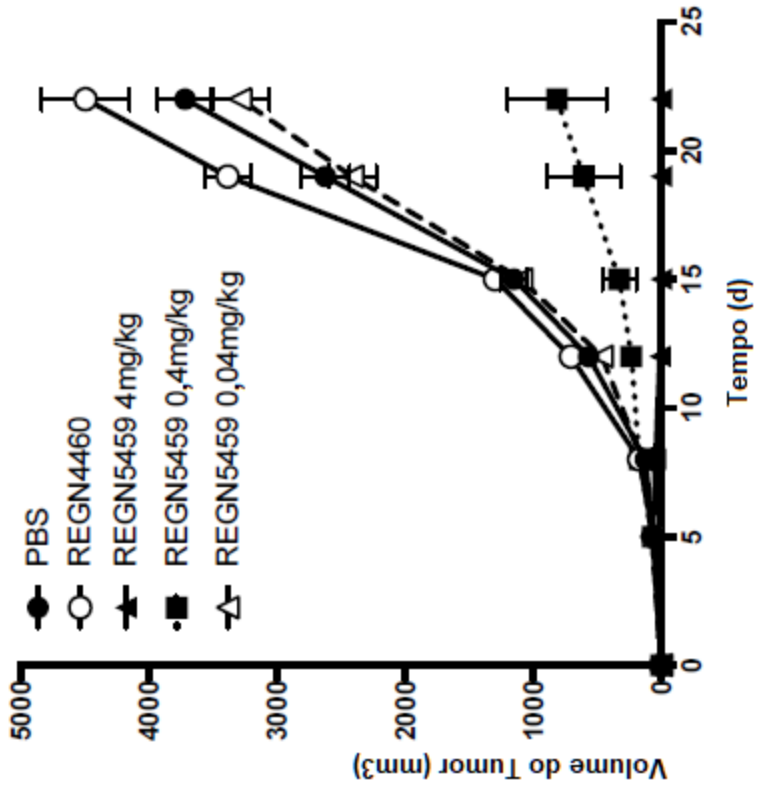

PBS
REGN4460
REGN5459 4mg/kg
REGN5459 0,4mg/kg
REGN5459 0,04mg/kg
Volume do Tumor (mm3)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
Tempo (d)

Figura 4

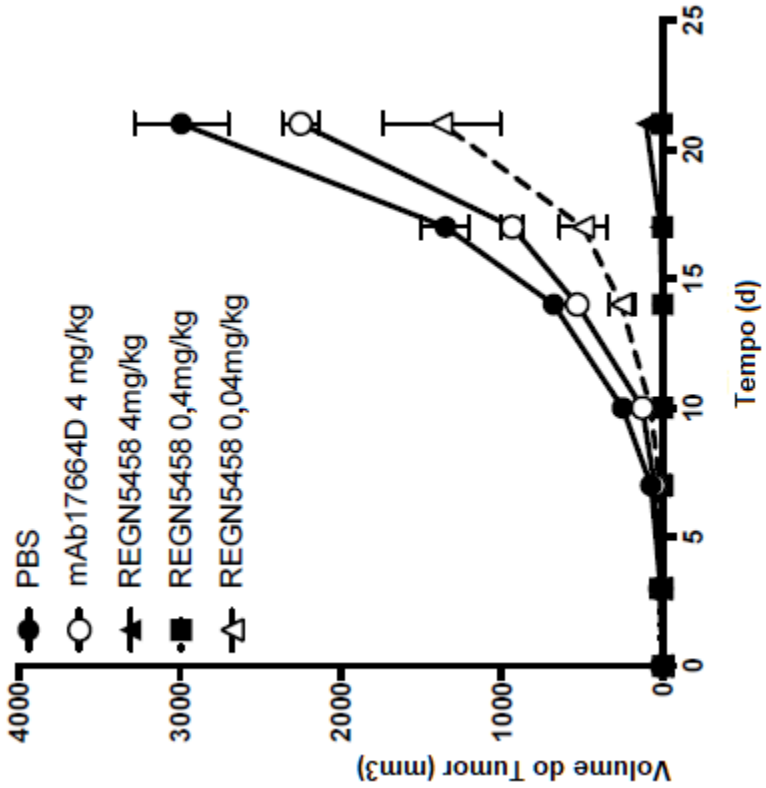

PBS
mAb17664D 4 mg/kg
REGN5458 4mg/kg
REGN5458 0,4mg/kg
REGN5458 0,04mg/kg
Volume do Tumor (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
Tempo (d)

