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

(21) BR 112021008105-4 A2

(22) Data do Depósito: 28/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

(54) Título: VARIANTES DE FC5 HUMANIZADAS E ESTABILIZADAS PARA INTENSIFICAÇÃO DE TRANSPORTE ATRAVÉS DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C07K 16/00; C07K 16/46; C07K 19/00; A61P 25/28; (...).

(30) Prioridade Unionista: 29/10/2018 US 62/751,962.

(71) Depositante(es): BIOGEN MA INC.; NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA.

(72) Inventor(es): BENJAMIN A. SMITH; ANDREAS LEHMANN; THOMAS O. CAMERON; R. BLAKE PEPINSKY; DINGYI WEN; GRAHAM K. FARRINGTON; GOPALAN RAGHUNATHAN; NELS E. PEDERSON; DANICA STANIMIROVIC; TRAIAN SULEA; ARSALAN S. HAQQANI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019058286 de 28/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/092202 de 07/05/2020

(85) Data da Fase Nacional: 28/04/2021

(57) Resumo: VARIANTES DE FC5 HUMANIZADAS E ESTABILIZADAS PARA INTENSIFICAÇÃO DE TRANSPORTE ATRAVÉS DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA. A presente invenção refere-se a composições que compreendem variantes humanizadas e geneticamente modificadas de um domínio variável de anticorpo (por exemplo, FC5), moléculas quiméricas que compreendem as mesmas, composições que compreendem as mesmas e usos das mesmas.

Nº de Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Aminoácido	D	V	Q	L	Q	A	S	G	G	G	L	V	Q	A	G	G	S	L	R	L

Nº de Posição	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Aminoácido	S	C	**A**	**A**	**S**	**G**	**F**	**K**	**I**	**T**	**H**	**Y**	**T**	**M**	**G**	W	F	R	Q	A

Position No.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Amino Acid	P	G	K	E	R	E	F	V	S	**R**	**I**	**T**	**W**	**G**	**G**	**D**	**N**	**T**	**F**	**Y**

Nº de Posição	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Aminoácido	**S**	**N**	**S**	**V**	**K**	**G**	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	V	Y

Nº de Posição	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Aminoácido	L	Q	M	N	S	L	K	P	E	D	T	A	D	Y	Y	C	**A**	**A**	**G**	**S**

Nº de Posição	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Aminoácido	**T**	**S**	**T**	**A**	**T**	**P**	L	**R**	**V**	**D**	**Y**	W	G	K	G	T	Q	V	T	V

Nº de Posição	121	122	
Aminoácido	S	S	**(SEQ ID NO: 1)**

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VARIANTES DE FC5 HUMANIZADAS E ESTABILIZADAS PARA INTENSIFICAÇÃO DE TRANSPORTE ATRAVÉS DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório Nº U.S. 62/751.962 depositado em 29 de outubro de 2018, cujo conteúdo está incorporado a título de referência no presente documento em sua totalidade.

CAMPO DA TÉCNICA

[002] A presente invenção refere-se, geralmente, às composições para entregar um agente desejado (*por exemplo,* um produto terapêutico, um diagnóstico) através da barreira hematoencefálica e métodos para usar a mesma para tratamento e/ou prevenção de distúrbios neurológicos.

ANTECEDENTES

[003] A entrega de fármacos no sistema nervoso central (SNC) tem sido um desafio no tratamento de doenças neurológicas, tais como mal de Alzheimer e mal de Parkinson. Para fármacos alcançarem o sistema nervoso, primeiro eles devem penetrar a barreira hematoencefálica (BBB), que é um grande desafio devido à seletividade da BBB. A BBB atua como uma membrana semipermeável, que evita que a maioria das moléculas entrem no sistema nervoso a partir do sangue e permite que apenas compostos de peso molecular baixo (<400 Da) e lipofílicos passem. A maioria das moléculas pequenas e moléculas grandes, tais como anticorpos monoclonais e oligonucleotídeos antissenso, não podem passar por essa barreira. Devido a esse processo desafiador de penetração de fármaco através da BBB, uma pequena fração de agentes terapêuticos para doenças neurológicas chegam aos ensaios clínicos.

[004] Há uma necessidade na técnica por composições melhoradas e métodos para entregar um agente terapêutico ao SNC.

SUMÁRIO

[005] Este pedido se refere às moléculas que compreendem um domínio variável de anticorpo (por exemplo, uma variante de FC5) que pode ser usado para transportar um agente terapêutico através da barreira hematoencefálica.

[006] Em um aspecto, a divulgação apresenta um domínio variável de anticorpo que transmigra através da barreira hematoencefálica. O domínio variável de anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% idêntica à sequência apresentada na SEQ ID Nº:1. A sequência de aminoácidos compreende: (i) substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1; e (ii) região de determinação de complementaridade (CDR)1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47 ou 57, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51.

[007] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em pelo menos quatro das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1. Em outros casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em pelo menos cinco das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1. Em ainda outros casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em pelo menos seis das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1. Em um

caso, a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em cada uma das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1.

[008] Em determinados casos, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47. Em outros casos, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:57.

[009] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (isto é, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) dentre: valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1; ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1; prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1; serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1; arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1; alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1; glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

[010] Em determinados casos, a sequência de aminoácidos compreende: valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1; ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1; prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1; serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1; arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1; alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1; glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

[011] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais

(isto é, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) dentre as posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45, 47 ou 79 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (isto é, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 44 e 45 da SEQ ID Nº:1. Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1. Em outros casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 1, 44 e 45 da SEQ ID Nº:1. Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1. Em ainda outros casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende, em

comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 1, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45, e 47 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Em outros casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1. Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na

posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

[012] Em determinados casos, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID Nº:10 a 17.

[013] Em outro aspecto, a divulgação se refere a um domínio variável de anticorpo que transmigra através da barreira hematoencefálica, sendo que o domínio variável de anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% idêntica à SEQ ID Nº:1. A sequência de aminoácidos compreende a região de determinação de complementaridade (CDR)1, CDR2, e CDR3, sendo que CDR2 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50. Em uma modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47, CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51, e a sequência de aminoácidos compreende cisteínas nas posições que correspondem às posições 49 e 70 da SEQ ID Nº:1. Em outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:48, CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51 e a sequência de aminoácidos compreende cisteína na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1. Em ainda outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49, e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:52. Em outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:52. Em outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:53. Em outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:53. Em ainda outra modalidade, CDR1 compreende a sequência

apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:54. Em outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:54. Em outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:55. Em ainda outra modalidade, CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:55.

[014] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições em uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14) dentre as posições que correspondem às posições 1, 5, 6, 14, 37, 44, 45, 47, 75, 87, 88, 93, 114 ou 117 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1; ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1; prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1; arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1; alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1; glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

[015] Em determinados casos, a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições em uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) dentre as posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 ou 117 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) dentre: valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1; ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1; prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1; serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1; arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1; alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1; glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

[016] Em outros casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 44 e 45 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos compreende: glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1.

[017] Em ainda outro caso, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 44 e 45 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1.

[018] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que

correspondem às posições 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

[019] Em outro caso, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

[020] Em determinados casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

[021] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

[022] Em outro caso, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

[023] Em determinados casos, a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos compreende: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; e leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

[024] Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 20. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 21. Em ainda outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 22. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 23. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 24. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 25. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada

na SEQ ID Nº: 26. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 27. Em ainda outra modalidade, a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº: 28.

[025] Em outro aspecto, a divulgação apresenta uma molécula quimérica que compreende qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo descritos acima.

[026] Em determinados casos, a molécula quimérica compreende uma região de Fc de anticorpo. Em alguns casos, a molécula quimérica compreende um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo (por exemplo, um Fab), um anticorpo de cadeia única, um diacorpo, um nanocorpo, uma enzima, um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso), um fármaco de molécula pequena, ou um lipossoma ou uma nanopartícula lipídica que encapsula um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso), um fármaco de molécula pequena ou um peptídeo. Em alguns casos, a molécula quimérica compreende um arcabouço de exibição, tal como repetições de anquirina (Darpins), fibronectina (Adnectinas), proteína A (Aficorpos), ou Estefina A (Afímeros).

[027] Em alguns casos, na molécula quimérica, o domínio variável de anticorpo é ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N de uma região de articulação de um anticorpo. O terminal C da região de articulação é fundido a uma porção química de Fc. Em determinadas modalidades, a molécula quimérica é bivalente em relação ao domínio variável de anticorpo (isto é, a mesma compreende dois domínios variáveis de anticorpo, cada um ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N de uma região de articulação de um anticorpo, e em que o terminal C da região de articulação é fundido a uma porção química de Fc).

[028] Em determinados casos, a região de articulação compreende a sequência AEPKSCD (SEQ ID Nº:56), AEPKSSD (SEQ ID Nº:59) ou KTHTCPPCP (SEQ ID Nº:19).

[029] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende: uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo; uma região variável de cadeia leve de um anticorpo; uma enzima; um peptídeo ou um ligante que compreende a sequência de aminoácidos 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

[030] Em alguns casos, a porção química de Fc é um hIgG1 Fc, um hIgG2 Fc, um hIgG3 Fc, a hIgG4 Fc, um hIgG1agly Fc, um hIgG2 SAA Fc, um hIgG4(S228P) Fc, um hIgG4(S228P)/G1 agly Fc (nesse formato – que minimiza a função efetora- os domínios CH1 e CH2 são IgG4 com uma articulação 'fixada' (S228P) e é aglicosilada. O domínio CH3 é hIgG1, ou um hIgG4(S228P) agly Fc.

[031] Em determinados casos, uma porção química de Fc é ligada diretamente ou por meio de uma segunda sequência de aminoácidos interveniente a um polipeptídeo que compreende um segundo domínio variável de anticorpo (por exemplo, o domínio (ou domínios) variável de um anticorpo terapêutico); um Fab; um scFv; um anticorpo de domínio único; um nanocorpo, um diacorpo, um peptídeo; uma enzima; ou a um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso).

[032] Em alguns casos, na molécula quimérica, a região de articulação é ligada a um ácido nucleico. Em alguns casos, na molécula quimérica, a região de articulação é conjugada quimicamente a um ácido nucleico. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico é um oligonucleotídeo antisenso.

[033] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligada diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica.

[034] Em alguns casos, o lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica encapsula uma molécula pequena ou um ácido nucleico. Em alguns casos, o lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica encapsula um peptídeo. Em alguns casos, o lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica encapsula uma enzima. Em alguns casos, o lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica encapsula um anticorpo ou fragmento de anticorpo (inclusive Fab, Fab'2, scFv). Em alguns casos, o lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica encapsula um nanocorpo. Em alguns casos, o lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica encapsula um oligonucleotídeo antisenso. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo antisenso é um gapmer. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo antisenso é um oligonucleotídeo antisenso de comutação de splice.

[035] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, sendo que o domínio variável de anticorpo é ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo inteiro. Em algumas modalidades, o anticorpo inteiro é um anticorpo que se liga ao LINGO-1 humano, LINGO-2 humano, LINGO-3 humano, LINGO-4 humano, TREM2 humano de receptor de NOGO humano, uma repetição dipeptídica (DPR) de poli-glicina–alanina (GA) que tem pelo menos 6 repetições $(GA)_6$ conforme traduzido do gene de quadro de leitura aberto 72 de cromossomo humano 9 (C9orf72) (uma DPR de C9orf72 humana), TWEAK humano, receptor de TWEAK humano, beta amiloide humano, tau humano, alfa-sinucleína humana, TDP-43 humano, DR6 humano, SOD1 humano, DR6, vírus JC (ou outros alvos de doença infecciosa), ou ErbB2 humano, VEGF, CD20, Her2 (ou outros alvos de câncer cerebral humano). Em alguns

casos, o anticorpo inteiro é bevacizumabe, rituximabe, trastuzumabe, um anticorpo anti-PD1 ou um anticorpo anti-PDL-L1.

[036] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento e uma albumina de soro humano, ou porção química de ligação à albumina de soro humano. Em alguns casos, essa molécula quimérica compreende adicionalmente um agente terapêutico. Em uma modalidade, o agente terapêutico é um domínio variável de anticorpo (por exemplo, o domínio (ou domínios) variável de um anticorpo terapêutico); um Fab; um scFv; um anticorpo de domínio único; um nanocorpo, um diacorpo, um peptídeo; uma enzima; um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso).

[037] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma molécula quimérica que engloba qualquer uma das moléculas mostradas na Figura 49. Em alguns casos, a região de Fc das moléculas ilustradas é substituída por uma albumina de soro humano e essas moléculas quiméricas também são parte desta divulgação. Em alguns casos, as cargas são ligadas com o uso de conjugação química, tal como sulfidrila (maleimida, iodo, vinilsulfona).

[038] Em ainda outro aspecto, a divulgação fornece uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligada diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um capsídeo viral (por exemplo, AAV) que contém um vetor terapêutico. Consultar, por exemplo, Naso et al., BioDrugs. 2017; 31(4): 317–334.

[039] Em outro aspecto, a divulgação apresenta uma composição que compreende:

(1) uma proteína quimérica que compreende

(i) um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, e

(ii) uma primeira proteína que compreende uma primeira região de articulação de um anticorpo e uma primeira porção química de Fc, em que o terminal C da primeira região de articulação é ligado ao terminal N da primeira porção química de Fc, e em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da primeira região de articulação;

(2) uma segunda proteína que compreende uma segunda região de articulação de um anticorpo e uma segunda porção química de Fc, em que o terminal C da segunda região de articulação é ligado ao terminal N da segunda porção química de Fc, em que a segunda proteína emparelha com a primeira proteína; e

(3) um agente terapêutico. Em alguns casos, um ligante conecta o primeiro anticorpo variável à primeira proteína; e/ou a proteína quimérica ao agente terapêutico. Em alguns casos, o ligante é 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

[040] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma composição que compreende:

(1) uma primeira proteína quimérica que compreende

(i) um primeiro domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo divulgados no presente documento; e

(ii) uma primeira proteína que compreende uma primeira região de articulação de um anticorpo e uma primeira porção química de Fc, em que o terminal C da primeira região de articulação é ligado ao terminal N da primeira porção química de Fc, e em que o C terminal do primeiro domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da primeira região de articulação;

(2) uma segunda proteína quimérica que compreende

(i) um segundo domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo divulgados no presente documento; e

(ii) uma segunda proteína que compreende uma segunda região de articulação de um anticorpo e uma segunda porção química de Fc, em que o terminal C da segunda região de articulação é ligado ao terminal N da segunda porção química de Fc, em que o C terminal do segundo domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da segunda região de articulação, e em que a segunda proteína emparelha com a primeira proteína; e

(3) um agente terapêutico. Em alguns casos, um ligante conecta o primeiro anticorpo variável à primeira proteína; e/ou o segundo anticorpo variável à segunda proteína; e/ou a proteína quimérica ao agente terapêutico. Em alguns casos, o ligante é 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

[041] Em outro aspecto, a divulgação apresenta uma composição que compreende:

(1) uma primeira proteína quimérica que compreende

(i) um primeiro domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo divulgados no presente documento; e

(ii) uma primeira proteína que compreende uma primeira região de articulação de um anticorpo e uma primeira porção química de Fc, em que o terminal C da primeira região de articulação é ligado ao terminal N da primeira porção química de Fc, e em que o C terminal do primeiro domínio variável de anticorpo é fundido por meio de uma primeira sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da primeira região de articulação; e

(2) uma segunda proteína quimérica que compreende

(i) um segundo domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo divulgados no presente documento; e

(ii) uma segunda proteína que compreende uma segunda região de articulação de um anticorpo e uma segunda porção química de Fc, em que o terminal C da segunda região de articulação é ligado ao terminal N da segunda porção química de Fc, em que o C terminal do segundo domínio variável de anticorpo é fundido por meio de uma segunda sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da segunda região de articulação, e em que a segunda proteína emparelha com a primeira proteína; em que a primeira e a segunda sequências de aminoácidos intervenientes compreendem Fabs que são agentes terapêuticos. Em alguns casos, um ligante conecta o primeiro anticorpo variável à primeira proteína; e/ou o segundo anticorpo variável à segunda proteína; e/ou a proteína quimérica ao agente terapêutico. Em alguns casos, o ligante é 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

[042] Em alguns casos, a região de articulação compreende a sequência AEPKSCD (SEQ ID Nº:56) ou AEPKSSD (SEQ ID Nº:59). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência KTHTCPPCP (SEQ ID Nº:19).

[043] Em determinados casos, a primeira e a segunda porções químicas de Fc têm uma sequência de aminoácidos idêntica. Em outros casos, a primeira e a segunda porções químicas de Fc têm diferentes sequências de aminoácidos.

[044] Em alguns casos, a primeira e/ou a segunda porções químicas de Fc são aglicosiladas.

[045] Em determinados casos, a primeira e a segunda porções químicas de Fc são selecionadas dentre o grupo que consiste em hIgG1 Fc, hIgG2 Fc, hIgG3 Fc, hIgG4 Fc, hIgG1agly Fc, h IgG2 SAA Fc,

hIgG4(S228P) Fc, hIgG4(S228P)/G1 agly Fc e hIgG4(S228P) agly Fc.

[046] Em alguns casos, as composições descritas acima compreendem adicionalmente uma porção química que estende a meia-vida. Em alguns casos, a primeira e/ou a segunda porções químicas de Fc são variantes que sofreram mutação do Fc de tipo selvagem que serve para estender meia-vida. Variantes de Fc, tais como YTE e LS, resultaram em meia-vida de anticorpo intensificada em seres humanos. Em alguns casos, a região de Fc variante se difere de uma região de Fc original em que a região de Fc variante compreende substituições de aminoácido nas posições 428 e 434, em que as ditas substituições de aminoácido são M428L e N434S. Consultar, por exemplo, os documentos de Patente Nº U.S. 8546543 e 8624007; US20140056879A1; Brian J. Booth, et al. (2018) Extending human IgG half-life using structure-guided design, mAbs, DOI: 10.1080/19420862.2018.1490119; e Shen Y, et al. (2017) Increased half-life and enhanced potency of Fc-modified human PCSK9 monoclonal antibodies in primates. PLoS ONE 12(8): e0183326. doi.org/10.1371/journal.pone.0183326. Em outros casos, a composição compreende adicionalmente um mutante de HSA que estende meia-vida. Consultar, por exemplo, os documentos de Patente Nº US8748380; e WO2014179657A1. Em alguns casos, a variante de HSA sofre mutação em um ou mais resíduos selecionados dentre o grupo que consiste em Y411, V415, V418, T422, L423, V426, L430, L453, L457, L460, V473, R485, F488, L491, F502, F507, F509, K525, A528, L529, L532, V547, M548, F551, K573, L575, V576, S579 e L583. Em ainda outros casos, a composição compreende adicionalmente um XTEN. Consultar, por exemplo, o documento nº WO2013130683A2 e Podust et al., Journal of Controlled Release, Volume 240, 28 de outubro de 2016, páginas 52-66.

[047] Em alguns casos, a primeira e a segunda regiões de articulação têm uma sequência de aminoácidos idêntica.

[048] Em determinados casos, o agente terapêutico é uma

molécula de ligação que compreende um domínio variável de anticorpo. Em uma modalidade, a molécula de ligação se liga ao LINGO-1 humano, LINGO-2 humano, LINGO-3 humano, LINGO-4 humano, TREM2 humano, uma DPR de C9orf72 humano, TWEAK humano, receptor de TWEAK humano, beta amiloide humano, tau humano, alfa-sinucleína humana ou TDP-43 humano. Em alguns casos, a molécula de ligação é um Fab e o terminal N do domínio de VH ou VL do Fab é ligado ao terminal C da primeira porção química de Fc.

[049] Em alguns casos, o agente terapêutico é um oligonucleotídeo antisenso. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antisenso é um gapmer. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo antisenso é um oligonucleotídeo antisenso de comutação de splice. Em alguns casos, o oligonucleotídeo antisenso é ligado à primeira e/ou à segunda região de articulação.

[050] Em determinados casos, o agente terapêutico é um fármaco de molécula pequena, peptídeo, enzima, nanocorpo ou um ácido nucleico (por exemplo, oligonucleotídeo antisenso) encapsulado em um lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica.

[051] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma composição que compreende:

(1) uma proteína quimérica que compreende

(i) o domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo descritos no presente documento, e

(ii) uma cadeia leve de um anticorpo, em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia leve do anticorpo; e

(2) uma cadeia pesada do anticorpo que emparelha com a cadeia leve do anticorpo.

[052] Em outro aspecto, a divulgação apresenta uma composição

que compreende:

(1) uma proteína quimérica que compreende

(i) o domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo descritos no presente documento, e

(ii) uma cadeia pesada de um anticorpo, em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia pesada do anticorpo; e

(2) uma cadeia pesada do anticorpo que emparelha com a cadeia pesada do anticorpo.

[053] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma composição que compreende:

(1) uma primeira proteína quimérica que compreende

(i) um primeiro domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo descritos no presente documento, e

(ii) uma cadeia leve de um anticorpo, em que o terminal C do primeiro domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia leve do anticorpo; e

(2) uma segunda proteína quimérica que compreende

(i) um segundo domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo descritos no presente documento, e

(ii) uma cadeia pesada do anticorpo, em que o terminal C do segundo domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia pesada do anticorpo.

[054] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos interveniente é 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

[055] Em determinados casos, o anticorpo se liga ao LINGO-1 humano, LINGO-2 humano, LINGO-3 humano, LINGO-4 humano, TREM2 humano, DPR de C9orf72 humano, TWEAK humano, receptor de TWEAK humano, beta amiloide humano, tau humano, alfa-sinucleína humana ou TDP-43 humano. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende as seis CDRs de um anticorpo selecionado dentre o grupo que consiste em Li81, Li113, huP2D10, 12F6A, 12F4, 21D11, 6C5, 40E8, BMS-986168, 15O7, 5J10, 41D1, 14W3 e 51C1. Em outras modalidades, o anticorpo compreende a região variável de cadeia pesada (VH) e região variável de cadeia leve (VL) de um anticorpo selecionado dentre o grupo que consiste em Li81, Li113, huP2D10, 12F6A, 12F4, 21D11, 6C5, 40E8, BMS-986168, 15O7, 5J10, 41D1, 14W3 e 51C1. Em ainda outras modalidades, o anticorpo compreende a cadeia pesada e cadeia leve de um anticorpo selecionado dentre o grupo que consiste em Li81, Li113, huP2D10, 12F6A, 12F4, 21D11, 6C5, 40E8, BMS-986168, 15O7, 5J10, 41D1, 14W3 e 51C1.

[056] Em outro aspecto, a divulgação apresenta uma composição que compreende uma proteína quimérica que compreende (i) o domínio variável de anticorpo de qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo descritos no presente documento, (ii) uma proteína que compreende uma região de articulação de um anticorpo e uma porção química de Fc, em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da região de articulação da proteína, e (iii) um agente terapêutico. Em alguns casos, a composição compreende um dímero da proteína quimérica. Em alguns casos, a região de articulação compreende a sequência AEPKSCD (SEQ ID Nº:56) ou AEPKSSD (SEQ ID Nº:59). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência KTHTCPPCP (SEQ ID Nº:19). Em determinados casos, a porção química de Fc é aglicosilada. Em alguns

casos, a porção química de Fc é selecionada dentre o grupo que consiste em hIgG1 Fc, hIgG2 Fc, hIgG3 Fc, hIgG4 Fc, hIgG1agly Fc, hIgG2 SAA Fc, hIgG4(S228P)/G1 agly Fc, hIgG4(S228P) Fc e hIgG4(S228P) agly Fc. Em alguns casos, o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ao terminal N da região de articulação da proteína. Em determinados casos, o agente terapêutico é uma molécula de ligação que compreende um segundo domínio variável de anticorpo. Em algumas modalidades, a molécula de ligação se liga ao LINGO-1 humano, LINGO-2 humano, LINGO-3 humano, LINGO-4 humano, TREM2 humano, DPRs de C9orf72 humano, TWEAK humano, receptor de TWEAK humano, beta amiloide humano, tau humano, alfa-sinucleína humana ou TDP-43 humano. Em alguns casos, a molécula de ligação é um Fab e o terminal N do domínio de VH ou VL do Fab é ligado ao terminal C da porção química de Fc. Em determinados casos, o agente terapêutico é um oligonucleotídeo antisenso. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antisenso é um oligonucleotídeo de comutação de splice. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo antisenso é um gapmer. Em determinados casos, o oligonucleotídeo antisenso é ligado à região de articulação. Em alguns casos, o agente terapêutico é uma molécula pequena, peptídeo, enzima, anticorpo de cadeia única, nanocorpo ou ácido nucleico (por exemplo, ASO) encapsulado em um lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica.

[057] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma composição farmacêutica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, uma molécula quimérica descrita no presente documento, ou qualquer uma das composições descritas no presente documento, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[058] Em outro aspecto, a divulgação fornece um ácido nucleico ou ácidos nucleicos que codificam o domínio variável de anticorpo,

moléculas quiméricas ou composições descritas no presente documento.

[059] Em outro aspecto, a divulgação fornece um vetor ou vetores que compreendem tais ácidos nucleicos.

[060] Em ainda outro aspecto, a divulgação apresenta uma célula hospedeira que compreende o vetor ou vetores acima.

[061] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para produzir um domínio variável de anticorpo, molécula quimérica ou composição. O método compreende cultivar a célula hospedeira descrita acima em um meio de cultura celular sob condições que resultam na expressão do domínio variável de anticorpo, molécula quimérica, ou composição, e isolar o domínio variável de anticorpo, molécula quimérica ou composição do meio de cultura celular. Em alguns casos, a célula hospedeira é uma célula CHO, uma célula COS ou uma célula HEK293. Em outros casos, a célula hospedeira é uma célula bacteriana. Em ainda outros casos, a célula hospedeira é uma levedura célula (por exemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*). Em determinados casos, a célula hospedeira é uma célula fúngica (por exemplo, *Aspergillus*).

[062] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para produzir um polipeptídeo de fusão que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento. O método compreende cultivar uma célula hospedeira que contém um vetor (ou vetores) que codifica o polipeptídeo de fusão em um meio de cultura celular sob condições que resultam na expressão do polipeptídeo de fusão, e isolar o polipeptídeo de fusão do meio de cultura celular.

[063] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para tratar mal de Alzheimer em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito

no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente ao beta-amiloide humano. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 12F6A (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.906.367). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 12F6A.

[064] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para tratar doença de paralisia supranuclear progressiva (PSP) em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente ao beta-amiloide humano. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 12F6A (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.906.367). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 12F6A.

[065] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para tratar uma sinucleinopatia (por exemplo, mal de Parkinson) em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à alfa sinucleína humana. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 12F4 (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.940.276) ou 21D11 (consultar o documento de Patente Nº U.S. 9.580.493). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 12F4 ou 21D11.

[066] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para tratar uma tauopatia (por exemplo, mal de Alzheimer) em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente ao tau humano. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em

alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 6C5, 40E8 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.598.484), 4E4 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.605.059) ou BMS-986168/hIPN002 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.447.180 e Publicação de Pedido de Patente Nº U.S. US2017/0174755A1). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 6C5, 40E8, 4E4 ou BMS-986168/hIPN002.

[067] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para tratar paralisia supranuclear progressiva em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente ao tau humano. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 6C5, 40E8 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.598.484), 4E4 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.605.059) ou BMS-986168/hIPN002 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.447.180 e Publicação de Pedido de Patente Nº U.S. US2017/0174755A1). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 6C5, 40E8, 4E4 ou BMS-986168/hIPN002.

[068] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para tratar demência frontotemporal em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a TDP-43. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 41D1, 14W3, 51C1 (consultar, documento de Patente Nº U.S. 9.587.014), ou uma DPR de C9orf72. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 41D1, 14W3, 51C1 ou um anticorpo de DPR anti-C9orf72 (por exemplo, aqueles divulgados no presente documento).

[069] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para tratar esclerose lateral amiotrófica (ELA) em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a SOD1, DR6 ou uma DPR de C9orf72 humano. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende

uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de um anticorpo descrito em qualquer um dos documentos de Patente Nº U.S. 9.283.271; 8.759.029; ou Broering et al., doi.org/10.1371/journal.pone.0061210.

[070] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para tratar esclerose múltipla em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a LINGO-1. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de Li81 (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.128.926) ou Li113 (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.058.406). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de Li81 ou Li113.

[071] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para tratar neurite óptica (por exemplo, AON) em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga

especificamente a LINGO-1. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc. Em alguns casos, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de Li81 (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.128.926) ou Li113 (consultar o documento de Patente Nº U.S. 8.058.406). Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de Li81 ou Li113.

[072] Em ainda outro aspecto, a divulgação apresenta um método para tratar atrofia muscular espinhal em um indivíduo humano que necessita do mesmo. O método que compreende administrar ao indivíduo uma molécula quimérica que compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento ligada diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao nusinersena (Número de Registro CAS 1258984-36-9; UNII: 5Z9SP3X666). Em alguns casos, nusinersena é encapsulada em um lipossoma, nanocarreador polimérico ou nanopartícula lipídica. Em outros casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação fundida a uma porção química de Fc e nusinersena é ligada à região de articulação, uma cisteína modificada geneticamente (por exemplo S442C) na molécula quimérica (por exemplo, região de articulação), ou um sítio não alvejado (por exemplo, com o uso de química de amina).

[073] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para avaliar a labilidade de um domínio variável de anticorpo. O método envolve fornecer um domínio variável de anticorpo. O domínio variável de anticorpo é adicionado a uma amostra de soro para criar uma

mistura. A mistura é incubada. O domínio variável de anticorpo é purificado e o mapeamento de peptídeo é realizado.

[074] Em outro aspecto, a divulgação apresenta um método para examinar para uma forma estabilizada de FC5. O método envolve fornecer um domínio variável de anticorpo que compreende uma variante de FC5 que se difere da SEQ ID Nº:1 em um ou mais (*por exemplo,* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65) aminoácidos, ou compreende n sequências de aminoácidos que são pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas à SEQ ID Nº:1. O domínio variável de anticorpo é adicionado a uma amostra de soro para criar uma mistura. A mistura é incubada. O domínio variável de anticorpo é purificado e o mapeamento de peptídeo é realizado. Um domínio variável de anticorpo que exibe recuperação de peptídeo aumentada é selecionado como uma forma estabilizada de FC5.

[075] Em alguns casos dos dois aspectos acima, a amostra de soro é soro de rato. Em outros casos, a amostra de soro é soro humano. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de cerca de 0,01 a 1 mg/ml. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de cerca de 0,05 a 0,5 mg/ml. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de cerca de 0,05 mg/ml. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de cerca de 0,5 mg/ml. Em alguns casos, a mistura é incubada em cerca de 25 a 37ºC por cerca de 10 a 100 horas. Em um caso, a mistura é incubada em cerca de 37ºC por cerca de 70 horas. Em uma modalidade, o

domínio variável de anticorpo compreende uma variante de FC5. Em alguns casos, a variante de FC5 é um FC5 humanizado. Em outro caso, a variante de FC5 compreende um FC5 estabilizado com dissulfeto. Em ainda outro caso, a variante de FC5 compreende um FC5 humanizado e estabilizado com dissulfeto.

[076] A menos que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica à qual esta invenção pertence. 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 exemplificativo são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, documentos de patente e outras referências mencionadas no presente documento são incorporadas a título de referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o presente pedido, inclusive definições, prevalecerá. Os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser limitantes.

[077] Outros recursos e vantagens da invenção serão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[078] **A Figura 1** fornece a sequência de aminoácidos do anticorpo de domínio único FC5 de tipo selvagem (**SEQ ID Nº:1**). A posição de cada aminoácido na sequência de aminoácidos FC5 também é fornecida (numeração de acordo com a sequência primária). As CDRs estão nas posições 23-35 (CDR1), 50-66 (CDR2) e 97-111 (CDR3). CDRs 1 e 3 são definidas de acordo com North et al. (North, B., Lehmann, A. e Dunbrack, R.L., Jr, "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", J. Mol. Biol., 406:228-256 (2011)) para representar a variabilidade estrutural, e CDR2 é definida como uma

união das definições de Kabat et al. (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. e Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edição, National Institutes of Health, Bethesda, MD) e North et al., para representar variabilidade tanto estrutural quanto de sequência.

[079] **A Figura 2** fornece as sequências de aminoácidos da cadeia leve de Li81 (**SEQ ID Nº:2**), da cadeia pesada de FC5-3X(G4S)-HC Li81 (**SEQ ID Nº:3**) e da cadeia leve de FC5-3X(G4S)-LC Li81 (**SEQ ID Nº:4**). Essas são as sequências dos construtos usados para produzir construtos 3014, 3015 e 3016. A sequência de peptídeo de sinal é mostrada em fonte mais clara.

[080] **A Figura 3** mostra a caracterização de amostras de FC5-(G_4S)3-Li81 por SDS-PAGE. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 4-20% de Tris-glicina da Invitrogen. Amostras não reduzidas foram aquecidas a 95°C por 2 minutos antes da análise (painel esquerdo). Amostras reduzidas foram tratadas com tampão de amostra que contém 2% de 2-mercaptoetanol e aquecidas (painel direito). Pista 1, FC5 Li81 HC, wt LC (Nº de 4D 3014) ; pista 2, Li81 wt HC, FC5 Li81 LC (Nº de 4D 3015); pista 3, FC5 Li81 HC, FC5 Li81 LC (Nº de 4D 3016); pista S, marcadores de peso molecular alto.

[081] **A Figura 4** representa os espectros de massa desconvolutos das cadeias leve (superior) e pesada (inferior) para as amostras reduzidas de construto 3014.

[082] **A Figura 5** mostra os espectros de massa desconvolutos das cadeias pesada e leve para as amostras reduzidas de construto 3015.

[083] **A Figura 6** representa os espectros de massa desconvolutos das cadeias pesada e leve para as amostras reduzidas de construto 3016.

[084] **A Figura 7** ilustra a caracterização de amostras de FC5-

(G4S)1-Li81 por SDS-PAGE. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 4-20% de Tris-glicina da Invitrogen. Amostras não reduzidas foram aquecidas a 95°C por 2 minutos antes da análise. *Painel esquerdo:* pista 1, FC5 (G_4S)1-Li81 (Nº de ID 3438); pista 2, articulação longa de FC5-Fc (G_4S)1-Li81 (Nº de ID 3440); pista 3, articulação curta de FC5-Fc (G_4S)1-Li81 (Nº de ID 3441); pista 4, heterodímero, Nº de ID3442; pista 5, heterodímero, Nº de ID3443; pista 6, heterodímero, Nº de ID3444; pista 7, heterodímero, Nº de ID3443 (lote 2); pista S, marcadores de peso molecular alto. *Painel direito*, purificação de heterodímero Nº de ID3443 por SEC: pista 1, carga de coluna; pistas 2-11, frações de eluição sequenciais; pista S, marcadores de peso molecular alto.

[085] **A Figura 8** fornece as sequências de aminoácidos dos construtos usados para produzir os construtos de FC5-(G_4S)1-Li81. A cadeia leve de Li81 (**SEQ ID Nº:2**), a cadeia pesada de FC5-(G_4S)1-Li81 huIgG1 agly (**SEQ ID Nº:7**), a cadeia leve de articulação longa de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 huIgG1 agly (**SEQ ID Nº:8**) e articulação curta de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 huIgG1 agly (**SEQ ID Nº:9**). A sequência de peptídeo de sinal é mostrada em fonte mais clara.

[086] **A Figura 9** representa espectros de massa desconvolutos de cadeias pesadas para os construtos de FC5-(G_4S)1-Li81. Amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 de Li81/FC5 variante 1; articulação longa de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 de Li81/FC5 Variante 3; articulação curta de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 de Li81/FC5 Variante 4; articulação longa de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 monovalente dupla de Li81/FC5 Variante 5; articulação curta de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 monovalente dupla de Li81/FC5 Variante 6; e articulação curta de FC5-Fc-(G_4S)1-Li81 de monoFab de Li81/FC5 Variante 7.

[087] **A Figura 10** mostra uma avaliação da potência de construtos de FC5-(G_4S)1-Li81. As afinidades aparentes de amostras de FC5-

(G_4S)1-Li81 para LINGO-1 foram medidas através de um ELISA de ligação direta. Dados são plotados como absorção em 405 nm contra concentração.

[088] **A Figura 11** representa a caracterização de amostras de FC5-Li81 em um ensaio de cultura celular de BBB *in vitro*. Os níveis de anticorpos na câmara inferior (15, 30, 60 e 90 min) foram determinados por MRM-ILIS. Valores são Médias ± SD de P_{app}.

[089] **A Figura 12** ilustra os efeitos de fusões de FC5-Li81 reticuladas com Dalargin (Dal) sobre hiperalgesia térmica em modelo de Hargreaves de dor inflamatória. *Painel superior*: Latência de retirada de pata intacta de controle ou pata inflamada para um estímulo térmico foi medida após uma dose intravenosa (i.v.) única de 13 mg/kg das moléculas teste, ou PBS em intervalos de 15 minutos durante 4 h. Dados são mostrados como médias (2 animais/grupo; barras de erro denotam medições individuais). *Painel inferior*: Dados de área sob a curva (AUC) integrados do painel superior expressos em porcentagem de efeito máximo possível (MPE) de pata de controle.

[090] **A Figura 13A** mostra os efeitos de fusões de FC5-Li81 reticuladas com Dal sobre hiperalgesia térmica em modelo de Hargreaves de dor inflamatória. Efeito analgésico alcançado com uma injeção i.v. única de doses progressivas de Li81 e FC5-Li81. Dados são a AUC integrada ao longo da duração de resposta (4 h) expressa em porcentagem de MPE de pata de controle (médias ± desvios padrão de 2 ou 5 animais/grupo conforme notado).

[091] **A Figura 13B** mostra os dados da Figura 13A plotados como o efeito analgésico de FC5-Li81 (3438) e Li81, reticulado com Dalargin, contra a dose i.v.

[092] **A Figura 14** fornece uma avaliação PK de soro e CSF de FC5-Li81. Amostras foram administradas IV por meio da veia caudal em 20, 65 e 200 nmol/kg cada, e os níveis de anticorpo em pontos no tempo

indicados após a injeção foram determinados em amostras de soro (painéis superiores) e CSF (painéis médios) da cisterna magna. Razões CSF/soro em pares (%) em cada ponto no tempo são plotadas no painel inferior. Resultados são a média de 2 animais separados.

[093] **A Figura 15** ilustra a análise da PK de FC5-(G_4S)1-Li81 em ratos. Níveis de soro e CSF foram quantificados através de espectrometria de massa. Dados são apresentados como uma razão de níveis de CSF e soro.

[094] **A Figura 16** representa a caracterização de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 por SDS-PAGE. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 4-20% de Tris-glicina da Invitrogen. Amostras não reduzidas foram tratadas com 5 mM de N-etilmaleimida por 5 min em temperatura ambiente, diluídas com tampão de amostra não redutora de Laemmli e aquecidas a 95°C por 2 min antes da análise. Amostras reduzidas foram tratadas com tampão de amostra que contém 2% de 2-mercaptoetanol e aquecidas. Pista 1. Marcadores de peso molecular alto Pista 2. FC5-(G_4S)1-Li81 (preparação de dosagem) Pista 3. FC5-(G_4S)1-Li81 purificado a partir de soro de rato após 72 h Pista 4. FC5-(G_4S)1-Li81-HC purificado a partir de amostra de ponta de soro de rato em 100 µg/ml.

[095] **A Figura 17** mostra a caracterização de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 por cromatografia de exclusão de tamanho. Amostras (25 µg em 300 µl de tampão de coluna) foram submetidas à SEC em temperatura ambiente em uma coluna de FPLC Superdex 200 HR10/30 (GE Healthcare) com o uso de 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,2 como a fase móvel. A coluna foi executada a 0,3 ml/min. O efluente de coluna foi monitorado por detecção UV em 280 nm. Setas denotam o tempo de injeção. SEC/espalhamento de luz foi realizado em uma coluna BioSep-SEC-S3000, 300 x 7,8 mm (Phenomenex) em 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,2 em uma taxa de fluxo

de 0,6 ml/min em um instrumento Waters Alliance (Waters 2790, MA). Espalhamento de luz estático foi sincronizado com SEC e medido online com o uso de um detector Precision PD2100 (Precision Detectors, MA). Pesos moleculares foram calculados com o uso de Software de Análise de Espalhamento de Luz Discovery 32.

[096] **A Figura 18** exibe a caracterização de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 em um ensaio de cultura celular de BBB *in vitro*. Os níveis de anticorpos na câmara inferior (15, 30, 60 e 90 min) foram determinados por MRM-ILIS. Valores são Médias ± SD de Papp.

[097] **A Figura 19** mostra os espectros de massa de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 nativas. Espectros de massa desconvolutos das amostras de solução de dosagem de FC5(G_4S)1Li81 nativas, ponta de FC5-(G_4S)1-Li81 e 72 h de FC5-(G_4S)1-Li81.

[098] **A Figura 20** mostra os espectros de massa de amostras de FC5-Li81 HC. Espectros de massa desconvolutos das amostras de solução de dosagem de FC5(G_4S)1Li81 nativas, ponta de FC5-(G_4S)1-Li81 e 72 h de FC5-(G_4S)1-Li81.

[099] **A Figura 21** mostra os espectros de massa de amostras de FC5-Li81 LC. Espectros de massa desconvolutos das amostras de solução de dosagem de FC5(G_4S)1Li81 nativas, ponta de FC5-(G_4S)1-Li81 e 72 h de FC5-(G_4S)1-Li81.

[100] **A Figura 22** representa mapas de peptídeo de EndoLysC/tripsina de amostras de FC5-Li81. Os traços UV, monitorados em 214 nm, dos mapas de dissulfeto Lys-C/tríptico não reduzidos e reduzidos de FC5(G_4S)1Li81 (controle), ponta de FC5-(G_4S)1-Li81-HC e 72 h de FC5-(G_4S)1-Li81-HC.

[101] **A Figura 23** mostra a recuperação dos peptídeos de cadeia pesada nos mapas de peptídeo não reduzidos e reduzidos. % de recuperação (eixo geométrico y) foi normalizada para os peptídeos correspondentes na amostra de controle. Peptídeos de HC que foram

caracterizados estão indicados no eixo geométrico x. Peptídeo de recuperação fraca, HC 215-249; peptídeos hidrofóbicos, HC 171-192 e HC 276-338.

[102] **A Figura 24** representa a recuperação dos peptídeos de cadeia leve nos mapas de peptídeo não reduzidos e reduzidos. % de recuperação (eixo geométrico y) foi normalizada para os peptídeos correspondentes na amostra de controle. Peptídeos de LC que foram caracterizados estão indicados no eixo geométrico x.

[103] **A Figura 25** ilustra o projeto de FC5 humanizado. Alinhamento de sequência e um modelo de estrutura computacional que compara FC5 (**SEQ ID Nº:1**) e variantes de humanização H12 (**SEQ ID Nº:11**) e H62 (**SEQ ID Nº:15**). Sombreamento claro de cadeias laterais nos modelos e códigos de uma letra de aminoácido no alinhamento indica origem em camelídeos, e o sombreamento escuro indica origem humana. H12 tem uma mancha completamente humanizada (contorno tracejado) que corresponde à interface de VH/VL em um anticorpo convencional. Essa interface é coberta pela cadeia leve em um anticorpo convencional, porém, é exposta em anticorpos de domínio único. A mutação M34T é introduzida para evitar oxidação de metionina.