Figura 5

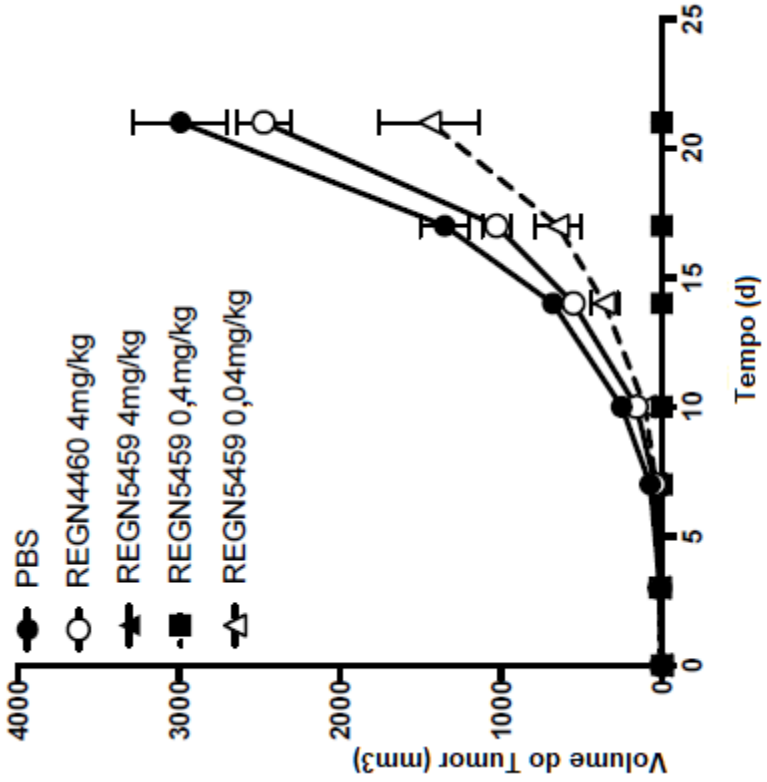

PBS
REGN4460 4mg/kg
REGN5459 4mg/kg
REGN5459 0,4mg/kg
REGN5459 0,04mg/kg
Volume do Tumor (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
Tempo (d)

Figura 6

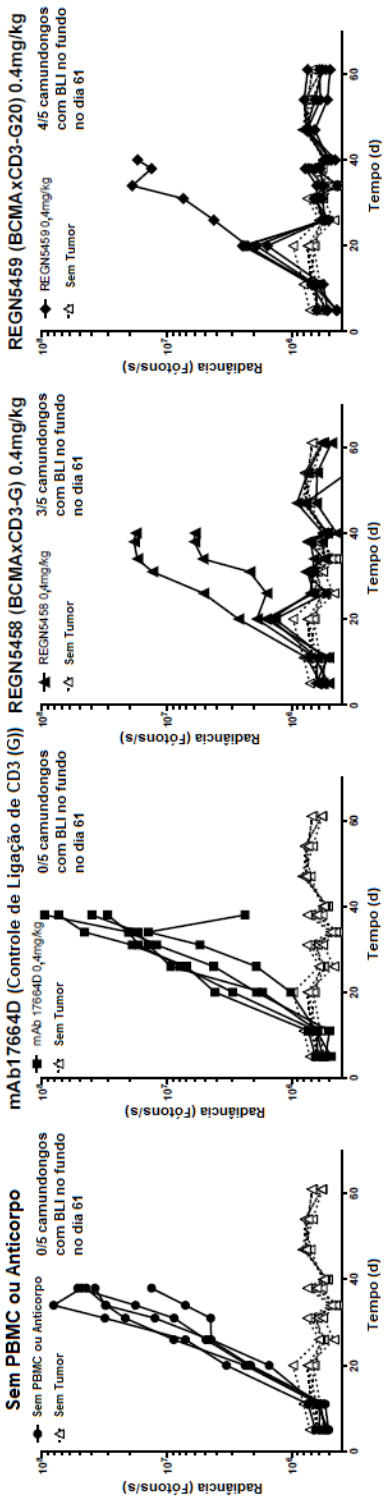

Sem PBMC ou Anticorpo
mAb17664D (Controle de Ligação de CD3 (G))
REGN5458 (BCMAxCD3-G) 0.4mg/kg
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) 0.4mg/kg
Sem PBMC ou Anticorpo
Sem Tumor
mAb 17664D 0,4mg/kg
REGN5458 0,4mg/kg
REGN5459 0,4mg/kg
0/5 camundongos com BLI no fundo no dia 61
3/5 camundongos com BLI no fundo no dia 61
4/5 camundongos com BLI no fundo no dia 61
Radiância (Fótons/s)
Tempo (d)

Figura 7

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS ANTI-BCMA X ANTI-CD3 BIESPECÍFICOS E USOS DOS MESMOS".**

O antígeno de maturação de células B (BCMA) é expresso em células plasmáticas malignas. A presente invenção refere-se a anticorpos biespecíficos inovadores (bsAbs) que se ligam tanto a BCMA quanto ao CD3 e ativam células T por meio do complexo de CD3 na presença de células tumorais que expressam BCMA. Em certas modalidades, as moléculas de ligação a antígeno biespecífico da presente invenção são capazes de inibir o crescimento de tumores que expressam BCMA. As moléculas de ligação a antígeno biespecífico da invenção são úteis para o tratamento de doenças e distúrbios em que uma resposta imune que tem como alvo BCMA positivamente regulado ou induzido é desejada e/ou terapeuticamente benéfica. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos da invenção são úteis para o tratamento de vários cânceres, incluindo mieloma múltiplo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P251475.TXT
- Data de Geração do Código: 06/01/2021
- Hora de Geração do Código: 15:35:53
- Código de Controle:
  - Campo 1: 8EEEE8755D2BB4EF
  - Campo 2: 0F1347BE6D0813AD