[104] **A Figura 26** representa a caracterização de variantes de humanização FC5-hFc através de eletroforese capilar microfluídica desnaturante. 1) H11. 2) H12. 3) H31. 4) H32. 5) H61. 6) H62. 7) H71. 8) H72. *Esquerda*: amostras não reduzidas. *Direita*: amostras reduzidas. Marcadores de peso molecular são indicados em kDa em ambos os lados. Com o uso do software de instrumento, os eletroferogramas são exibidos em 2D como um gel virtual com o uso do marcador inferior (LM) para alinhamento. SP = pico de sistema

[105] **A Figura 27** mostra os espectros de massa intactos desconvolutos de amostras de variante de humanização de FC5-hFc

reduzidas. H11: massa prevista 38553,7 Da, massa observada 38551 Da. H12: massa prevista 38523,6 Da, massa observada 38521 Da. H31: massa prevista 38548,6 Da, massa observada 38544 Da. H32: massa prevista 38518,6 Da, massa observada 38516 Da. H61: massa prevista 38649,7 Da, massa observada 38645 Da. H62: massa prevista 38619,6 Da, massa observada 38617 Da. H71: massa prevista 38677,8 Da, massa observada 38674 Da. H72: massa prevista 38647,7 Da, massa observada 38645 Da.

[106] **A Figura 28** mostra os resultados de cromatografia de exclusão de tamanho analítica de variantes de humanização de FC5-hFc. Variantes H61, H62 e H71 eluíram em picos homogêneos em ~17,3 min, enquanto outras variantes mostram tempos de eluição atrasados na ordem listada. Dados são normalizados para altura de pico constante.

[107] **A Figura 29** é uma caracterização de variantes de humanização de FC5-hFc em um ensaio transpoço de cultura celular de BBB de rato *in vitro*. Os níveis de anticorpos na câmara inferior (15, 30 e 60 min) foram determinados por MRM e usados para calcular os valores de permeabilidade. Valores são Médias ± SD de P_{APP}.

[108] **A Figura 30** mostra os efeitos de variantes de humanização de FC5-hFc reticulados com Dalargin em hiperalgesia térmica em modelo Hargreaves de dor inflamatória. *Painel esquerdo*: Latência de retirada de pata intacta de controle ou pata inflamada para um estímulo térmico foi medida após uma dose i.v. única de ~5 mg/kg das moléculas teste, ou PBS em intervalos de 15 minutos durante 4 h. Dados são mostrados como médias (sd para 2 animais/grupo). *Painel direito*: Dados de resposta integrada (AUC) a partir do painel esquerdo expressaram em porcentagem de MPE de pata de controle.

[109] **A Figura 31** mostra a modificação genética de ligações de dissulfeto dentro de FC5 para estabilizar sua estrutura. Confirmação de

distâncias apropriadas entre posições para mutações de cisteína e rompimento mínima de proteína interior foi obtida através de modelagem computacional. O painel superior mostra as posições das cisteínas indicadas e o painel inferior mostra os modelos com os dissulfetos formados.

[110] **A Figura 32** representa a caracterização de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 por SDS-PAGE. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 4-20% de Tris-glicina da Invitrogen. Amostras não reduzidas foram aquecidas a 95°C por 2 minutos antes da análise. Amostras reduzidas foram tratadas com tampão de amostra que contém 2% de 2-mercaptoetanol e aquecidas. Pista 1, 4D 4662; pista 2, 4D 4663; pista 3, 4D 4664; pista 4, 4D 4665; pista 5, 4D 4666; pista 6, 4D 4667; pista 7, 4D 4668; pista 8, 4D 4669; pista 9, 4D 4670; pista 10, marcadores de peso molecular alto.

[111] **A Figura 33** exibe a caracterização de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 estabilizado com dissulfeto no ensaio de transpoço de cultura celular de BBB *in vitro*. Os níveis de anticorpos na câmara inferior (15, 30, 60 e 90 min) foram determinados por MRM-ILIS. Valores são Médias ± SD de P_{APP}.

[112] **A Figura 34** é uma avaliação da susceptibilidade de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 à proteólise por SDS-PAGE. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 4-20% de Tris-glicina da Invitrogen. Amostras não reduzidas foram aquecidas a 95°C por 2 minutos antes da análise. Amostras reduzidas foram tratadas com tampão de amostra que contém 2% de 2-mercaptoetanol e aquecidas. Pista 1, H32(T34C/V79C)-G4S-Li81; pista 2, H32(T34C/V79C)-G4S-Li81 +pepsina; pista 3, H32(T33C/T103C)-G4S-Li81; pista 4, H32(T33C/T103C)-G4S-Li81 +pepsina; pista 5, Li81; pista 6, Li81+pepsina; pista 7, FC5-H32-G4S-Li81; pista 8, FC5-H32-G4S-Li81+pepsina; pista 9, marcadores de peso molecular alto.

[113] **A Figura 35** é uma avaliação da susceptibilidade de amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 à proteólise por SDS-PAGE. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 4-20% de Tris-glicina da Invitrogen. Amostras não reduzidas foram aquecidas a 95°C por 2 minutos antes da análise. Amostras reduzidas foram tratadas com tampão de amostra que contém 2% de 2-mercaptoetanol e aquecidas. Pista 1, FC5-H62(S49C/I70C)-G4S-Li81; pista 2, FC5-H62(S49C/I70C)-G4S-Li81 +Pepsina; pista 3, FC5-H62(T34C/V79C)-G4S-Li81 +pepsina; pista 4, FC5-H62(T33C/S102C) -G4S-Li81 +pepsina; pista 5, FC5-H62(T33C/T103C)-G4S-Li81 +pepsina; pista 6, FC5-H62(T33C/A104C)-G4S-Li81 +pepsina; pista 7, FC5-H62(T33C/T105C)-G4S-Li81 +pepsina; pista 8, FC5-H32-Li81-G4S-Li81 +pepsina; pista 9, Li81+pepsina; pista 10, H62-FC5-Fc; pista 11, H62-FC5-Fc+pepsina; pista 12, H32-FC5-Fc; pista 13, H32-FC5-Fc+pepsina; pista 14, Marcador de peso molecular alto. Para facilitar a análise das amostras, o painel inferior mostra uma vista expandida das pistas 1-9 da região de 100-150 kDa do SDS-PAGE não reduzido.

[114] **A Figura 36** exibe os espectros de massa desconvolutos das cadeias pesadas para as amostras reduzidas 4662, 4665, 4667 e 4668.

[115] **A Figura 37** exibe os espectros de massa desconvolutos das cadeias leves para as amostras reduzidas 4662, 4665, 4667 e 4668.

[116] **A Figura 38** é uma representação da recuperação dos peptídeos de cadeia pesada nos mapas de peptídeo não reduzidos e reduzidos. % de recuperação (eixo geométrico y) foi normalizada para os peptídeos correspondentes na amostra de controle. Peptídeos de HC que foram caracterizados estão indicados no eixo geométrico x. Peptídeo de recuperação fraca, HC 215-249; peptídeos hidrofóbicos, HC 171-192 e HC 276-338.

[117] **A Figura 39** é uma representação da recuperação dos peptídeos de cadeia leve nos mapas de peptídeo não reduzidos e

reduzidos. % de recuperação (eixo geométrico y) foi normalizada para os peptídeos correspondentes na amostra de controle. Peptídeos de LC que foram caracterizados estão indicados no eixo geométrico x.

[118] **A Figura 40** representa uma avaliação PK de soro e CSF de FC5-Li81. Amostras foram administradas IV por meio da veia caudal em 65 nmol/kg cada, e os níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados em amostras de soro (painel superior) e CSF (painel médio) da cisterna magna. Razões CSF/soro em pares (%) em cada ponto no tempo são plotadas no painel inferior. Resultados são a média de 2 animais separados.

[119] **A Figura 41** mostra uma avaliação de PK de soro das três variantes de FC5-Li81 estabilizado com dissulfeto que mostram maiores melhoramentos em estabilidade *in vitro*. Amostras foram administradas i.v. por meio da veia caudal em 65 nmol/kg cada, e níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados em soro. Resultados são a média de 2 animais separados.

[120] **A Figura 42A** representa a avaliação de níveis cerebrais das três variantes de FC5-Li81 estabilizado com dissulfeto que mostram maiores melhoramentos em estabilidade *in vitro*. Amostras foram administradas i.v. por meio da veia caudal em 65 nmol/kg cada, e níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados em amostras de soro.

[121] **A Figura 42B** representa a avaliação de níveis de CSF das três variantes de FC5-Li81 estabilizado com dissulfeto que mostram maiores melhoramentos em estabilidade *in vitro*. Amostras foram administradas i.v. por meio da veia caudal em 65 nmol/kg cada, e níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados em amostras de CSF da cisterna magna.

[122] **A Figura 42C** mostra uma plotagem das razões de CSF/soro em pares (%) das três variantes de FC5-Li81 estabilizadas com

dissulfeto em cada ponto no tempo. Resultados são a média de 2 animais separados.

[123] **A Figura 42D** representa os níveis cerebrais das três variantes de FC5-Li81 estabilizadas com dissulfeto medidos no ponto no tempo de 24 h.

[124] **A Figura 43A** mostra uma avaliação de PK de soro e CSF de FC5-Li81 em ratos. Amostras foram administradas i.v. por meio da veia caudal em 65 nmol/kg cada, e níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados em amostras de soro por MRM. Resultados são a média de 2-3 animais separados. Esquemas de projetos moleculares são mostrados na esquerda.

[125] **A Figura 43B** mostra uma avaliação de PK de soro e CSF de FC5-Li81 em ratos. Amostras foram administradas IV por meio da veia caudal em 65 nmol/kg cada, e níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados em amostras de CSF da cisterna magna. Resultados são a média de 2-3 animais separados. Esquemas de projetos moleculares são mostrados na esquerda.

[126] **A Figura 43C** mostra razões de CSF/soro em pares (%) dos dados plotados nas Figuras 43A e 43B. Resultados são a média de 2-3 animais separados. Esquemas de projetos moleculares são mostrados na esquerda.

[127] **A Figura 44** mostra uma avaliação de PK de soro e CSF de FC5-H62(T33C/A104C)-Li81 (linhas sólidas) contra Li81 (linhas tracejadas) em macacos cinomolgos (n = 12). Artigos de teste foram administrados por meio de injeção de bolo IV única em 65 nmol/kg, e níveis de anticorpo em pontos no tempo indicados após a injeção foram determinados por nanoLC-MRM em amostras de soro (painel superior) e CSF (painel médio). Razões de CSF/soro em pares também são plotadas (painel inferior).

[128] **A Figura 45A** mostra um gráfico de ELISA de ligação direta de beta amiloide de FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A. Peptídeo de beta amiloide sintética (aa 1-40) foi revestido em placas de ELISA, exposto a diversas diluições de reagentes de teste, e a ligação de anticorpo nas concentrações indicadas foi detectada com um anti-hIgG conjugado com HRP secundário, medido por absorção em 450 nm. Valores de EC50 calculados a partir do ajuste dos dados em uma curva sigmoide são indicados.

[129] **A Figura 45B** mostra resultados de ensaio de transpoço de célula endotelial cerebral imortalizada com SV40 (*svARBEC*) gravados pela medição de concentrações de anticorpo de fundo de poço por MRM (médias ± SD de permeabilidade aparente, P_{APP}, para n = 3 repetições). Anticorpo de controle em cada poço foi IgG1 murino anti-HEL. hFC5.2 é FC5-H62(T33C/A104C).

[130] **A Figura 45C** mostra resultados de ensaio de transpoço de célula endotelial cerebral derivada de iPSC humano gravados pela medição de concentrações de anticorpo de fundo de poço por MRM (médias ± SD de permeabilidade aparente, P_{APP}, para n = 3 repetições). Anticorpo de controle em cada poço foi IgG1 murino anti-HEL. hFC5.2 é FC5-H62(T33C/A104C).

[131] **A Figura 46A** é um gráfico que mostra ELISA de ligação direta de alfa-sinucleína. Alfa-sinucleína humana foi revestida em placas de ELISA, tratada com diversas diluições de reagentes de teste, e a ligação de anticorpo nas concentrações indicadas foi detectada com um anti-hIgG conjugado com HRP secundário, medido por absorção em 450 nm. Valores de EC50 calculados a partir do ajuste dos dados em uma curva sigmoide são indicados. hFC5.2 é FC5-H62(T33C/A104C).

[132] **A Figura 46B** é um gráfico de barras de resultados de ensaio de transpoço de SVARBEC gravados pela medição de concentrações de anticorpo de fundo de poço por MRM. Dados são plotados como uma

razão de P_{APP} para anticorpo de teste sobre controle de mIgG1 anti-HEL em poço (médias ± SD para n = 3 repetições); P_{APP} para anti-HEL foi <1,5 $x10^{-5}$ cm/min para todos os poços. hFC5.2 é FC5-H62(T33C/A104C).

[133] **A Figura 47A** mostra os resultados de ELISA de ligação direta de Tau. Tau humano foi revestido em placas de ELISA, tratado com diversas diluições de reagentes de teste, e o anticorpo ligado foi detectado com um anti-hIgG conjugado com HRP secundário, medido por absorção em 450 nm. Valores de EC50 calculados a partir do ajuste dos dados em uma curva sigmoide são indicados. hFC5.2 é FC5-H62(T33C/A104C).

[134] **A Figura 47B** é um gráfico de barras de resultados de ensaio de transpoço de SVARBEC gravados pela medição de concentrações de anticorpo de fundo de poço por MRM. Dados são plotados como uma razão de P_{APP} para anticorpo de teste sobre controle de mIgG1 anti-HEL em poço (médias ± SD para n = 3 repetições); P_{APP} para anti-HEL foi <1,5 $x10^{-5}$ cm/min para todos os poços. hFC5.2 é FC5-H62(T33C/A104C).

[135] **A Figura 48** é uma validação da susceptibilidade reduzida de fusões de FC5 e anticorpo modificadas geneticamente com dissulfeto para digestão de pepsina. *Esquerda*: Análise de SDS-PAGE de FC5-H62(T33C/A104C) fundido ao Li81 hIgG1 agly, 12F4 hIgG1 e 12F4 hIgG1 agly, com e sem digestão de pepsina por 1 h a 37 °C. FC5-H32-Li81 hIgG1 agly mostra digestão aumentada conforme indicado por fragmentos de peso molecular mais inferiores (setas). *Direta*: Análise de SDS-PAGE de digestões de pepsina (2,5 h a 37 °C) de FC5-H62(T33C/A104C) ou FC5-H32 fundido ao Li81 hIgG1 agly e 12F6A hIgG1.

[136] **A Figura 49** é uma representação esquemática de formatos de fusão de FC5 bivalente ilustrativos não limitantes.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[137] Entrega de fármacos no sistema nervoso central (SNC) foi um problema central no tratamento de doenças neurológicas uma vez que a barreira hematoencefálica (BBB) é uma barricada que evita que a maioria das moléculas terapêuticas entre no cérebro. Sem acesso ao cérebro, o potencial terapêutico dessas moléculas pode ser comprometido ou eliminado.

[138] Esta divulgação é com base, em parte, em moléculas que compreendem FC5 humanizado assim como FC5 modificado geneticamente com dissulfeto. Essas moléculas são úteis para transportar uma "carga" de interesse, tal como um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno, um peptídeo, uma enzima e um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso) para o SNC. Em algumas modalidades, essas moléculas atravessam por transcitose a BBB. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam (ou que são modificadas para não expressar) TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em comparação com FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1). Cada um dos formatos de agente terapêutico de FC5 (por exemplo, anticorpo) que incluem formatos de FC5 monovalentes ilustrados esquematicamente na Figura 48 são englobados pela presente divulgação

FC5 HUMANIZADO

[139] FC5 é um anticorpo de domínio único de camelídeo que pode atravessar por transcitose a BBB e pode entregar moléculas bioativas ao SNC (consultar, por exemplo, Muruganandam et al., FASEB J., 16:240-242 (2002); Abulrob et al., J Neurochem., 95:1201-1214 (2005); Haqqani et al., Mol. Pharmaceutics, 10:1542-1556 (2013);

Farrington et al., FASEB J., 28:4764-4778 (2014); documento de Patente Nº U.S. 9.676.849). A sequência de aminoácidos do FC5 de tipo selvagem é fornecida na **SEQ ID Nº:1**.

[140] FC5 tem reação cruzada com espécies e pode se ligar às células endoteliais de cérebro de rato, mouse e ser humano. Esta divulgação apresenta, entre outros, domínios variáveis de anticorpo de FC5 humanizado. Esses domínios variáveis de anticorpo de FC5 humanizado reduzem o potencial risco de imunogenicidade humana de FC5, enquanto mantém a solubilidade e estabilidade. Os domínios variáveis de anticorpo de sequência de FC5 têm graus variados de homologia com o framework de consenso de VH3 humano.

[141] O framework de domínio de VHH de camelídeo é altamente homólogo à família de VH3 humano de frameworks de domínio variável de cadeia pesada. Para construir um framework de consenso de VH3 humano, um alinhamento de sequência múltipla (MSA) foi obtido com Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), que resumiu todos os genes de VH3 funcional e de ORF humanos depositados em IMGT até 25 de agosto de 2014. O framework de consenso foi definido como a sequência do aminoácido de maior frequência em cada posição do MSA, e combinado com o primeiro alelo do gene JH4 humano (IGHJ4*01, nomenclatura IMGT) para obter o framework de um domínio de VH completo. Nas regiões de framework 1, 2 e 3, o framework de consenso é idêntico àquele do quarto alelo do gene VH3 humano IGHV3-23*04. FC5 tem 15 resíduos de framework que se diferem do framework de consenso de VH3 humano. Resíduos de camelídeos 37, 44, 45 e 47 estão na superfície que corresponde à interface de VH/VL em IgG humano. Esses resíduos podem afetar fortemente a solubilidade, níveis de expressão ou afinidade de ligação do anticorpo de domínio único, porém, esses efeitos também dependem das CDRs de cada anticorpo de domínio único individual.

[142] As regiões de determinação de complementariedade (CDRs) de FC5 de tipo selvagem estão localizadas nas posições 23-35 (CDR1), 50-66 (CDR2) e 97-111 (CDR3) da SEQ ID Nº:1 e são fornecidas abaixo:

[143] CDR1 de FC5 de tipo selvagem: AASGFKITHYTMG (**SEQ ID Nº:47**)

[144] CDR2 de FC5 de tipo selvagem: RITWGGDNTFYSNSVKG (**SEQ ID Nº: 50**)

[145] CDR3 de FC5 de tipo selvagem: AAGSTSTATPLRVDY (**SEQ ID Nº:51**).

[146] Em algumas modalidades, os polipeptídeos FC5 desta divulgação têm uma CDR1 selecionada dentre uma das sequências de aminoácidos listadas abaixo.

[147] AASGFKITHYT**T**G (**SEQ ID Nº:57**)

[148] AASGFKITHYT**C**G (**SEQ ID Nº:48**)

[149] AASGFKITHY**C**MG (**SEQ ID Nº:58**)

[150] AASGFKITHY**CT**G (**SEQ ID Nº:49**)

[151] Em determinadas modalidades, os polipeptídeos FC5 desta divulgação têm uma CDR3 selecionada dentre uma das sequências de aminoácidos listadas abaixo.

[152] AAGST**C**TATPLRVDY (**SEQ ID Nº:52**)

[153] AAGSTS**C**ATPLRVDY (**SEQ ID Nº:53**)

[154] AAGSTST**C**TPLRVDY (**SEQ ID Nº:54**)

[155] AAGSTSTA**C**PLRVDY (**SEQ ID Nº:55**)

[156] Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:47 com duas ou menos (por exemplo, 2, 1, 0) substituições de aminoácido, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na

SEQ ID Nº:50 com duas ou menos substituições de aminoácido, e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:51 com duas ou menos substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:47 com duas ou menos (por exemplo, 2, 1, 0) substituições de aminoácido, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:51 com duas ou menos substituições de aminoácido. Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:47 com uma ou nenhuma substituição de aminoácido, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 com uma ou nenhuma substituição de aminoácido e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:51 com uma ou nenhuma substituição de aminoácido. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:47 com uma ou nenhuma substituição de aminoácido, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:51 com uma ou nenhuma substituição de aminoácido. Os domínios variáveis de anticorpo descritos acima podem ser humanizados. Em alguns casos, em todas as modalidades acima, as substituições de

aminoácido ocorrem em uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) das posições 33, 34, 102, 103, 104 ou 105 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades, essas moléculas atravessam por transcitose a BBB. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[157] Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:57, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:52. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:57, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:53. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:57, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:54. Em outras modalidades, o domínio

variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:57, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:55. Em algumas modalidades, essas moléculas atravessam por transcitose a BBB. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[158] Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:48, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:52. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:48, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:53. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos

apresentada na SEQ ID Nº:48, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:54. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:48, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:55. Em algumas modalidades, essas moléculas atravessam por transcitose a BBB. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[159] Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:58, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:52. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:58, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou

consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:53. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:58, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:54. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:58, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:55. Em algumas modalidades, essas moléculas atravessam por transcitose a BBB. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[160] Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:49, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:52. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um

polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:49, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:53. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:49, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:54. Em outras modalidades, o domínio variável de anticorpo desta divulgação compreende um polipeptídeo que compreende uma CDR1 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:49, uma CDR2 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:50 e uma CDR3 que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:55. Em algumas modalidades, essas moléculas atravessam por transcitose a BBB. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam (ou que são modificadas para não expressar) TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[161] Em alguns casos, o polipeptídeo FC5 humanizado desta divulgação compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% (por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo

menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%) idêntica à sequência apresentada na SEQ ID Nº:1. Em um caso, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% idêntica à sequência apresentada na SEQ ID Nº:1. Esses polipeptídeos FC5 humanizados têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica e, assim, podem transportar uma "carga" (por exemplo, uma porção química bioativa tal como anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um fármaco de molécula pequena, um oligonucleotídeo antisenso, uma enzima, um peptídeo) ao SNC. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam (ou que são modificadas para não expressar) TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1). Em algumas modalidades, esses polipeptídeos FC5 têm substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em trinta ou menos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30) aminoácidos da SEQ ID Nº:1. Em determinadas modalidades, esses polipeptídeos FC5 têm substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) dentre as posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1. A divulgação engloba domínios variáveis de anticorpo FC5 com substituições em todas as permutações possíveis das nove posições acima da SEQ ID Nº:1. Exemplos sem limitação das posições da SEQ ID Nº:1 que podem ser substituídas incluem: 5 e 6; 5, 6, e 14;

5, 6, 14, e 75; 5, 6, 14, 75, e 87; 5, 6, 14, 75, 87, e 88; 5, 6, 14, 75, 87, 88, e 93; 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, e 114; 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114, e 117; 5 e 14; 5, 14, e 75; 5, 14, 75, e 87; 5, 14, 75, 87, e 88; 5, 14, 75, 87, 88, e 93; 5, 14, 75, 87, 88, 93, e 114; 5, 14, 75, 87, 88, 93, 114, e 117; 5 e 75; 5, 75, e 87; 5, 75, 87, e 88; 5, 75, 87, 88, e 93; 5, 75, 87, 88, 93, e 114; 5, 75, 87, 88, 93, 114, e 117; 5 e 87; 5, 87, e 88; 5, 87, 88, e 93; 5, 87, 88, 93, e 114; 5, 87, 88, 93, 114, e 117; 5 e 88; 5, 88, e 93; 5, 88, 93, e 114; 5, 88, 93, 114, e 117; 5 e 93; 5, 93, e 114; 5, 93, 114, e 117; 5 e 114; 5, 114, e 117; e 5 e 117. Em algumas modalidades, os domínios variáveis de anticorpo descritos acima incluem, adicionalmente, uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47, uma CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, e uma CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51. Em outras modalidades, esses domínios variáveis de anticorpo incluem, adicionalmente, uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:57, uma CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, e uma CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51. Em algumas modalidades, os domínios variáveis de anticorpo compreendem um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) dentre: valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1; ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1; prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1; serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1; arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1; alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1; glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1. Os domínios variáveis de anticorpo descritos acima podem

compreender substituições de aminoácido adicionais, tais como aquelas descritas abaixo.

[162] Em determinadas modalidades, os domínios variáveis de anticorpo têm substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) dentre as posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1. A divulgação engloba domínios variáveis de anticorpo com substituições em todas as permutações possíveis das seis posições acima da SEQ ID Nº:1.

[163] Em alguns casos, os domínios variáveis de anticorpo descritos acima compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 44 e 45 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1 e/ou leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[164] Em determinados casos, os domínios variáveis de anticorpo desta divulgação compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 1, 44 e 45 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um

ou mais (por exemplo, 1, 2 ou 3) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[165] Em outros casos, os domínios variáveis de anticorpo desta divulgação compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2 ou 3) dentre: glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; ou triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[166] Em alguns casos, os domínios variáveis de anticorpo desta

divulgação compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 1, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3 ou 4) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; ou triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[167] Em determinados casos, os domínios variáveis de anticorpo desta divulgação compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3 ou 4) dentre: valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; ou triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB -

Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[168] Em alguns casos, os domínios variáveis de anticorpo desta divulgação compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; ou triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[169] Em outros casos, os domínios variáveis de anticorpo desta divulgação compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) dentre: valina na posição que

corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[170] Em alguns casos, os domínios variáveis de anticorpo descritos acima compreendem adicionalmente substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45, 47 ou 79 da SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1. Esses domínios variáveis de anticorpo têm capacidade para transmigrar pela barreira hematoencefálica. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não

expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[171] Exemplos sem limitação ilustrativos de moléculas de FC5 humanizado são descritos no Exemplo 4 desta divulgação. Em determinados casos, um polipeptídeo FC5 humanizado compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs.:10-17, em que a molécula de FC5 humanizado pode realizar transcitose pela BBB. Em uma modalidade, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:10. Em outra modalidade, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:11. Em outra modalidade, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:12. Em ainda outra modalidade, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:13. Em uma modalidade diferente, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:14. Em outra modalidade, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:15. Em ainda outra modalidade, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:16. Em algumas modalidades, o polipeptídeo FC5 humanizado compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:17. A atividade biológica de variantes de FC5 humanizado pode ser avaliada com o uso, por exemplo, do ensaio de cultura celular de transpoço de BBB in vitro com o uso de células SV-ARBEC, conforme descrito no Exemplo 2 desta divulgação.

ESTABILIZAÇÃO DE FC5

[172] Conforme mostrado no Exemplo 3 da presente divulgação, FC5 pode ser lábel em soro. Proteólise pode ocorrer em um ou mais sítios dentro de FC5 quando exposto ao soro. Estabilização de FC5 pode reduzir sua susceptibilidade à degradação proteolítica de modo que o FC5 possa ser desenvolvido para uso clínico. Em uma modalidade, as moléculas de FC5 desta divulgação são estabilizadas introduzindo-se uma segunda ligação de dissulfeto dentro da molécula de FC5.

[173] FC5 isolado de uma biblioteca de anticorpo de domínio único de lhama virgem contém uma única ligação de dissulfeto. Cerca de metade das linhas germinativas de VHH dentre todas as espécies de camelídeos contêm um terço de cisteína, assim se fornece a aquisição de um quarto de cisteína durante hipermutação somática, e diversos VHHs de camelídeos têm dois dissulfetos.

[174] Diversas estratégias foram buscadas para adicionar uma segunda ligação de dissulfeto ao FC5, além da cisteína formada por Cys22 e Cys96 que é comum a todos os domínios variáveis de imunoglobulina. Em uma primeira estratégia, FC5 foi modificado geneticamente para incluir um segundo dissulfeto formado por cisteínas nas posições 34 e 79 (a numeração de posição é com base na Figura 1), que conectam as fitas β, C e E, dentro das regiões de framework 2 e 3, respectivamente. C34 está na extremidade de CDR-H1, no começo de fita β C. Esse dissulfeto está localizado no interior do glóbulo de proteína e pode melhorar temperaturas de fusão térmica (Tm) entre 4 e 18ºC. Uma segunda estratégia envolveu combinar posições interiores espacialmente próximas que podem acomodar cisteínas de formação de dissulfeto. Essa estratégia depende das posições 49 e 70 (a numeração de posição é com base na Figura 1), fitas de conexão C' e E, novamente em regiões de framework 2 e 3. Para essa estratégia, Tm

pode ser melhorada entre 6 e 19ºC. Uma terceira estratégia de estabilização de dissulfeto foi conectar posição voltadas para o exterior 33 na CDR-H1 com várias posições na CDR-H3 (posições 102, 103, 104 e 105), que em VHH é frequentemente dobrada sobre o flanco que corresponde à interface de VH/VL em anticorpos convencionais. Portanto, essa ligação de dissulfeto entrelaçada é parcialmente exposta ao solvente.

[175] A divulgação apresenta um domínio variável de anticorpo que transmigra pela barreira hematoencefálica e que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou 100% idêntica) à SEQ ID Nº:1. Em alguns casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51, e a sequência de aminoácidos compreende cisteínas nas posições que correspondem às posições 49 e 70 da SEQ ID Nº:1. Em outros casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:48, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51, e a sequência de aminoácidos compreende cisteína na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:52. Em alguns casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58, CDR2 que

compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:52. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:53. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:53. Em alguns casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:54. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:54. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:55. Em ainda outro caso, o domínio variável de anticorpo compreende uma CDR1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:55. Em algumas modalidades, essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que

são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[176] Os domínios variáveis de anticorpo descritos acima podem incluir trinta ou menos (por exemplo, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) substituições de aminoácido relativas à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:1. Em determinados casos, as substituições de aminoácido são substituições de aminoácido conservativas. Em alguns casos, o domínio variável de anticorpo compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições em uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) dentre as posições que correspondem às posições 1, 5, 6, 14, 37, 44, 45, 47, 75, 87, 88, 93, 114 ou 117 da SEQ ID Nº:1. Em determinados casos, a sequência de aminoácidos compreende um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) dentre: ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1; ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1; prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1; glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1; arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1; alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1; valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1; glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1. Em algumas modalidades,

essas moléculas podem se ligar direta ou indiretamente ao TMEM30A humano (UniProtKB - Q9NV96). Em determinadas modalidades, essas moléculas se ligam melhor às células que expressam TMEM30A do que às células que não expressam ou que são modificadas para não expressar TMEM30A. Em algumas modalidades, essas moléculas têm labilidade reduzida em soro humano em relação ao FC5 de tipo selvagem (SEQ ID Nº:1).

[177] A estratégia de estabilização de dissulfeto pode ser empregue com FC5 de tipo selvagem ou uma molécula de FC5 humanizado. Exemplo 5 desta divulgação fornece exemplos sem limitação de domínios variáveis de anticorpo estabilizados com dissulfeto. Essa divulgação engloba um domínio variável de anticorpo que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NOs.:20-28, em que o domínio variável de anticorpo pode realizar transcitose pela BBB. Em uma modalidade, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:20. Em outra modalidade, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:21. Em outra modalidade, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:22. Em ainda outra modalidade, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:23. Em outra modalidade, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:24. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:25. Em outra modalidade, o domínio variável de anticorpo

estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:26. Em outra modalidade, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:27. Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo estabilizado com dissulfeto tem uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID Nº:28.

MOLÉCULAS QUIMÉRICAS

[178] Esta divulgação também apresenta moléculas quiméricas que compreende qualquer um dos domínios variáveis de anticorpo divulgados no presente documento (por exemplo, domínios variáveis de anticorpo humanizados, estabilizados com dissulfeto ou humanizados e estabilizados com dissulfeto). Em determinadas modalidades, a molécula quimérica compreende uma porção química dimérica (por exemplo, Fc) ou outra proteína de fusão (por exemplo, albumina de soro humano (HSA) – nota-se que albumina não é dimérica, porém, pode ser fundida em seu terminal N e/ou C). Em alguns casos, o C terminal de um domínio variável de anticorpo divulgado no presente documento é direta ou indiretamente ligado ao N terminal de cada membro da porção química dimérica. Em determinados casos, a molécula quimérica compreende um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo, um anticorpo de cadeia única, um peptídeo, uma enzima, um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso), um fármaco de molécula pequena, ou um lipossoma ou uma nanopartícula lipídica que encapsula uma porção química bioativa, tal como um ácido nucleico, fármaco de molécula pequena ou peptídeo. Exemplos sem limitação de fusões quiméricas desta divulgação são fornecidos em forma esquemática na **Figura 48**.

REGIÃO DE FC

[179] Em alguns casos, a molécula quimérica inclui uma região de

Fc de anticorpo. Conforme usado no presente documento, o termo "região de Fc" é definido como a porção de uma imunoglobulina formada pela associação dimérica dos respectivos domínios de Fc (ou porções químicas de Fc) de suas duas cadeias pesadas. Uma região de Fc nativa é homodimérica e compreende duas cadeias de polipeptídeo. As regiões de Fc desta divulgação podem ser um homodímero (domínios de Fc idênticos) ou um heterodímero (domínios de Fc não idênticos). Conforme usado no presente documento, o termo "domínio de Fc" ou "porção química de Fc" se refere a uma única cadeia de polipeptídeo de uma imunoglobulina que compreende um domínio de CH2 e um domínio de CH3, ou uma variante dos mesmos. Em algumas modalidades, a região de Fc é de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana ou IgG4 humana. Em determinadas modalidades, a região de Fc é aglicosilada (por exemplo, N297Q ou T299A). Em determinadas modalidades, a região de Fc é uma região de Fc de IgG1 agly humana. Em determinadas modalidades, a região de Fc contém um domínio de CH2 de IgG4P agly humana e um domínio de CH3 de IgG1 humana. Em determinados casos, a região de Fc ou domínio de Fc reduziu função efetora em relação sua contrapartida de tipo selvagem. Anticorpos de IgG existem em vários alótipos e isoalótipos e cada um desses estão englobados pela presente divulgação. Em determinadas modalidades, uma região de Fc da presente divulgação inclui um Fc de cadeia pesada de IgG1 que tem um alótipo de G1m1; nG1m2; G1m3; G1m17,1; G1m17,1,2; G1m3,1; ou G1m17. Esses alótipos ou isoalótipos são caracterizados pelos seguintes resíduos de aminoácido nas posições indicadas dentro da região constante de cadeia pesada de IgG1 (Fc) (numeração europeia): G1m1: D356, L358; nG1m1: E356, M358; G1m3: R214, E356, M358, A431; G1m17,1: K214, D356, L358, A431; G1m17,1,2: K214, D356, L358, G431; G1m3,1: R214, D356, L358, A431; e G1m17: K214, E356, M358, A431. Sequências de domínio de Fc exemplificativas são fornecidas abaixo:

[180] *Fc de IgG1 (IgG1m3):*
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:61**)

[181] *Fc de IgG1 agly (deve-se entender que outras versões de agly, tais como T299A, podem ser empregadas)*:
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:62**)

[182] *Fc de IgG2*:
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:63**)

[183] *Fc de IgG2 SAA*:
APPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:64**)

[184] Nota-se que a versão "SAA" também inclui uma mutação C222S na articulação: ERK**S**CVECPPCP (**SEQ ID Nº:95**)

[185] *Fc de IgG3*:
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:65**)

[186] *Fc de IgG4*:
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (**SEQ ID Nº:66**)

[187] *Fc de IgG4 agly/G1*:
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:67**)

[188] Em determinados casos, os domínios de Fc podem incluir uma ou mais mutações em relação ao domínio de Fc de tipo selvagem. Por exemplo, a uma ou mais mutações podem ser feitas para: diminuir a função efetora, aumentar a estabilidade, melhorar a farmacocinética e/ou aumentar a meia-vida. Em determinados casos, o resíduo mais C terminal de cada domínio de Fc de IgG1 é deletado (isto é, a lisina final é removida) uma vez que pode haver splicing e/ou clivagem enzimática nessa lisina de C terminal que pode resultar na heterogeneidade de produto. Em determinados casos, o resíduo mais C terminal do domínio de Fc de IgG1 é um resíduo de lisina. Em determinados casos, o resíduo mais C terminal do domínio de Fc de IgG1 é alterado de uma lisina para um resíduo de cisteína. Isso permite a conjugação de sítio de C terminal. Em alguns casos, o domínio de Fc compreende a mutação S442C (numeração de acordo com o índice europeu). Em alguns casos, a mutação (ou mutações) pode ser introduzida para promover

heterodimerização (por exemplo, que compreende mutações do tipo protuberâncias-em-buracos, mutações de condução elétrica, mutações do tipo DuoBody, etc.). Tais mutações são bem conhecidas na técnica. Consultar, por exemplo, Ridgway et al., Protein Engineering 9(7):617-21 (1996); documentos Nº U.S. 5.807.706; U.S. 9.862.778; WO2017/106462; Labrijn et al, PNAS, 110(13):5145-5150 (2013); Gramer et al. mAbs, 5(6): 962–973 (2013); Labrijn et al. Nature Protocols, 9(10):2450-63 (2014).78jj

[189] *Domínios de Fc que Compreendem Mutações do tipo Protuberâncias-em-Buracos*:

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**S**C**A**V**K** GFYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**V**S**K**LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:68**)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**W**C**L**V**K** GFYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**Y**S**K**LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:69**)

[190] *Domínios de Fc que Compreendem Mutações de Condução Elétrica*:

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**T**C**L**V**K**G FYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**Y**S**D**LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:70**)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**T**C**L**V**K**G

FYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**K**SDGSF**F**L**Y**S**K**LTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:71**)

[191] Domínios de Fc que Compreendem Mutações do tipo DuoBody:

[192] Par 1:

[193] Kuhlman Demarest 20.8.34: lado "a"

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**ST**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**M**C**L**V**Y**
GFYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**Y**S**V**LTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:72**)

[194] Kuhlman Demarest 20.8.34: lado "b"

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**GD**LTKNQV**Q**L**T**C**L**V**K**
GFYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**A**S**K**LTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:73**)

[195] Par 2:

[196] Kuhlman Demarest 7.8.60: lado "a"

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**T**C**L**V**D**G
FYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**M**SDGSF**F**L**A**S**K**LTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:96**)

[197] Kuhlman Demarest 7.8.60: lado "b"

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**R**P**R**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**V**CLV**K**G
FYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**Y**S**V**LTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:97**)

[198] **PAR 3:**

[199] MP43a: S364K/K409L

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**K**L**T**C**L**V**K**GFYPSDI AVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**Y**S**L**LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:98**)

[200] MP43b: K370S/F405K

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YT**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**T**C**L**V**S**G FYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**K**L**Y**S**K**LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:99**)

[201] Par 4:

[202] ZW1a: T350V/L351Y/F405A/Y407V

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YVY**PP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**T**C**L**V**K** GFYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**T**T**PP**V**L**D**SDGSF**A**L**V**S**K**LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:100**)

[203] ZW1b: T350V/T366L/K392L/T394W

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR**E**P**Q**V**YV**LPP**S**R**DE**LTKNQV**S**L**L**C**L**V**K**G FYPSDIAVEWESNGQPENNY**L**T**W**PP**V**L**D**SDGSF**F**L**Y**S**K**LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID Nº:101**)

[204] Em determinados casos, uma região de Fc tem domínios de Fc que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idênticos a qualquer uma das SEQ ID Nºs.:61-101. Em determinadas modalidades, a região de Fc tem função efetora inferior à região de Fc de tipo selvagem correspondente.

REGIÃO DE ARTICULAÇÃO

[205] Em determinados casos, a molécula quimérica pode incluir uma região de articulação de anticorpo. Em alguns casos, a molécula quimérica inclui uma região de articulação de anticorpo e uma região de Fc de anticorpo. A região de articulação pode ser fundida diretamente ou por meio de um ligante a uma porção química de Fc. Por exemplo, a articulação conecta o terminal C de um domínio variável de anticorpo descrito acima e o terminal N de um domínio de CH2 de um domínio de Fc. A região de articulação pode ser qualquer sequência de peptídeo flexível de um a 30 aminoácidos (isto é, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30) em comprimento. Em alguns casos, a região de articulação tem um a 20 aminoácidos em comprimento. Em outros casos, a região de articulação tem um a 18 aminoácidos em comprimento. Em alguns casos, a região de articulação é a articulação de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana ou IgG4 humana. Em determinados casos, essas regiões de articulação podem ser modificadas geneticamente para incluir uma ou mais substituições de aminoácido (por exemplo, S228P em IgG4). Em determinados casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos AEPKSCD (**SEQ ID Nº:56**). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos AEPKSSD (**SEQ ID Nº:59**). Em ainda outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos KTHTCPPCP (**SEQ ID Nº:19**). Em determinados casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos AEPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID Nº:74**). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos AEPKSSDKTHTCPPCP (**SEQ ID Nº:75**). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos GGGGSDKTHTCPPCP (**SEQ ID Nº:76**). Em alguns casos, a região de

articulação compreende a sequência de aminoácidos VERKCCVECPPCP (**SEQ ID Nº:102**). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos VESKYGPPCPSCP (**SEQ ID Nº:103**). Em outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos ELKTPLGDTTHTCPRCP (**SEQ ID Nº:104**). Em ainda outros casos, a região de articulação compreende a sequência de aminoácidos EPKSCDTPPPCPRCP (**SEQ ID Nº:105**).

[206] Em determinadas modalidades, a molécula quimérica se homodimeriza ou heterodimeriza com outra molécula quimérica. Por exemplo, se os domínios de Fc da molécula quimérica são idênticos os mesmos homodimerizam para formar uma região de Fc homodimérica. Caso, no entanto, os domínios de Fc da molécula quimérica não sejam idênticos (por exemplo, contenham mutações do tipo protuberância-em-buraco, de condução elétrica ou DuoBody) os mesmos heterodimerizam para formar uma região de Fc heterodimérica. O terminal C dos domínios variáveis de anticorpo da divulgação pode ser ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N de uma região de articulação que, por sua vez, é ligada por meio de seu terminal C ao terminal N de um domínio de CH2 de um domínio de Fc.

LIGANTES

[207] Em alguns casos, a molécula quimérica inclui um ou mais ligantes. Não há limitação particular sobre os ligantes que ligam diferentes regiões da molécula quimérica (por exemplo, ligam o domínio variável de anticorpo ao terminal N do domínio de VH ou VL de um anticorpo terapêutico; ligam o domínio variável de anticorpo a uma porção química terapêutica; ligam o terminal C de um domínio de Fc de uma região de Fc ao terminal N de um anticorpo terapêutico ou fragmento do mesmo; ligam o terminal C de um domínio de Fc de uma

região de Fc a uma porção química terapêutica; ligam o domínio variável de anticorpo a uma região de articulação). Em algumas modalidades, o ligante é um ligante de peptídeo. Qualquer peptídeo de cadeia única arbitrário que compreende cerca de um a 30 resíduos de aminoácido (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 resíduos de aa) pode ser usado como um ligante. Exemplos de tais ligantes de peptídeo incluem: Gly; Ser; Gly Ser; Gly Gly Ser; Ser Gly Gly; Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID Nº:77**); Ser Gly Gly Gly (**SEQ ID Nº:78**); Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID Nº:5**); Ser Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID Nº:79**); Gly Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID Nº:80**); Ser Gly Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID Nº:81**); Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID Nº:82**); Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID Nº:83**); $(Gly\ Gly\ Gly\ Gly\ Ser)_n$ ($(SEQ\ ID\ Nº:5)_n$, em que n é um número inteiro de um ou mais; e $(Ser\ Gly\ Gly\ Gly\ Gly)_n$ ($(SEQ\ ID\ Nº:79)_n$, em que n é um número inteiro de um ou mais.

[208] Em outras modalidades, os peptídeos ligantes são modificados de modo que a sequência de aminoácidos GSG (que ocorre na junção das repetições de ligante Gly/Ser tradicionais) não esteja presente. Por exemplo, o ligante de peptídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em: $(GGGXX)_nGGGGS$ (**SEQ ID Nº:84**) e $GGGGS(XGGGS)_n$ (**SEQ ID Nº:85**), em que X é qualquer aminoácido que possa ser inserido na sequência e não resulte em um polipeptídeo que compreende a sequência GSG, e n é de 0 a 4. Em uma modalidade, a sequência de um peptídeo ligante é $(GGGX_1X_2)_nGGGGS$ e X_1 é P e X_2 é S e n é de 0 a 4 (**SEQ ID Nº:86**). Em outra modalidade, a sequência de um peptídeo ligante é $(GGGX_1X_2)_nGGGGS$ e X_1 é G e X_2 é Q e n é de 0 a 4 (**SEQ ID Nº:87**). Em outra modalidade, a sequência de um peptídeo ligante é $(GGGX_1X_2)_nGGGGS$ e X_1 é G e X_2 é A e n é de 0 a 4 (**SEQ ID Nº:88**). Em ainda outra modalidade, a sequência de um peptídeo ligante é

GGGGS(XGGGS)$_n$, e X é P e n é de 0 a 4 (**SEQ ID Nº:89**). Em uma modalidade, um peptídeo ligante da invenção compreende ou consiste na sequência de aminoácidos (GGGGA)$_2$GGGGS (**SEQ ID Nº:90**). Em outra modalidade, um peptídeo ligante compreende ou consiste na sequência de aminoácidos (GGGGQ)$_2$GGGGS (**SEQ ID Nº:91**). Em ainda outra modalidade, um peptídeo ligante compreende ou consiste na sequência de aminoácidos (GGGPS)$_2$GGGGS (**SEQ ID Nº:92**). Em uma modalidade adicional, um peptídeo ligante compreende ou consiste na sequência de aminoácidos GGGGS(PGGGS)$_2$ (**SEQ ID Nº:93**).

[209] Em determinadas modalidades, o ligante é um ligante de composto sintético (agente de reticulação química). Exemplos de agentes de reticulação incluem N-hidroxissuccinimida (NHS), dissuccinimidilsuberato (DSS), bis(sulfossuccinimidil)suberato (BS3), ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP), ditiobis(sulfossuccinimidilpropionato) (DTSSP), bis(succinimidilsuccinato) de etilenoglicol (EGS), bis(sulfossuccinimidilsuccinato) de etilenoglicol (sulfo-EGS), tartrato de dissuccinimidila (DST), tartrato de dissulfossuccinimidila (sulfo-DST), bis[2-(succinimido-oxicarboniloxi)etil]sulfona (BSOCOES), bis[2-(sulfossuccinimido-oxicarboniloxi)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES), reticuladores da série sulfo-SMCC e série bismaleimido-hexano (BMH).

XTEN

[210] Em alguns casos, as moléculas quiméricas incluem uma sequência XTEN. "Sequência XTEN" se refere aos polipeptídeos de comprimento estendido de ocorrência não natural, sequências substancialmente não repetitivas que são compostas principalmente por pequenos aminoácidos hidrofílicos, em que a sequência tem um baixo grau de, ou nenhuma estrutura secundária ou terciária sob condições fisiológicas. Como um parceiro de molécula quimérica, XTENs podem servir como um carreador que confere determinadas propriedades

farmacocinéticas, físico-químicas e farmacêuticas desejáveis quando ligado a um fator de coagulação, uma cadeia pesada de um fator de coagulação, uma cadeia leve ou um fator de coagulação, uma porção química de alvejamento, ou quaisquer outras sequências ou moléculas na molécula quimérica. Tais propriedades desejáveis incluem, porém, sem limitação, parâmetros farmacocinéticos intensificados e características de solubilidade.

[211] Em algumas modalidades, a sequência XTEN da invenção é um peptídeo ou a polipeptídeo que mais que cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 ou 2000 de resíduos de aminoácido. Em determinadas modalidades, XTEN é um peptídeo ou um polipeptídeo que tem mais que cerca de 20 a cerca de 3000 resíduos de aminoácido, mais que 30 a cerca de 2500 resíduos, mais que 40 a cerca de 2000 resíduos, mais que 50 a cerca de 1500 resíduos, mais que 60 a cerca de 1000 resíduos, mais que 70 a cerca de 900 resíduos, mais que 80 a cerca de 800 resíduos, mais que 90 a cerca de 700 resíduos, mais que 100 a cerca de 600 resíduos, mais que 110 a cerca de 500 resíduos, ou mais que 120 a cerca de 400 resíduos.

[212] A Tabela abaixo fornece as sequências de aminoácidos de XTENs sem limitação.

SEQUÊNCIAS XTEN EXEMPLIFICATIVAS

XTEN	**Sequência de Aminoácidos**
AE42 **SEQ ID Nº:106**	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE42_2 **SEQ ID Nº:107**	TGGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE42_3 **SEQ ID Nº:108**	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT

XTEN	**Sequência de Aminoácidos**
AE72 **SEQ ID Nº:109**	GAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS
AE72_2 **SEQ ID Nº:110**	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE72_3 **SEQ ID Nº:111**	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
AE144 **SEQ ID Nº:112**	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESAPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_2 **SEQ ID Nº:113**	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE
AE144_3 **SEQ ID Nº:114**	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG144 **SEQ ID Nº:115**	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AE288 **SEQ ID Nº:116**	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA

XTEN	**Sequência de Aminoácidos**
SEQ ID Nº:117	TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGS
AE576 **SEQ ID Nº:118**	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 **SEQ ID Nº:119**	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
AE864 **SEQ ID Nº:120**	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP

XTEN	**Sequência de Aminoácidos**
	SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 **SEQ ID Nº:121**	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSP

[213] Em alguns casos, o XTEN é selecionado dentre o grupo que consiste em AE42, AG42, AE42_2, AE42_3, AE48, AM48, AE72, AE72_2, AE72_3, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AE144_2, AE144_3, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE295, AE324, AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AE872, AE884, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908 e AG2004. Em alguns casos, o XTEN é selecionado dentre o grupo que consiste em AE42, AE864, AE576, AE288, AE144, AE288, AG864, AG576, AG288 e AG144. Em alguns casos, o XTEN é AE144 selecionado. Em alguns casos, o XTEN é AE288.

[214] Exemplos adicionais de polipeptídeos XTEN que podem ser usados de acordo com a presente divulgação são divulgados nos documento de Patente Nº U.S. 7.855.279 e 7.846.445, nas Publicações de Patente Nº U.S. 2009/0092582, 2010/0239554, 2010/0323956, 2011/0046060, 2011/0046061, 2011/0077199 A1, 2011/0172146, 2012/0178691; 2012/0263701; ou 2013/0017997, nas Publicações de Patente Internacionais nº WO 2010091122, WO 2010144502, WO 2010144508, WO 2011028228, WO 2011028229, WO 2011028344; e WO2013130683.

ALBUMINA DE SORO HUMANO

[215] Em alguns casos, as moléculas quiméricas incluem albumina de soro humano (HSA) como a porção química de fusão em vez de uma região de Fc. Nota-se que HSA não é porção química de dimerização,

porém, as fusões de terminal N e/ou C são possíveis. Em algumas modalidades, o terminal C de um domínio variável de anticorpo desta divulgação é ligado direta ou indiretamente (por exemplo, por meio de um ligante ou agente terapêutico (por exemplo, anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo, enzima, oligonucleotídeo antisenso)) ao terminal N de um polipeptídeo de HSA.

[216] HSA tem diversas propriedades farmacêuticas desejáveis. Essas incluem: uma meia-vida de soro de 19-20 dias; solubilidade de cerca de 300 mg/ml; boa estabilidade; facilidade de expressão; nenhuma função efetora; baixa imunogenicidade; e níveis de soro de circulação de cerca de 45 mg/ml. A estrutura cristalina de HSA sem e com ligantes que inclui moléculas biologicamente importantes, tais como ácidos graxos e fármacos, ou complexa com outras proteínas é bem conhecida na técnica. *Consultar, por exemplo,* Universal Protein Resource Knowledgebase P02768; He et al., *Nature*, 358:209–215 (1992); Sugio et al., *Protein Eng.,* 12:439-446 (1999). De acordo com estudos cristalográficos de raio x de HSA, esse polipeptídeo forma uma proteína em formato de coração com dimensões aproximadas de 80×80×80 Å e uma espessura de 30 Å. A mesma tem cerca de 67% de hélice α, porém, nenhuma folha β e pode ser dividida em três domínios homólogos (I-III). Cada um desses três domínios é compreendido por dois subdomínios (A e B). Os subdomínios A e B têm seis e quatro hélices α, respectivamente, conectadas por laços flexíveis. As regiões principais de ligação de ligante à albumina de soro humano estão localizadas nas cavidades nos subdomínios IIA e IIIA, que são formados principalmente por resíduos hidrofóbicos e positivamente carregados, e exibem química similar. Todos menos um dentre os 35 resíduos de cisteína na molécula estão envolvidos na formação de 17 ligação de dissulfeto de estabilização. A sequência de aminoácidos, assim como as estruturas de albuminas bovinas, de cavalo, coelho, equinas e

leporinas são conhecidas. *Consultar, por exemplo,* Majorek et al., *Mol. Immunol.*, 52:174–182 (2012); Bujacz, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 68:1278–1289 (2012). Diversas variantes genéticas de albumina de soro humano são bem conhecidas na técnica. *Consultar, por exemplo,* The Albumin Website maintained by the University of Aarhus, Dinamarca e Universidade de Pavia, Itália em albumin.org/genetic-variants-of-human-serum-albumin e albumin.org/genetic-variants-of-human-serum-albumin-reference-list.

[217] Em uma modalidade, uma albumina de soro humano usada na molécula quimérica compreende ou consiste na sequência de aminoácidos apresentada abaixo:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVT
EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAK
QEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRD
EGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK
LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL
VEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPV
SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK
ETCFAEEGKKLVAASQAALGL (**SEQ ID Nº:94**)

[218] Em outra modalidade, uma albumina de soro humano usada na molécula quimérica é uma variante de HSA que tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ

ID Nº:94. Porcentagem de identidade entre sequências de aminoácidos pode ser determinada com o uso do programa BLAST 2.0. A comparação entre sequências pode ser realizada com o uso de um alinhamento sem lacuna e com o uso dos parâmetros padrão (matriz Blossom 62, custo de existência de lacuna de 11, custo de lacuna por resíduo de 1 e uma razão lambda de 0,85). O algoritmo matemático usado nos programas BLAST é descrito em Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.

[219] Em determinadas modalidades, a albumina de soro humano usada na molécula quimérica é uma variante de HSA que pode ter deleções de terminal N e/ou C na sequência da SEQ ID Nº:94 (*por exemplo,* 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos consecutivos no terminal N e/ou C podem ser deletados). Em alguns casos, a variante de HSA tem propriedades farmacêuticas desejáveis iguais ou substancialmente iguais à HSA que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº:94 (*por exemplo,* uma meia-vida de soro de 19-20 dias; solubilidade de cerca de 300 mg/ml; boa estabilidade; facilidade de expressão; nenhuma função efetora; baixa imunogenicidade; e/ou níveis de soro de circulação de cerca de 45 mg/ml). Em alguns casos, a HSA usada na molécula quimérica é uma variante genética de HSA. Em alguns casos, a variante de HSA é qualquer uma dentre as 77 variantes divulgadas em Otagiri et al, 2009, *Biol. Pharm. Bull.* 32(4), 527-534 (2009). Em determinadas modalidades, a HSA usada na molécula quimérica é uma versão que sofreu mutação de HSA que tem afinidade melhorada para o receptor de Fc neonatal (FcRn) em relação à HSA da SEQ ID Nº:94 (*consultar, por exemplo,* o documento Nº U.S. 9.120.875; U.S. 9.045.564; U.S. 8.822.417; U.S. 8.748.380; Sand et al., *Front. Immunol*.,5:682 (2014); Andersen et al., *J. Biol. Chem*., 289(19):13492-502 (2014); Oganesyan et al., *J. Biol. Chem*., 289(11):7812-24 (2014); Schmidt et al., *Structure*,

21(11):1966-78 (2013); WO 2014/125082A1; WO 2011/051489, WO2011/124718, WO 2012/059486, WO 2012/150319; WO 2011/103076; e WO 2012/112188, cujo conteúdo está incorporado a título de referência no presente documento). Em determinados casos, o mutante de HSA é o mutante E505G/V547A. Em determinados casos, o mutante de HSA é o mutante K573P. Tais mutantes de HSA que HSA melhorou a afinidade para FcRn podem ser usados para aumentar a meia-vida da molécula quimérica.

AGENTE TERAPÊUTICO

[220] A molécula quimérica pode incluir um agente (ou agentes) terapêutico. Exemplos de agentes terapêuticos incluem um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo, um anticorpo de cadeia única (por exemplo, scFv, sc(Fv)2), um diacorpo, um nanocorpo, um fragmento de anticorpo, um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo antisenso), um peptídeo ou uma enzima, usados sozinhos ou em terapia de combinação com tratamentos de padrão de cuidados. As moléculas quiméricas desta divulgação podem transportar um agente terapêutico através da BBB ao SNC. Assim, as moléculas quiméricas podem ser usadas para tratar e/ou prevenir um distúrbio neurológico. Distúrbios neurológicos exemplificativos incluem mal de Alzheimer, mal de Parkinson, demência frontotemporal, ELA, doença de Huntington, esclerose múltipla, atrofia muscular espinhal, distrofia muscular, lesão de medula espinhal, derrame, afecções oftalmológicas, neurite crônica aguda ou crônica, distúrbios psiquiátricos, lesão cerebral de síndrome de Tourette, tumores cerebrais e epilepsia.

[221] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de mal de Alzheimer incluem triglicerídeo caprílico, anticorpo anti-tau, anticorpo anti-beta amiloide, anticorpo anti-DKK1, anticorpo de antagonista de APOE, donepezila, quinidina, um antagonista de receptor de serotonina 6, um inibidor de beta-secretase, um antagonista

de RAGE, um inibidor de BACE, um inibidor de proteína beta amiloide, um inibidor de fosfodiesterase 9A, bisnorcimserina, briostatina-1, um potenciador alfa-7, um agonista de purinoceptor P2Y6, um inibidor de agregação de proteína tau/agregação de TDP-43, N3pG-Aß mAb, um agonista mGlu2, quinazolinona, um estimulante de proteína mitocondrial, um inibidor de secretase de proteína precursora amiloide, um antagonista 5HT6, R-fenserina, um inibidor de proteína beta amiloide/tau, um inibidor de MAO-B, um inibidor de Lp-PLA2, um antagonista de receptor de 5-HT6, um inibidor de proteína BET, um mAb anti-AB protofibrilar, nometiazol, um antagonista de receptor de histamina H3, um agonista de PPAR-delta/gama, abeotaxano e um inibidor de proteína quinase ativada por mitogênio p38.

[222] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de ELA incluem um anticorpo anti-SOD1, anticorpo anti-DR6, anticorpo anti-DPR, dexpramipexol, arimoclomal, GM6, ibudilaste, um modulador de macrófago, um inibidor de NOGO-A e um estimulante de complexo de troponina.

[223] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de lesão cerebral incluem apomorfina, um modulador de inibidor de citocina/receptor de neuropeptídeo e um agonista de receptor de progesterona.

[224] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de tumores cerebrais incluem um inibidor de IDH1, doxorrubicina, paclitaxel, um conjugado de anticorpo e fármaco anti-EGFRvIII, bevacizumabe, um inibidor de quinase FGF-R, um inibidor de PI3K, cabozantinibe, biotina de derlotuximabe de iodo I 131, um inibidor de PDGFR, orotato de carboxiamidotriazol, um derivado não neurotóxico de penclomidina, golvatinibe, dexanabinol, um inibidor de quinase de TGF-beta 1, afatinibe, um inibidor de IDO, cabazitaxel, um inibidor de Src quinase/pré-tubulina, um inibidor de proteína SMO, um antagonista

de receptor de A/B de endotelina, um inibidor de proteassoma, um antagonista de canal de cálcio tipo T, um análogo de tapsigargina, irinotecano, nivolumabe, um inibidor de CSF-1R, pelareorep, um antagonista de EGFR, um inibidor de proteína exportina-1/ inibidor de proteína nuclear, um inibidor de proteína BIRC5, evofosfamida, abeotaxano, inibidor de proteína ENG, crocetinato trans-sódico, um agente alquilante N7, um agente anti-angiogênico alvejado e veliparibe.

[225] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de epilepsia incluem everolimus, acetato de eslicarbazepina, alprazolam, brivaracetam, carbamazepina, canabidiol, um inibidor de transaminase de 4-aminobutirato, perampanel, um agonista de receptor de GABA-A, huperzina sintética, pregabalina, clobazam, diazepam, um modulador de receptor sináptico e extra sináptico de $GABA_A$, topiramato IV, lacosamida e um agonista de receptor de serotonina.

[226] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de distúrbios genéticos (por exemplo, ataxia de Friedrich, ceroide neuronal infantil tardia, atrofia muscular espinhal e bulbar, ataxia telangiectasia, neurodegeneração associada à quinase de pantotenato, atrofia muscular espinhal, polineuropatia de amiloide familiar, síndrome de Rett, síndrome de Leigh, doença de Wilson) incluem um estimulante de fator relacionado a NF/E2 2, interferon gama-1b, terapia de substituição enzimática rhTPP1, vatiquinona, deferiprona, Spinraza®, ISIS-TTRRX, um agonista de receptor de serotonina 1A, modulador de inibidores de citocina/receptor de neuropeptídeo, um inibidor de siRNA que alveja TTR, substituição de fosfopantotenato, inibidor de DcpS, bitartrato de cisteamina, ácido indolepropiônico, um inibidor de dissociação de transtirretina e tetratiomolibdato de bis-colina.

[227] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de dor de cabeça incluem um mAb anti-CGRP, um mAb de antagonista de receptor de CGRP, sumatriptano, dextrometorfano/quinidina,

onabotulinumtoxinA, um agonista de receptor de serotonina-1F, um inibidor de nNOS/5HT, di-hidroergotamina, ciclobenzaprina e combinação de aspirina/sumatriptano.

[228] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de doença de Huntington incluem laquinimode, um inibidor de PDE10, pridopidina, bitartrato de cisteamina e um inibidor de VMAT2.

[229] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de esclerose múltipla incluem natalizumabe, profármaco de fumarato de monometila, anticorpo anti-LINGO-1, um modulador de proteína Nck, um agonista de receptor de S1PR-1/5, fingolimode, um mAb anti-CD52, idebenona, um agonista/modulador de PPAR-gama, laquinimode, um inibidor de tirosina quinase, um mAb anti-CD19, ibudilaste, guanabenzo, um mAb anti-CD20, interferon beta-1b, um inibidor de receptor de IL-7, um agonista de receptor de S1P1, um estimulante de proteína de mielina, succinato de estriol, imilecleucel-T, um mAb anti-VLA 2, um modulador de BAFF-R, um inibidor de antígeno CD100, um anticorpo anti-DR6 e um inibidor de NF-kappa B.

[230] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de distrofia muscular incluem um inibidor de miostatina, drisaperseno, eteplirseno, halofuginona, idebenona, ISIS-DMPKR$_X$, um agonista de receptor de esteroide, um inibidor de GAPDH, um inibidor de transcrição genética, tadalafil, atalureno e um agonista de receptor de glicocorticoide.

[231] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de dor incluem uma neublastina, antagonista de receptor purino de P2X3, um antagonista de proteína SNARE, núcleo de oxicodona-naltrexona (tolerante ao erro), amitriptilina/quetamina, rintatolimod, um agonista de receptor de cannabinoid CB2, um peptídeo não eritropoiético, um agonista de PPAR-gama, um inibidor de glicogênio fosforilase, um antagonista de receptor de NMDA, ácido zoledrônico, um inibidor de

proteína de resposta de crescimento precoce 1, um antagonista de receptor de histamina-3, buprenorfina, um inibidor de citocina, cebranopadol, celecoxibe, um análogo de ácido araquidônico, uma capsaicina sintética, um inibidor de canal sódico Nav1.7, um agonista de receptor de opioide kappa, duloxetina, um estimulante de fator de crescimento nervoso, dexmedetomidina, um inibidor de canal sódico comutado por tensão, bupivacaína, um antagonista de receptor de angiotensina tipo 2, um inibidor de fator de crescimento nervoso, um inibidor de p38, rapastinel, levorfanol, um mAb de CGRP, pregabalina, um agonista de receptor de mGlu2/3, um modulador de proteína de CACNA2D1, um inibidor de fator de reabsorção óssea, neublastina, um analgésico opioide mu, um inibidor de nNOS, O-desmetiltramadol, palmitoiletanolamida, um agonista de GABA A, um agonista de receptor de TRPV-1, nabiximois, um inibidor de ciclo-oxigenase 2, um modulador de fator de crescimento nervoso, ciclobenzaprina, flurbiprofeno, um inibidor de hidrolase de amida de ácido graxo e ibuprofeno/fosfatidilcolina.

[232] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de mal de Parkinson incluem amantadina, apomorfina, um agonista parcial de receptor de acetilcolina de nicotina alfa7, um anticorpo anti-alfa-sinucleína, inibidor de alfa-sinucleína, levodopa, um potenciador D1, dipraglurante, um agonista parcial de serotonina 1A/1B, fipamezol, GM6, um agonista de receptor de retinoide X, istradefilina, rotigotina, pramipexol/rasagilina, R-fenserina, um antagonista de receptor de serotonina 2A/6, um antagonista de receptor de adenosina A2A, safinamida e um agonista de receptor de dopamina.

[233] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de espasticidade incluem baclofeno, onabotulinumtoxinA, abobotulinumtoxinA, arbaclofeno, nabiximois e incobotulinumtoxinA.

[234] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de

Lesão de Medula Espinhal incluem um anticorpo anti-Lingo-1, anticorpo anti-NgR1, neublastina, um modulador de sistema nervoso, um inibidor de proteína de ligação a Rho GTP e receptor de fator de crescimento de fibroblasto.

[235] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de derrame incluem natalizumabe, forma de mutante recombinante de proteína C ativada de tipo selvagem humana, ticagrelor, dalfampridina, aspirina, micropartículas de nimodipina, GM6, um inibidor de PARP, um inibidor de domínio de PDZ, um inibidor de beta amiloide, etexilato de dabigatrana e nitrito de sódio.

[236] Agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de Síndrome de Tourette incluem um antagonista de receptor de histamina-3, um inibidor de 4-aminobutirato transaminase, abobotulinumtoxinA, ecopipam, um inibidor de VMAT2, acamprosato e vigabatrina.

[237] Outros agentes terapêuticos exemplificativos para o tratamento de outros distúrbios neurológicos incluem um inibidor de miostatina, estimulante de fator 2 relacionado a NF/E2, anticorpo anti-tau, um inibidor de mieloperoxidase, um inibidor de poro de transição de permeabilidade mitocondrial, belimumabe, mAb de modulador de receptor de activina tipo II-B, um inibidor de C1 esterase, carboximaltose férrica, amifampridina, fingolimode, um inibidor de oxidase B de monoamina, um modulador de neurotransmissor, um agonista de receptor de dopamina, um mAb anti-CD19, um inibidor de VMAT2, um mAb de CD20, timosina beta-4, um mAb de receptor anti-IL-6, eculizumabe, um modulador de receptor de AMPA, um inibidor de hidroxilase de esteroide, fosfato piridoxal, abeotaxano, ácido aceneurâmico e oxibato de sódio.

[238] Em um caso, o agente terapêutico é um anticorpo. Exemplos sem limitação das CDRs de anticorpos terapêuticos exemplificativos são fornecidos abaixo.

Anticorpo	**VH-CDR1**	**VH-CDR2**	**VH-CDR3**
LINGO-1	AYEMK (SEQ ID Nº:122)	VIGPSGGFTFYADSVKG (SEQ ID Nº:123)	EGDNDAFDI (SEQ ID Nº:124)
TWEAK	GFTFSRYAMS (SEQ ID Nº:128)	EISSGGSYPYYPDTVTG (SEQ ID Nº:129)	VLYYDYDGDRIEVMDY (SEQ ID Nº:130)
Beta Amiloide	SYGMH (SEQ ID Nº:134)	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID Nº:135)	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID Nº:136)
tau	GFTFSSYDMH (SEQ ID Nº:140)	VIWFDGSNEFYADSVKG (SEQ ID Nº: 141)	DLGASVTTSNAENFHH (SEQ ID Nº:142)
tau	GFTFPNYVMT (SEQ ID Nº: 149)	SGISGSGGSTDYADSVKG (SEQ ID Nº:150)	GSGGI (SEQ ID Nº:151)
tau	KYGMS (SEQ ID Nº:155)	TISSSGSRTYYPDSVKG (SEQ ID Nº:156)	SWDGAMDY (SEQ ID Nº:157).
Alfa-sinucleína	KAWMS (SEQ ID Nº:161) ou GFDFEKAWMS (SEQ ID Nº:162)	RIKSTADGGTTSYAAPVEG (SEQ ID Nº:163)	AH (SEQ ID Nº:164)
TDP-43	GFTFSTYYMS (SEQ ID Nº:168)	NIKQDGSEKYYVDSVKG (SEQ ID Nº:169)	PPGW (SEQ ID Nº: 170)
mAb1 de DPR de C9orf72	GFTFSNHAMH (SEQ ID Nº: 201)	VISYDGENTYYADSIEG (SEQ ID Nº: 202)	GGRRGHFTSYYLDY (SEQ ID Nº: 203)
mAb2 de DPR de C9orf72	GGSVSD (SEQ ID Nº: 174)	RTYTNGKTTYTYNPSLES (SEQ ID Nº: 175)	WGAVTGDYYYGMDV (SEQ ID Nº: 176)
LINGO-1	RASQSVSSYLA (SEQ ID Nº: 125)	DASNRAT (SEQ ID Nº: 126)	QQRSNWPMYT (SEQ ID Nº: 127)
TWEAK	RSSQSLVSSKGNTYLH (SEQ ID Nº: 131)	KVSNRFS (SEQ ID Nº: 132)	SQSTHFPRT (SEQ ID Nº: 133)
Beta Amiloide	RASQSISSYLN (SEQ ID Nº: 137)	AASSLQS (SEQ ID Nº:138)	QQSYSTPLT (SEQ ID Nº:139)
tau	SGDALPKRYVY (SEQ ID Nº: 143)	EDSKRPS (SEQ ID Nº:144)	YSTDSNGHHWV (SEQ ID Nº:145)
tau	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID Nº: 152)	DVTKRPS (SEQ ID Nº: 153)	HSYVGSYTLV (SEQ ID Nº:154)
tau	KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID Nº:158)	KVSNRFS (SEQ ID Nº:159)	FQGSLVPWA (SEQ ID Nº:160)
Alfa-sinucleína	SGEALPMQFAH (SEQ ID Nº:165)	KDSERPS (SEQ ID Nº:166)	QSPDSTNTYEV (SEQ ID Nº: 167)
TDP-43	KSSQSLLHSDGKTYLY (SEQ ID Nº: 171)	EVSNRFS (SEQ ID Nº:172)	MQSIQLPVT (SEQ ID Nº:173)
mAb1 de DPR de C9orf72	RASQNIDKYLN (SEQ ID Nº:177)	AASSLHS (SEQ ID Nº:178)	QQSYSSFRT (SEQ ID Nº:179)
mAb2 de DPR de C9orf72	RSPRSLLHTNGYTYLD (SEQ ID Nº:180)	LASNRAS (SEQ ID Nº:181)	MQGLQPSWT (SEQ ID Nº:182)

[239] Exemplos sem limitação das VH e VL de anticorpos terapêuticos exemplificativos são fornecidos abaixo.

[240] Anti-LINGO-1:

[241] **VH:**

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYEMKWVRQA PGKGLEWVSVIGPSGGFTFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCATEGDNDAFDIWGQ GTTVTVSS (**SEQ ID Nº:183**)

[242] **VL:**

DIQMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPMYTFGQGTKLEIK (**SEQ ID Nº:184**)

[243] Anti-TWEAK:

[244] **VH:**

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYAMSWVRQA PGKGLEWVAEISSGGSYPYY PDTVTGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVLYYDYDGDRIE VMDYWGQGTL VTVSS (**SEQ ID Nº:185**)

[245] **VL:**

DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHFPRTFGGGTKVE IK (**SEQ ID Nº:186**)

[246] **ANTI-BETA-AMILOIDE:**

[247] **VH:**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWFDGTKKYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTA VYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTTVTVSS (**SEQ ID Nº:187**)

[248] **VL:**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGGGTKVEIKR (**SEQ ID Nº:188**)

[249] **ANTI-TAU:**

[250] **VH:**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRVSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKG LEWVAVIWFDGSNEFYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAED TAVYYCARDLGASVTTSNAENFHHWGQGTLVTVSS (**SEQ ID Nº:189**)

[251] **VL:**

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKRYVYWYQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPETFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSNG HHWVFGGGTKLTVL (**SEQ ID Nº:190**)

[252] **ANTI-TAU:**

[253] **VH:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPNYVMTWVRQAPGKGL EWVSGISGSGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTA LYYCAKGSGGIRGQGTMVTVSS (**SEQ ID Nº:191**)

[254] **VL:**

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWHQQHPGKA PKLLIYDVTKRPSGVPDRFSGSKSGNTAALTISGLQAEDEADYYCHS YVGSYTLVFGGGTKLTVL (**SEQ ID Nº:192**)

[255] **ANTI-TAU:**

[256] VH:

EVHLVESGGA LVKPGGSLRL SCAASGFSFS KYGMSWVRQA PGKGLEWVAT ISSSGSRTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAMYYCSISW DGAMDYWGQG TTVTVSS (SEQ ID Nº:193)

[257] VL:

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLVYKVSNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGT YYCFQGSLVP WAFGGGTKVE IK (SEQ ID Nº:194)

[258] ANTI-ALFA-SINUCLEÍNA:

[259] VH:

EVQLVESGGG LVEPGGSLRL SCAVSGFDFE KAWMSWVRQA PGQGLQWVARIKSTADGGTT SYAAPVEGRF IISRDDSRNM LYLQMNSLKT EDTAVYYCTSAHWGQGTLVT VSS (SEQ ID Nº:195)

[260] VL:

SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGEALPMQ FAHWYQQRPG KAPVIVVYKDSERPSGVPER FSGSSSGTTA TLTITGVQAE DEADYYCQSP DSTNTYEVFGGGTKLTVL(SEQ ID Nº:196)

[261] DPR Anti-C9orf72:

VH1:QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNHAMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGENTYYADSIEGRFTISRDNFKNTLFLQMYSLTAD DTAMYFCARGGRRGHFTSYYLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID Nº:197)

[262] VL1:

[263] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIDKYLNWYQQIP GKAPKLLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYYC QQSYSSFRTFGQGTKLEIK (SEQ ID Nº:198)

[264] VH2:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSCIRQPAGKGLE WIGRTYTNGKTTYTYNPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSVTAADTAV YYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGTLVTVSS (SEQ ID Nº:199)

[265] VL2:

EIVLTQSPLSLSVTPGEPASISCRSPRSLLHTNGYTYLDWYLQRPGQS PQLLIFLASNRASGVPDRFSGSGSGTNFTLRISGVEADDVGVYYCMQ GLQPSWTFGQGTKVEIK (SEQ ID Nº:200)

[266] Em algumas modalidades, a molécula quimérica é um polipeptídeo de fusão que compreende um domínio variável de anticorpo descrito acima e um anticorpo inteiro (o agente terapêutico) (consultar a Figura 48). O terminal C de um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento é ligado diretamente ou por meio de um ligante (por exemplo, G, GG, G_4S (SEQ ID Nº:5), 3X G_4S (SEQ ID Nº:60) ao terminal N de ambos os domínios VH ou VL do

anticorpo. Em determinadas modalidades, o anticorpo inteiro é um anticorpo anti-beta amiloide, um anticorpo anti-tau, um anticorpo anti-alfa sinucleína, um anticorpo anti-TDP-43, um anticorpo anti-LINGO-1, um anticorpo anti-LINGO-2, um anticorpo anti-LINGO-3, um anticorpo anti-LINGO-4, um anticorpo anti-TREM2, um anticorpo de poli-GA de repetição dipeptídica anti-C9orf72 (isto é, anticorpo que tem capacidade para ligar uma repetição dipeptídica (DPR) de poli-glicina–alanina (GA) que tem pelo menos 6 repetições $(GA)_6$ conforme traduzido do gene de quadro de leitura aberto 72 de cromossomo 9 (C9orf72), um anticorpo anti-TWEAK ou um anticorpo anti-TWEAK-R.

[267] Em algumas modalidades, a molécula quimérica compreende um domínio variável de anticorpo descrito acima, uma região de articulação, uma região de Fc e um Fab (agente terapêutico) (consultar a Figura 48). O terminal C do domínio variável de anticorpo é ligado direta ou indiretamente ao terminal N de cada região de articulação que, por sua vez, está ligada direta ou indiretamente à região de Fc. O terminal C de cada domínio de Fc da região de Fc é ligado por meio de um ligante (por exemplo, G, GG, G_4S (SEQ ID Nº:5), 3X G_4S (SEQ ID Nº:60) ao terminal N do domínio VH ou VL do Fab (agente terapêutico). Em determinadas modalidades, o Fab é um Fab anti-beta amiloide, um Fab anti-tau, um Fab anti-alfa sinucleína, um Fab anti-TDP-43, um Fab anti-LINGO-1, um Fab anti-LINGO-2, um Fab anti-LINGO-3, um Fab anti-LINGO-4, um Fab anti-TREM2, um Fab de poli-GA de repetição dipeptídica anti-C9orf72, um Fab anti-TWEAK ou um Fab anti-TWEAK-R.

[268] Em determinadas modalidades, a molécula quimérica compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, um agente terapêutico, uma região de articulação e uma região de Fc. O terminal C do domínio variável de anticorpo é ligado diretamente ou por meio de um ligante (por exemplo, G, GG, G_4S (SEQ

ID Nº:5), 3X G_4S (SEQ ID Nº:60) ao terminal N do agente terapêutico (por exemplo, um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab)), uma enzima, um peptídeo). O terminal C do agente terapêutico é ligado diretamente ou por meio de um ligante ao terminal N de uma região de articulação. O terminal C da região de articulação é ligado ao terminal N de cada domínio de Fc da região de Fc. Em alguns casos,

[269] Em algumas modalidades, a molécula quimérica compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, um agente terapêutico, uma região de articulação e uma região de Fc. O terminal C do domínio variável de anticorpo é ligado diretamente ou por meio de um ligante ao terminal N de uma região de articulação. O terminal C da região de articulação é ligado ao terminal N de cada domínio de Fc da região de Fc. O terminal N do agente terapêutico (por exemplo, um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab)), uma enzima, um peptídeo) é ligado diretamente ou por meio de um ligante (por exemplo, G, GG, G_4S (SEQ ID Nº:5), 3X G_4S (SEQ ID Nº:60) ao terminal C de um ou ambos os domínios de Fc da região de Fc.

[270] Em determinadas modalidades, a molécula quimérica compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, um ASO (agente terapêutico), uma região de articulação e uma região de Fc. O terminal C do domínio variável de anticorpo é ligado diretamente ou por meio de um ligante ao terminal N de uma região de articulação. O terminal C da região de articulação é ligado ao terminal N de cada domínio de Fc da região de Fc. O ASO é ligado à região de articulação. Em determinados casos, o ASO é um oligonucleotídeo de comutação de splice. Em outros casos, o ASO é um gapmer.

[271] Em alguns casos, a molécula quimérica compreende um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, uma região de articulação, uma região de Fc e uma nanopartícula lipídica,

um lipossoma, ou um nanocarreador polimérico que encapsula um agente terapêutico (por exemplo, um ASO (por exemplo, um oligonucleotídeo de comutação de splice ou um gapmer), um fármaco de molécula pequena, um ácido nucleico, um peptídeo). O terminal C do domínio variável de anticorpo é ligado diretamente ou por meio de um ligante ao terminal N de uma região de articulação. O terminal C da região de articulação é ligado ao terminal N de cada domínio de Fc da região de Fc. O lipossoma pode ser ligado ao terminal C de um ou ambos os domínios de Fc da região de Fc. Métodos para entrega em nanoescala são bem conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo, Juliano et al., Nucl. Acids Res., 44(14) (2016) e as referências citadas no mesmo, que estão todas incorporadas a título de referência em suas totalidades no presente documento.

[272] Deve-se entender que as moléculas quiméricas descritas acima podem incluir uma porção química de HSA em vez de uma região de Fc.

[273] Além disso, a divulgação engloba projetos monovalentes, biespecíficos e tetravalentes, conforme mostrado na Figura 49.

ÁCIDOS NUCLEICOS, VETORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS PARA PRODUZIR OS POLIPEPTÍDEOS

[274] Esta divulgação também engloba ácido nucleico que codifica os domínios variáveis de anticorpo divulgados acima. Além disso, ácido nucleico ou ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de fusão descritos no presente documento são englobados. O ácido nucleico ou ácidos nucleicos podem ser inseridos em um vetor ou vetores (por exemplo, vetores de expressão).

[275] Os ácidos nucleicos que codificam os domínios variáveis de anticorpo e polipeptídeos de fusão que compreendem os mesmos que são descritos acima podem ser expressos em qualquer célula hospedeira desejada (por exemplo, células bacterianas, células de

levedura, células de mamíferos). Em determinadas modalidades, o polipeptídeo é secretado a partir da célula hospedeira. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula de mamífero. Em uma modalidade específica, a célula hospedeira é uma linhagem de célula ou célula CHO. Em alguns casos, uma sequência codificante de polipeptídeo de domínio variável de anticorpo (*por exemplo,* FC5 humanizado ou um FC5 humanizado e estabilizado com dissulfeto) é fundida a uma sequência codificante de Fc (por exemplo, IgG1, agly IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente. Em alguns casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma sequência de articulação (por exemplo, uma articulação de IgG1, IgG4, etc.). Em alguns casos, a sequência de aminoácidos interveniente compreende um Fab e uma sequência de articulação.

[276] Se o polipeptídeo deve ser expresso em células bacterianas (por exemplo, *E. coli*), o vetor de expressão deve ter características que permitem a amplificação do vetor nas células bacterianas. Adicionalmente, quando *E. coli*, tal como JM109, DH5α, HB101 ou XL1-Blue é usado como um hospedeiro, o vetor deve ter um promotor, por exemplo, um promotor lacZ (Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)), promotor araB (Better et al., *Science*, 240:1041-1043 (1988)), ou promotor T7 que pode permitir a expressão eficiente em *E. coli*. Exemplos de tais vetores incluem, por exemplo, vetores de série M13, vetores de série pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (QIAGEN), pEGFP e pET (quando esse vetor de expressão é usado, o hospedeiro é preferencialmente BL21 que expressa RNA polimerase de T7). O vetor de expressão pode conter uma sequência de sinal para secreção. Para produção no periplasma de *E. coli*, a sequência de sinal de *pelB* (Lei et al., *J. Bacteriol*., 169:4379 (1987)) pode ser usada como a sequência de sinal

para secreção. Para expressão bacteriana, métodos de cloreto de cálcio ou métodos de eletroporação podem ser usados para introduzir o vetor de expressão na célula bacteriana.

[277] Se o polipeptídeo deve ser expresso em células de levedura (*por exemplo, Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces italicus, Saccharomyces rouxii, Pichia pastoris, Pichia angusta, Pichia anomala, Pichia capsulate, Kluyveromyces lactis, ou leveduras dos gêneros Aspergillus, Candida, Torulopsis, Torulaspora, Schizosaccharomyces, Citeromyces, Pachysolen, Zygosaccharomyces, Debaromyces, Trichoderma, Cephalosporium, Humicola, Mucor, Neurospora, Yarrowia, Metschunikowia, Rhodosporidium, Leucosporidium, Borryoascus, Sporidiobolus ou Endomycopsis*), o vetor de expressão inclui um promotor que aciona a expressão do polipeptídeo nas células de levedura e/ou sequências de sinal eficazes para direcionar a secreção em levedura. Promotores adequados para *Saccharomyces* incluem aqueles associados ao gene PGK1, genes GAL1 ou GAL10, CYC1, PHOS, TRP1, ADH1, ADH2, os genes para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutoquinase, isomerase de fosfato de triose, fosfoglicose isomerase, glicoquinase, feromônio de fator alfa-correspondente, [um feromônio de fato correspondente], o promotor PRB1, o promotor GUT2, o promotor GPD1 e promotores híbridos que envolvem híbridos de partes de regiões reguladoras 5' com partes de regiões reguladoras 5' de outros promotores ou com sítios de ativação a montante (por exemplo, o promotor descrito no documento Nº EP-A-258 067). Promotores adequados para *Pichia* incluem AOX1, AOX2, MOX1 e FMD1. Em alguns casos, a sequência de sinal é uma sequência de sinal derivada de levedura (*por exemplo,* uma que seja homóloga ao hospedeiro de levedura).

[278] Se o polipeptídeo deve ser expresso em células, tais como

células CHO, COS e NIH3T3, o vetor de expressão inclui um promotor necessário para expressão nessas células, por exemplo, um promotor SV40 (Mulligan *et al., Nature*, 277:108 (1979)), promotor MMLV-LTR, promotor EF1α (Mizushima *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)) ou promotor CMV. Além da sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo, os vetores de expressão recombinante podem carregar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (*por exemplo,* origens de replicação) e genes de marcador selecionáveis. O gene de marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (*consultar, por exemplo,* os documentos de Patente Nº U.S. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017). Por exemplo, tipicamente, o gene de marcador selecionável confere resistência aos fármacos, tal como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Exemplos de vetores com marcadores selecionáveis incluem pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV e pOP13.

[279] O polipeptídeo também pode ser expresso em células humanas, tais como células HEK-293.

[280] Polipeptídeos FC5 variantes (e fusões dos mesmos), podem ser construídos com o uso de qualquer um dos diversos métodos conhecidos na técnica. Um método desses é mutagênese de sítio direcionado, no qual um nucleotídeo específico (ou, caso desejado, um pequeno número de nucleotídeos específicos) é alterado de modo a alterar um único aminoácido (ou, caso desejado, um pequeno número de resíduos de aminoácido predeterminados) no polipeptídeo de FC5 variante codificado. Diversos kits de mutagênese de sítio direcionado estão comercialmente disponíveis. Um kit desses é o "Kit de Mutagênese de Sítio Direcionado de Transformador" vendido pela Clontech Laboratories (Palo Alto, CA).

[281] Polipeptídeos FC5 e fusões dos mesmos podem ser

produzidos e isolados com o uso de métodos bem conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, tais polipeptídeos são produzidos através de técnicas de DNA recombinante. Por exemplo, uma molécula (ou moléculas) de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo FC5 ou fusão do mesmo, pode ser inserida em um vetor (ou vetores), *por exemplo*, um vetor de expressão, e o ácido nucleico pode ser introduzido em uma célula. Células adequadas incluem, *por exemplo*, células de mamíferos (tais como células humanas ou células CHO), células fúngicas, células de levedura, células de inseto e células bacterianas. Quando expressa em uma célula recombinante, a célula é preferencialmente cultivada sob condições que permitem a expressão do polipeptídeo. O polipeptídeo pode ser recuperado a partir de uma suspensão celular, caso desejado. Conforme usado no presente documento, "recuperado" significa que o polipeptídeo que sofreu mutação é removido daqueles componentes de uma célula ou meio de cultura no qual está presente antes do processo de recuperação. O processo de recuperação pode incluir uma ou mais etapas de redobramento ou purificação. Métodos para isolamento e purificação normalmente usados para purificação de proteína podem ser usados para o isolamento e purificação dos polipeptídeos descritos no presente documento, e não se limitam a nenhum método particular. Polipeptídeos podem ser isolados e purificados apropriadamente selecionando e combinando-se, por exemplo, a cromatografia de coluna, filtração, ultrafiltração, salinização, precipitação de solvente, extração de solvente, destilação, imunoprecipitação, eletroforese de gel de poliacrilamida e SDS, foco isoelétrico, diálise e recristalização. Cromatografia inclui, por exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, filtração de gel, cromatografia quelante de metal, cromatografia de fase reversa e cromatografia de adsorção (Strategies for Protein Purification and

Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed., Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Cromatografia pode ser realizada com o uso de cromatografia de fase líquida, tal como HPLC e FPLC. Colunas usadas para cromatografia de afinidade incluem coluna de proteína A e coluna de proteína G, Capture Select HSA e Heparina-Sepharose. Exemplos de colunas que usam coluna de proteína A incluem Hyper D, POROS e Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). A presente divulgação também inclui polipeptídeos que são altamente purificados com o uso desses métodos de purificação.

MÉTODOS DE TRATAMENTO

[282] Os domínios variáveis de anticorpo descritos no presente documento podem ser usados para transportar uma carga (por exemplo, um agente terapêutico) que é útil para tratar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio. O agente terapêutico pode ser, por exemplo, um anticorpo, um fragmento de anticorpo (por exemplo, um Fab), um nanocorpo, um diacorpo, um anticorpo de cadeia única, um fármaco de molécula pequena, um peptídeo, uma enzima ou um ácido nucleico (por exemplo, um ASO). Em determinados casos, o agente terapêutico é ligado direta ou indiretamente ao domínio variável de anticorpo. Em outros casos, o agente terapêutico é encapsulado em um lipossoma, nanopartícula lipídica, ou nanocarreador polimérico que é, então, ligado direta ou indiretamente ao domínio variável de anticorpo. Ligando-se o agente terapêutico a ser alvejado ao sistema nervoso central a um domínio variável de anticorpo descrito no presente documento, tal fusão pode transportar o agente terapêutico através da BBB.

[283] Em determinadas modalidades, a doença ou distúrbio é um distúrbio neurológico. Em alguns casos, a doença ou distúrbio é uma tauopatia. Em alguns casos, a doença ou distúrbio é uma sinucleinopatia.

[284] Em alguns casos, a doença ou distúrbio é selecionada dentre

o grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, esclerose múltipla, frontotemporal demência (FTD), esclerose lateral amiotrófica (ELA), paralisia supranuclear progressiva (PSP), lesão de medula espinhal (SCI), atrofia muscular espinhal (SMA), cânceres neurológicos, neurite óptica aguda ou crônica, complexo de demência por esclerose lateral amiotrófica/parkinsonismo, demência de grão argirofílico, angiopatia amiloide do tipo britânica, angiopatia amiloide cerebral, degeneração corticobasal, doença de Creutzfeldt-Jakob, demência pugilística, confusões neurofibrilares difusas com calcificação, síndrome de Down, demência frontotemporal com parkinsonismo ligada ao cromossomo 17, degeneração lobar frontotemporal, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker, doença de Hallervorden-Spatz, miosite por corpúsculos de inclusão, atrofia sistêmica múltipla, distrofia miotônica, doença de Niemann-Pick tipo C, doença neuronal motora não Guamaniana com confusões neurofibrilares, doença de Pick, parkinsonismo pós-encefálico, angiopatia amiloide cerebral de proteína de prião, gliose subcortical progressiva, panencefalite esclerosante subaguda, demência apenas de confusão ou demência de múltiplos infartos.

[285] Em outros casos, a doença ou distúrbio é selecionada dentre o grupo que consiste em derrame, encefalopatia traumática crônica, lesão cerebral traumática (TBI), concussão, convulsão, epilepsia ou encefalopatia principal aguda.

[286] Anticorpos terapêuticos exemplificativos que podem ser empregues são divulgados nos documentos de Patente Nº U.S. 8.906.367, 9.605.059; 9.598.484; 9.587.014; 9.777.058; 9.567.395; 8.128.926; 8.058.406; 8.048.422; e Pedido de Patente Nº U.S. 2017/0247471-A1, em que todos estão incorporados a título de referência no presente documento em suas totalidades.

[287] ASOs terapêuticos exemplificativos que podem ser

empregues são divulgados nos documentos de Patente Nº U.S. 8.361.977 e 8.980.853, em que ambos são incorporados a título de referência no presente documento em suas totalidades.

[288] Quantidades terapeuticamente eficazes da composição podem ser administradas a um indivíduo humano que necessita da mesma em um regime de dosagem determinável por uma pessoa versada na técnica. A frequência de dosagem para a composição está inserida na habilidade e julgamento clínico de médicos. Tipicamente, o regime de administração é estabelecido por ensaios clínicos que podem estabelecer parâmetros de administração ideais. No entanto, o clínico pode variar tais regimes de administração de acordo com a idade, saúde, peso, sexo e situação médica do indivíduo. A frequência de dosagem também pode variar entre tratamentos agudos e crônicos para a doença ou distúrbio. Além disso, a frequência de dosagem pode ser variada dependendo da possibilidade de o tratamento ser profilático ou terapêutico.

ENSAIO

[289] A divulgação também apresenta um ensaio para avaliar a labilidade de um domínio variável de anticorpo. Em determinados casos, o domínio variável de anticorpo é um anticorpo de domínio único. Em um caso, o anticorpo de domínio único é FC5 ou uma variante do mesmo (por exemplo, humanizado, estabilizado com dissulfeto ou humanizado e estabilizado com dissulfeto).

[290] O método envolve fornecer a adição de um domínio variável de anticorpo em uma amostra de soro para criar uma mistura; incubar a mistura; purificar o domínio variável de anticorpo; e realizar mapeamento de peptídeo. Em alguns casos, a amostra de soro é soro de rato. Em outros casos, a amostra de soro é soro humano.

[291] Em determinadas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,01 a 0,5 mg/ml. Em

algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,05 mg/ml. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,1 mg/ml. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,2 mg/ml. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,3 mg/ml. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,4 mg/ml. Em algumas modalidades, o domínio variável de anticorpo está no soro a uma concentração de 0,5 mg/ml.

[292] Em determinados casos, a mistura é incubada em 25 a 50^{o}C por 10 a 100 horas. Em determinados casos, a mistura é incubada em cerca de 37^{o}C por cerca de 70 horas. Em uma modalidade, a mistura é incubada a 37^{o}C por 70 horas.

[293] Exemplo 3 da divulgação fornece uma maneira sem limitação de realizar esse ensaio.

[294] Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar melhor a invenção reivindicada e não devem ser interpretados como limitantes do escopo da invenção. Ao ponto de que materiais específicos são mencionados, isso ocorre meramente para fins de ilustração e não se pretende limitar a invenção. Uma pessoa versada na técnica pode desenvolver meios ou reagentes equivalentes sem o exercício de capacidade inventiva e sem que se afaste do escopo da invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE ANTICORPO FC5-ANTI-LINGO-1 (LI81)

[295] Para avaliar se um anticorpo biespecífico FC5 Li81 poderia ser gerado, o qual conteve atividade de transporte de FC5 e função de Li81, os inventores projetaram, expressaram, purificaram e

caracterizaram as 9 versões diferentes listadas na **Tabela 1**. Esquemas dos projetos são mostrados na coluna identificada como estruturas e as razões de valência de Vhhs de FC5 e Li81 em cada construto são listadas na coluna identificada como FC5:Li81. Os construtos contiveram 1, 2 ou 4 porções químicas de Vhh de FC5 e 1 ou 2 Fabs de Li81. Nos primeiros 4 construtos listados, FC5 foi preso ao terminal N de cadeia pesada, cadeia leve ou ambas de Li81, com o uso de 1 ou 3 ligantes G_4S (**SEQ ID Nº:5**) para conectar os domínios conforme observado. Nos 5º e 6º construtos FC5 foi diretamente preso ao Fc de articulação do mAb de Li81 e o Fab de Li81 foi fundido ao terminal C do Fc através de sua cadeia pesada. Duas versões diferentes da articulação foram usadas para conectar o FC5Vhh e os domínios de Fc, observadas como longa e curta. As quatro outras versões foram heterodímeros, conforme observado quando cada braço carregou diferente funcionalidade.

TABELA 1. LISTA DE CONSTRUTOS

Construtos de Li81	Nome usado no próximo slide	Estruturas	MW (kDa)	FC5 : Li81	nº de ID
LI81 wt(H)FC5(L)	FC5-3x-Li81 LC		175	2 : 2	3014
LI81 FC5(H)wt(L)	FC5-3x-Li81 HC		175	2 : 2	3015
LI81 FC5(H)FC5(L)	FC5-3x-Li81 HC/LC		205	4 : 2	3016
FC5-(G4S)1-LI81 hIgG1 agly	FC5-1x-Li81 HC		175	2 : 2	3438
articulação longa de FC5-Fc-(G4S)1-LI81 hIgG1 agly	FC5(lh)Fc-1x-Li81		175	2 : 2	3440
articulação curta de FC5-Fc-(G4S)1-LI81 hIgG1 agly	FC5(sh)Fc-1x-Li81		175	2 : 2	3441
articulação longa de FC5-Fc-(G4S)1-LI81 hIgG1 agly dupla-monovalente	Heterodímero FC5(lh)Fc-1x-Li81 + (lh)Fc		115	1 : 1	3442
articulação curta de FC5-Fc-(G4S)1-LI81 hIgG1 agly dupla-monovalente	Heterodímero FC5(sh)Fc-1x-Li81 + (sh)Fc		115	1 : 1	3443
articulação curta de FC5-Fc-(G4S)1-LI81 hIgG1 agly de monoFab	Heterodímero FC5(sh)Fc-1x-Li81 + FC5(sh)Fc		130	2 : 1	3444

[296] Os construtos de FC5 Li81 foram expressos em células CHO. Para preparação do meio condicionado, células CHO transfectadas foram expandidas em meios livres de soro, cultivadas até

a alta densidade, alimentadas com complementos e comutadas para uma temperatura reduzida. Culturas foram mantidas nessa temperatura reduzida por 11-14 dias e, então, cultivadas através de centrifugação e clarificadas através de filtração de 0,45 mícron.

[297] Para purificação, meios de cultura clarificados e filtrados foram carregados em colunas de proteína A, lavados com 20 mM de NaH_2PO_4 pH 7,4, 100 mM de NaCl e, então, com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 5,5, 100 mM de NaCl. FC5-Li81 foi eluído a partir das colunas com 25 mM de Na_2HPO_4 pH 2,8, 100 mM de NaCl pH 2,8 e neutralizado com 25 mM de Na_2HPO_4 pH 8,6, diluído a partir de uma solução de reserva de 0,5 M. O teor de proteína das amostras eluídas foi estimado a partir da absorção em 280 nm com o uso de um coeficiente de extinção de 1,4 para uma solução de 1 mg/ml. **A Figura 3** mostra uma análise SDS-PAGE dos primeiros 3 construtos nos quais FC5 foi fundido ao terminal N de mAb de Li81 com ligantes 3xG_4S (**SEQ ID Nº:6**) que conectam FC5 ao terminal N da HC (Nº de ID 3014), LC (Nº de ID 3015) ou ambas (Nº de ID 3016). Essa análise confirma a expressão da HC e LC, e montagem no complexo tetramérico de HC2LC2 característico sob condições não redutoras. O tamanho levemente maior da proteína na pista 3 é consistente com a presença de 4 cópias de FC5 em relação a duas cópias nas outras amostras. **A Figura 2** mostra sequências de aminoácidos de cadeias pesadas e leves usadas nos três construtos. A análise de massa intacta da cadeia pesada reduzida 3014 (massa prevista 62784,5 Da, massa observada 62783 Da), cadeia leve reduzida 3014 (massa prevista 23628,4 Da, massa observada 23628 Da), cadeia pesada reduzida 3015 (massa prevista 48608,9 Da, massa observada 48608 Da), cadeia leve reduzida 3015 (massa prevista 37804,0 Da, massa observada 37804 Da) cadeia pesada reduzida 3016 (massa prevista 62784,5 Da, massa observada 62782 Da) e cadeia leve reduzida 3016 (massa prevista 37804,0 Da, massa

observada 37804 Da) mostrou que os principais componentes em todas as amostras eram a cadeia leve e cadeia pesada previstas. Os espectros desconvolutos correspondentes são mostrados nas **Figuras 4, 5 e 6**. Nenhuma modificação inesperada no principal componente foi observada.

[298] **A Figura 7** (painel esquerdo) mostra uma análise SDS-PAGE sob condições não redutoras dos 6 outros produtos descritos na Tabela 1. Versões 3438, 3440, 3441 contêm a estrutura dimérica de HC2LC2 característica de anticorpos e foram >95% puras depois da purificação de Proteína A. Em contraste, versões 3442, 3443 e 3444 após purificação de proteína A foram muito heterogêneas. As mesmas contiveram a mistura esperada de componentes uma que anteciparia para os projetos de heterômero que refletem as 3 possibilidades diferentes de geração do heterômero e homômeros desejados de cada braço. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) foi usada para enriquecer os heterômeros a partir da mistura. Para fracionamento de SEC, os eluados de proteína A foram concentrados e, então, submetidos à SEC em uma coluna Superdex 200 de 24 ml em uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min em 20 mM de Na_2HPO_4 pH 7,4, 150 mM de NaCl. Frações de coluna foram coletadas, analisadas por SDS-PAGE, e aquelas que contêm heterômeros foram aglomeradas, filtradas, aliquotadas e armazenadas a -70°C. **A Figura 7** (painel direito) mostra fracionamento de SEC da amostra 3443. Frações mostradas nas pistas 7 e 8 (denotadas com setas) foram aglomeradas para gerar a amostra mostrada no painel esquerdo na pista 7.

[299] **A Figura 8** mostra a sequência de aminoácidos de cadeias pesadas e leves para os vários construtos de FC5-(G_4S)1-Li81. Análise de massa intacta da cadeia pesada reduzida 3438 (massa prevista 62153,9 Da, massa observada 62155 Da), cadeia pesada reduzida 3440 (massa prevista 62897,8 Da, massa observada 62899 Da), cadeia

pesada reduzida 3441 (massa prevista 62167,0 Da, massa observada 62168 Da), cadeia pesada reduzida 3442 (massa prevista 62897,8 Da massa observada 62899 Da), cadeia pesada reduzida 3443 (massa prevista 62167,0 Da, massa observada 62169 Da), cadeia pesada reduzida 3444 (massa prevista 62167,0 Da, massa observada 62169 Da). Todos os construtos contiveram a cadeia leve de Li81 (massa prevista de cadeia leve reduzida 23628,4, massa observada 23629 Da). Essas análises mostraram que os principais componentes em todas as amostras contiveram a cadeia leve e a cadeia pesada previstas. Os espectros desconvolutos correspondentes para as cadeias pesadas são mostrados na **Figura 9**. Nenhuma modificação inesperada no principal componente foi observada.

[300] Para testar se as fusões de FC5 impactaram a função de Li81, amostras foram analisadas para a ligação ao LINGO-1 em um formato de ELISA no qual placas de 96 poços foram revestidas com LINGO-1, então, tratadas com diluições em série dos produtos biespecíficos FC5-Li81. **A Figura 10** mostra os dados de ELISA para os 6 construtos de FC5-(G4S)1-Li81. Os 3 construtos bivalentes (3438, 3440, 3441) foram todos equipotentes com Li81 sem FC5 preso, o que indica que a adição do FC5 não impacta a ligação dos construtos ao LINGO-1. Por outro lado, as 3 versões heteroméricas (3442, 3443 e 3444), que contêm uma única cópia do Fab de Li81 mostraram um sinal reduzido, consistente com a presença de um contra dois sítios de ligação presentes nos construtos bivalentes. Os três construtos de FC5-(G_4S)3-Li81 também foram testados no ELISA e foram equipotentes a Li81 sem FC5 preso. As 9 amostras também foram testadas para função em um ensaio de diferenciação de oligodendrócito e todas estavam ativas. Os valores de EC50 para promover a diferenciação no ensaio de potência foram todos cerca de 3 vezes menores do que Li81 sem FC5 preso. Amostras foram caracterizadas por atividade através de ELISA e

no ensaio de diferenciação com o uso dos métodos anteriormente descritos para caracterização do anticorpo de Li81 (Pepinsky et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 339:519–529 (2011)).

[301] A atividade biológica da porção química de FC5 das amostras de FC5-Li81 foi avaliada em um ensaio de cultura celular de transpoço de BBB *in vitro* em células endoteliais cerebrais de rato adulto imortalizadas com vírus símio 40 (SV-ARBEC). As moléculas foram coaplicadas na câmara superior do modelo de BBB *in vitro* em combinações emparelhadas (molécula de controle e teste) e quantificadas por quantitação de espectrometria de massa (MRM) no compartimento inferior; valor de P_{APP} para cada uma foi calculado durante 90 min. A concentração de admissão (câmara superior) de FC5-Li81 foi entre 1,5 e 3 µM (fase linear) com admissão equimolar de vários anticorpos de controle coadministrados. Resultados dessa análise são mostrados na **Figura 11**. Todas as amostras mostraram transporte mediado por FC5 aumentado em relação aos controles com melhoramentos em valores de P_{APP} na faixa de 2-15 vezes. Os 3 construtos de FC5-(G4S)3-Li81 bivalentes (3014, 3015, 3016) foram, todos, equipotentes, o que indica que a possibilidade de a adição do FC5 ter sido na HC, LC ou em ambas não impactou a atividade dos construtos. Todos mostraram um melhoramento de cerca de 3 vezes no valor de P_{APP}. O mais significativo foram as vezes de melhoramento vistas com FC5-(G_4S)1-Li81 (3438), na medida em que essa versão mostrou um aumento de cerca de 15 vezes em seu valor de P_{APP}, ~5 vezes mais que o FC5-(G_4S)3-Li81 correspondente (3015). Os construtos de FC5-(G_4S)3-Li81 (3015) e FC5-(G_4S)1-Li81 (3438) se diferiram apenas no comprimento da sequência G_4S (SEQ ID Nº:5) que conecta FC5 com Li81, na medida em que ambos contêm o FC5 fundido à HC de Li81. Construto de FC5-(G_4S)1-Li81 (3440) no qual FC5 foi

fundido ao Fc e o Fab de Li81 foi preso ao terminal C do Fc através de um ligante (G_4S)1 também mostrou um grande melhoramento de ~12 vezes em seu valor de P_{APP}. Por outro lado, quando o mesmo projeto de construto com uma articulação mais curta, porém, mais flexível (3441) foi testado, o mesmo mostrou apenas um melhoramento de cerca de 6 vezes em seu valor de P_{APP}. Assim, similar ao que foi visto com o comprimento de ligante que conecta construtos 3015 e 3438, o projeto da articulação em construtos 3440 e 3441 impactou a atividade de transporte *in vitro* dos construtos. As 3 versões heteroméricas (3442, 3443 e 3444), mostraram melhoramentos relativos ao controle na faixa de 2-5 vezes. Embora os aumentos em transporte fossem significativos, esses construtos não foram testados em estudos *in vivo*.

[302] O ensaio de transpoço *in vitro* foi realizado como a seguir. SV-ARBECs foram semeados em 80000 células/membrana em insertos de célula de Falcão de 0,83 cm^2 revestidos com colágeno de cauda de rato, 1 µm de tamanho de poro em meios de alimentação de SV-ARBEC de 1 ml sem vermelho de fenol. Os poços de uma placa de cultura de tecido de 12 poços (*isto é,* câmara inferior para transporte) contiveram 2 ml de mistura de 50:50 (v/v) de meios de SV-ARBEC sem meios condicionados por astrócito de rato e vermelho de fenol. A caracterização modelo é descrita em detalhes em Garberg et al., *Toxicol In Vitro*, 19(3):299-334 (2005). O modelo foi usado quando Pe[sacarose] esteve entre 0,4 e 0,6 [$x10^{-3}$] cm/min. Experimentos de transporte foram realizados conforme descrito em Haqqani et al., *Mol. Pharm*., 10:1542–1556 (2012) adicionando-se uma mistura de amostra de teste e controle em concentrações equimolares na câmara superior e coletando-se as alíquotas de 100 µl (com substituição subsequente por 100 µl de tampão de transporte) a partir da câmara inferior em 15, 30, 60 e 90 min para quantificação simultânea de todos os anticorpos com o uso de método SRM-ILIS multiplexado. O coeficiente de permeabilidade aparente Papp

foi calculado conforme descrito anteriormente (Haqqani et al., 2012 (*supra*)).

[303] Para testar se os construtos de FC5-Li81 mostraram atividade de transporte de BBB *in vivo*, construtos 3015, 3438 e 3440 foram testados no modelo de Hargreaves de hiperalgesia inflamatória. Nesse modelo os construtos foram quimicamente conjugados com Dalargin, administrados através de injeção intravenosa (IV), e a resposta à dor medida ao longo do tempo. A metodologia para executar o modelo é conforme descrita anteriormente (Farrington et al, A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics, *FASEB J*., 28(11):4764-78 (2014)). Dalargin de peptídeo opioide não cruza a BBB e não é analgésico após dosagem sistemática. Conforme mostrado na **Figura 12**, a dosagem sistemática dos conjugados de Dalargin de FC5-Li81 induziu uma resposta analgésica significativa. Os dados mostram que Dalargin quimicamente ligado ao FC5-Li81 pode engatar em receptores opioides centrais após administração sistemática. Valores de AUC para os três tratamentos foram similares na faixa de 25-35% do efeito máximo possível (MPE). **A Figura 13A** mostra a dependência de dose das respostas dos três construtos e Li81 como em controle no modelo. **A Figura 13B** é uma plotagem de construto 3438 e Li81. Tratamento de FC5-Li81 resultou em um MPE de 20%, conforme uma % de área sob a curva (AUC) ocorreu em dose 10 vezes menor do que para Li81 sozinho, assim, se indica que a adição de FC5 ao Li81 melhorou sua habilidade em cruzar a barreira hematoencefálica e engatar nos receptores opioides.

[304] As fusões de FC5-Li81 e Li81 sozinho foram conjugados com análogo de Dalargin Tyr-dAla-Gly-Phe-Leu-Arg-cisteamida (Dal-Cys) com o uso do método geral, conforme descrito por Mattson et al., *Mol. Biol. Rep*., 17:167–183 (1993). Brevemente, sulfo-succinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC; Pierce Rockland, IL,

E.U.A) a 10 mg/ml em N,N-dimetilformamida foi adicionado em um excesso molar de 7,5 vezes ao anticorpo de teste a 1–2 mg/ml em PBS. A reação foi incubada por 2,5 h em temperatura ambiente, e Dal-Cys em 50 mM de MES (pH 6,0) foi adicionada em um excesso molar de 4 vezes ao SMCC. A proteína identificada com Dal foi concentrada em um dispositivo de centrifugação e dessalinizada para remover Dal-Cys e SMCC não conjugados. A estequiometria de Dalargins/molécula foi determinada a partir da análise de espectrometria de massa intacta de proteínas identificadas. **A Figura 11** mostra a atividade de transporte de conjugados de Dalargin de 3015 e 3016. Sob essas condições a conjugação resultou em uma diminuição de 20-40% em valores de P_{APP} em relação às proteínas correspondentes sem Dalargin adicionado.

[305] Embora a avaliação de conjugados de Dalargin de Li81 e os construtos de FC5-Li81 tenha fornecido evidência *in vivo* clara de que fusões de um anticorpo com FC5 podem melhorar sua entrega no sistema nervoso central (SNC), a duração da leitura de opioide durou apenas 4 horas. De modo a obter uma leitura mais quantitativa do transportador e explorar a duração do efeito, os inventores realizaram uma análise farmacocinética que avalia níveis de soro e SNC através de espectrometria de massa em 24, 48 e 72 h após administração intravenosa. **A Figura 14** mostra resultados da análise de Li81 e três construtos de FC5-Li81 (3015, 3438, e 3441) em doses de 20, 65 e 200 nmol/kg. Todas as fusões de FC5 em todas as concentrações resultaram em níveis de CSF elevados em 24 horas em relação aos níveis observados com mAb de Li81 e houve uma dependência clara dos níveis de CSF com a dose administrada. Por outro lado, no ponto no tempo de 72 h a diferença do controle foi diminuída. Consistente com isso, as razões de CSF/soro para as fusões de FC5 diminuíram ao longo do tempo, enquanto razões de CSF/soro de Li81 foram relativamente constantes em todos os pontos no tempo e em todas as doses. Esses

dados verificam que FC5 melhora a entrega de Li81 no SNC, porém, o efeito é reduzido ao longo do tempo.

EXEMPLO 2: PRODUÇÃO DE FC5-(G_4S)1-Li81

[306] FC5-(G_4S)1-Li81

[307] Cadeia Leve GC058

MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCDIQMTQSP ATLSLSPGER ATLSCRASQS VSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI YDASNRATGI PARFSGSGSG TDFTLTISSL EPEDFAVYYC QQRSNWPMYT FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID Nº:2)

[308] Cadeia Pesada pYL945

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLQASGGGL VQAGGSLRLS CAASGFKITH YTMGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMNSLKPEDT ADYYCAAGST STATPLRVDY WGKGTQVTVS SGGGGSEVQL LESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSAYEM KWVRQAPGKG LEWVSVIGPS GGFTFYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCATEGDNDA FDIWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG (SEQ ID Nº:7)

[309] FC5-(G_4S)1-Li81 foi expresso em células CHO. Para preparação do meio condicionado, células CHO transfectadas a partir

de um aglomerado não separado foram expandidas em meios livres de soro, cultivadas até a alta densidade, alimentadas com complementos e comutadas para uma temperatura reduzida. Culturas foram mantidas nessa temperatura reduzida por 14 dias e, então, colhidas por centrifugação e clarificadas por filtração de 0,45 mícron. 1,8 l de meio de cultura clarificado e filtrado (titulação estimada de FC5-Li81 de 150 mg/l) foram carregados em uma coluna de proteína A de 20 ml. A coluna foi lavada com 10 mM de Na_2HPO_4 pH 7,0, 150 mM de NaCl e FC5-(G_4S)1-Li81 foi eluído a partir da coluna com 25 mM de Na_2HPO_4 pH 2,8, 100 mM de NaCl pH 2,8 e neutralizado com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 8,6 diluído a partir de uma solução de reserva de 0,5 M. O teor de proteína das amostras eluídas foi estimado a partir da absorção em 280 nm com o uso de um coeficiente de extinção de 1,4 para uma solução de 1 mg/ml. 290 mg de FC5-(G_4S)1-Li81 purificado foram recuperados. A preparação foi filtrada, aliquotada e armazenada a -70°C.

EXEMPLO 3: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FC5 (G_4S)1-Li81 EM SORO DE RATO

[310] Uma análise farmacocinética de FC5-(G_4S)1-Li81 em ratos depois de dosagem intravenosa a 30 mg/Kg e medição de níveis de soro e CSF em 24, 48 e 72 horas, revelou que a atividade de transportador de FC5 diminuiu ao longo do tempo, em que estava mais alta em CSF no ponto no tempo mais precoce testado 24 horas com uma razão de CSF/soro de 0,45%, diminuiu até uma razão de CSF/soro de 0,28% em 48 horas e diminuiu mais até uma razão de CSF/soro de 0,13% após 72 horas. Resultados dessa análise são apresentados na **Figura 15**. Níveis de soro de FC5-(G_4S)1-Li81 no ponto no tempo de 72 horas foram de ~150 µg/ml e, portanto, não representam a redução de proteína detectada no CSF.

[311] Para determinar se a perda de atividade de transporte resultou de uma alteração nas propriedades bioquímicas ou funcionais

de FC5-(G_4S)1-Li81, três ratos receberam doses intravenosas com 30 mg/Kg de FC5-(G_4S)1-Li81 e a proteína foi purificada a partir do soro após 72 horas e caracterizada como a seguir. Após 72 horas, os animais dosados foram exsanguinados e o soro foi preparado. O soro foi filtrado através de uma unidade de filtro acionada por seringa de 0,45 µ. 12 ml de soro aglomerado dos 3 ratos foram carregados em lote por 1,5 h em 350 µl de Ig-Select (GE Healthcare). A resina foi coletada em uma coluna, lavada com 12 volumes de coluna de 20 mM de Na_2HPO_4 pH 7,0, 150 mM de NaCl (PBS), 12 volumes de coluna de 25 mM de NaH_2PO_4 pH 5,5, 100 mM de NaCl e, então, eluída com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 2,8, 100 mM de NaCl pH 2,8. Frações de 200 µl foram coletadas. O teor de proteína das amostras eluídas foi estimado a partir da absorção em 280 nm com o uso de um coeficiente de extinção de 1,4 para uma solução de 1 mg/ml (frações 4-7 aglomeradas e neutralizadas com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 8,6 diluído a partir de solução de reserva de 0,5 M). O aglomerado de eluição de 800 µl teve uma concentração de 1,9 mg/ml. Recuperações foram >90% com base nas concentrações medidas de FC5-(G_4S)1-Li81 no soro, conforme determinado por MRM. A amostra foi aliquotada, liofilizada em gelo seco e armazenada a -70°C. Como um controle para processamento de amostra, 1,2 mg de FC5-(G_4S)1-Li81 foram injetados em 10 ml de soro de rato Wistar (Innovative Research, Inc.) e submetidos ao processo de purificação de amostra na medida como a amostra que foi recuperada a partir do estudo *in vivo*. **A Figura 16** mostra uma análise das amostras purificadas por SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. As bandas de 60 kDa de cadeia pesada (HC) e 25 kDa de cadeia leve (LC) de FC5-Li81 foram observadas sob condições redutoras e o complexo de 2FC5Li81HC-2LC tetramérico de 175 kDa característico foi observado sob condições não redutoras. As amostras de Li81 mostraram os perfis de eluição de cromatografia de exclusão de

tamanho (SEC) esperados (**Figura 17**) que eluem como picos proeminentes únicos com massas moleculares de 165 kDa.

[312] A atividade biológica das amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 foi avaliada em um ensaio de cultura celular de transpoço de BBB *in vitro* em células SV-ARBEC. As moléculas foram coaplicadas na câmara superior do modelo de BBB *in vitro* em várias combinações emparelhadas (molécula de controle e teste) e quantificadas por MRM no compartimento inferior; valor de Papp para cada uma foi calculado durante 90 min. A concentração de admissão (câmara superior) de amostras de FC5-Li81 foi entre 1,5 e 3 µM (fase linear) com admissão equimolar de vários anticorpos de controle coadministrados. Resultados dessa análise são mostrados na **Figura 18**. Atividade de transporte de FC5-(G_4S)1-Li81 não foi significativamente alterada após 72 horas em ratos.

[313] As amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 foram submetidas à caracterização extensiva por espectrometria de massa. Primeiro, a análise de massa intacta sob ambas condições redutoras e não redutoras mostrou que o principal componente em todas as amostras foi a proteína prevista, FC5-(G_4S)1-Li81 (massa prevista não reduzida 171528,3 Da; solução de dosagem de massa observada 171530 Da, amostra injetada 171530 Da, amostra de soro em 72 horas 171534 Da: massa prevista reduzida FC5Li81 HC 62153,9 Da; solução de dosagem de massa observada 62155 Da, amostra injetada 62154 Da, amostra de soro em 72 horas 62154 Da: massa prevista reduzida LC 23628,4 Da; solução de dosagem de massa observada 23629 Da, amostra injetada 23629 Da, amostra de soro em 72 h 23629 Da). Resultados dessas análises são mostrados nas **Figuras 19, 20 e 21**. Nenhuma modificação inesperada no principal componente foi observada. Para essa análise cerca de 20 pmol de cada amostra foram analisados sob condições não redutoras e redutoras (40 mM de DTT em 4 M de ureia e 10 mM de

EDTA a 37°C por uma hora) no espectrômetro de massa Xevo G2 com o uso de uma coluna de 20 µm de Microdessalinização MassPREP (2,1 id x 5 mm Phenyl, Waters) para separação. As massas moleculares foram geradas por desconvolução com o uso do programa MaxEnt 1. Depois, a estrutura de dissulfeto para todas as cisteínas foi determinada através de mapeamento de peptídeo com detecção por LC/MS. **A Figura 22** mostra mapas de peptídeo reduzido e não reduzido para as 3 amostras de teste. Análise de peptídeos que contêm dissulfeto mostraram que as ligações de dissulfeto principais são todas conforme esperado para cada amostra (**Tabela 2**).

TABELA 2. LISTA DE PRINCIPAIS PEPTÍDEOS LIGADOS AO DISSULFETO EM FC5(G$_4$S)1Li81

Peptideo	n° Cys	Massa de Peptídeo Calculada (Da)	RT (Min)	m/z	Estado de Carga	Massa (Da)	Intensidade (Contagens)		
							controle	ponta	72h
LC19-24=LC62-91	C1=C2	3951.793	50.0	1318.278	3	3951.810	2419334	1699454	1256866
LC128-143=LC192-208	C3=C4	3555.749	45.6	1186.263	3	3555.765	4302261	2820901	2137050
LC209-215=HC347-350	C5=C7	1260.486	18.2	631.254	2	1260.492	188979	114375	114513
LC209-215≡HC347-350	C5≡C7 (trissulfeto)	1292.458	19.4	647.241	2	1292.466	6948 ~4.4%	3439 ~4.3%	N/D
HC20-28=HC77-108	C1=C2	4361.029	36.4	1454.693	3	4361.056	1779579	1013912	493717
HC147-162=HC215-249	C3=C4	5382.348	48.2	1795.132	3	5382.371	682418	378427	185398
HC262-275=HC276-338	C5=C6	7916.919	53.8	1584.397	5	7916.944	2073621	1556210	1178534
HC351-376=HC351-376	C8=C8, C9=C9	5454.783	53.1	1364.709	4	5454.806	1205007	818185	721037
HC351-376≡HC351-376	C8≡C8/C9≡C9 (trissulfeto)	5486.755	52.5	1372.697	4	5486.757	~1.1%	1288 ~1.2%	N/D
HC351-376=HC351-374	C8=C8, C9=C9	5229.636	55.2	1308.422	4	5229.654	1033732	679782	568233
HC384-402=HC449-450	C10=C11	2328.098	30.5	777.044	3	2328.108	2859382	1817917	1267722
HC489-498=HC543-567	C12=C13	4087.957	35.4	1023.003	4	4087.982	100423	98857	110635
HC489-498=HC545-567	C12=C13	3844.824	36.4	1282.623	3	3844.844	1678858	1150987	589348

* Quantidade calculada a partir de EIC

[314] Notavelmente, a presença do C1-C2 dissulfeto de cadeia pesada indica que o domínio de FC5 é apropriadamente dobrado na proteína de fusão. Análise mostrou que o nível de trisulfeto, com base na área de pico de cromatogramas de íon extraído (EICs), foi de ~4,5% da ligação entre a cadeia pesada (Cys348) e a cadeia leve (Cys215) e de ~1% na articulação da cadeia pesada em amostras de controle e ponta. Trissulfetos não foram observados na amostra de 72 h, consistente com os dados de trissulfeto anteriormente publicados para Li81 (mAb1-B em Gu et al. 2010. *Anal Biochem.* 400(1):89-98). Os métodos usados para mapeamento de peptídeo de dissulfeto das amostras de FC5-(G$_4$S)1-Li81 são como a seguir. Cerca de 1,4 µl de 4-

vinilpiridina diluída em 1:10 (em 8 M de cloridrato de guanidina) foram adicionados a uma solução que contém ~24 µg (240 pmol, não reduzidos) de proteína, imediatamente seguido pela adição de 60 µl de 8 M de HCl de guanidina (volume final foi de ~70 µl). A solução foi mantida em temperatura ambiente no escuro por 45 min. Proteína em cada frasco foi recuperada através de precipitação com 40 volumes de etanol resfriado. A mistura foi armazenada a -20°C por uma hora e, então, centrifugada em 14000 g por 12 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com etanol resfriado. A pelota de proteína foi redissolvida com 100 µl de 0,1% de ácido trifluoroacético em 50% de acetonitrila e seca em um Speed-Vac por 1,5 h. Dois métodos de mapeamento de peptídeo diferentes foram usados para analisar as amostras; em que um utiliza endoproteinase Lys-C e tripsina, e o outro com endoproteinase AspN. Para os mapas de LysC/tripsina, cerca de 8 µg da proteína tratada com 4-vinilpiridina em cada amostra foram digeridos com 5% (p/p) endoproteinase Lys-C (Wako) em 2 M de ureia, 0,15 M de Tris-HCl, pH 6,7, 2 mM de $CaCl_2$, 5 mM de metilamina, em temperatura ambiente por 5 h, então, 5% (p/p) de tripsina (Promega) foi adicionado. A digestão foi mantida por mais 4 h em temperatura ambiente seguida pela adição de 5% (p/p) de tripsina e, então, a digestão foi mantida em temperatura ambiente de um dia para o outro. O volume total foi de 50 µl. Para digestões com AspN, cerca de 4 µg da proteína tratada com 4-vinilpiridina foram digeridas com 5% (p/p) de Asp-N (Roche) em 2 M de ureia, 0,15 M de Tris-HCl, pH 6,7, 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de metilamina, em temperatura ambiente por 8 horas, então, 5% (p/p) de Asp-N foi adicionado e a digestão foi mantida de um dia para o outro. O volume total foi de 50 µl. Antes da análise das digestões por LC-MS, cada digestão foi arrefecida bruscamente adicionando-se 1 µl de 25% de ácido trifluoroacético e 4 M de ureia. Metade da digestão de Lys-C/tríptica e toda a digestão de Asp-N foram reduzidas com 100 mM de TCEP em 1 mM de EDTA em

temperatura ambiente por uma hora. Uma alíquota (~4 µg) das digestões de Lys-C/tríptica não reduzidas e reduzidas e das digestões de Asp-N reduzidas foi analisada em um sistema de LC-MS composto por um sistema UPLC-Xevo G2-S. O gradiente de separação e a coluna foram iguais conforme descrito na seção de mapeamento de peptídeo. Dados de mapeamento de dissulfeto foram processados com o uso de BioPharmaLynx 1.3.3.

[315] Os mapas de Lys-C/tríptico e Asp-N reduzidos de amostras não reduzidas tratadas com 4-vinilpiridina foram examinados para avaliar níveis de tiol livre e para avaliar se houve diferenças significativas no nível de tiois livres nas amostras de controle, ponta e 72 horas. A quantidades de tiois livres foram estimadas a partir de cromatogramas de íon extraído (EIC). A análise revelou pequenas quantidades de tiois livres em todas as amostras, porém, nenhum na região de FC5. Níveis de tiol livre foram 2-3 vezes superiores na amostra de 72 horas do que aqueles nas amostras de controle e ponta.

[316] Comparação sistemática das recuperações de peptídeo nos mapas de peptídeo das amostras de 72 horas e ponta com aquelas nos mapas da amostra de controle sem exposição ao soro de rato indicou que recorte de N terminal da cadeia pesada de FC5-Li81 ocorreu em soro uma vez que a recuperação de peptídeo diminuiu gradualmente a partir da extremidade da região variável de HC (HC de peptídeo 215-249) até o terminal N (HC de peptídeo 1-19) (**Figura 22**). Recuperação do peptídeo de N terminal (resíduos de HC 1-19) foi de 60%, o que indica que 40% da proteína careceu desse peptídeo. Recuperação do peptídeo seguinte (HC29-38) foi de 70% e a recuperação de peptídeo 51-65 foi de 80%. Por outro lado, a recuperação de peptídeos a partir de dentro da HC de Li81 foi de ~100%, o que indica que o recorte foi altamente restrito dentro da porção de FC5 da proteína de fusão. Recorte de N terminal foi detectado na amostra de ponta de soro; no

entanto, a extensão de recorte foi muito maior na amostra de 72 horas do que na amostra de ponta (**Figura 23**). Por outro lado, a recuperação de peptídeos de cadeia leve foi próxima a 100% ao longo da sequência para todas as amostras (**Figura 24**). Essas constatações indicam que a porção de FC5 da proteína de fusão é lábil em soro e que proteólise em múltiplos sítios dentro do domínio de FC5 resulta em fraca recuperação do peptídeo de N terminal.

EXEMPLO 4: HUMANIZAÇÃO DE FC5

[317] Para reduzir o risco de imunogenicidade de FC5 em seres humanos, enquanto se mantém a solubilidade e a estabilidade, uma série de variantes de sequência de FC5 com graus variados de homologia com o framework de consenso V_H3 humano foram projetadas. Para todas as variantes, as nove mutações de humanização seguintes foram incluídas: Q5V, A6E, A14P, A75S, K87R, P88A, D93V, K114Q e Q117L. Mutações nas seis posições de framework restantes que distinguem projetos de humanização diferentes são listadas na **Tabela 3**. Essas incluem mutações na interface de VH/VL de IgG humana correspondente (posições de aminoácido 37, 44, 45 e 47) assim como nas posições de aminoácido 1 e 79. Humanização parcial das posições de interface correspondentes é sondada em mutantes H31 e H32. Por fim, tanto o framework de tipo selvagem de FC5 de camelídeos quanto o framework de consenso de V_H3 humano contêm uma metionina em CDR-H1 (M34) que pode ser parcialmente exposto ao solvente, com base em um modelo computacional de FC5 (consultar abaixo). Metionina exposta pode ser um risco ao desenvolvimento devido a seu potencial para ser modificada através da oxidação. Assim, cada projeto de humanização foi produzido com e sem uma substituição de M34T, conforme indicado na **Tabela 3**. Nos construtos de número ímpar, a metionina na posição 34 é retida e nos construtos de número par a metionina é substituída por uma treonina.

TABELA 3: LISTA DE PROJETOS DE HUMANIZAÇÃO DE FC5 DE DISTINÇÃO DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO

Posição	1	34	37	44	45	47	79
Camelídeo	D	M	F	E	R	F	V
H11	E	M	V	G	L	W	L
H12	E	T	V	G	L	W	L
H31	E	M	F	G	L	F	V
H32	E	T	F	G	L	F	V
H61	D	M	F	E	R	F	V
H62	D	T	F	E	R	F	V
H71	E	M	F	E	R	F	L
H72	E	T	F	E	R	F	L

[318] A Tabela 4 fornece as sequências de V_HH completas dos oito projetos de variante de FC5 humanizados listados na Tabela 3 (substituições de resíduo em negrito), assim como sequências para os projetos de hIgG1-Fc agly de articulação curta e longa.

TABELA 4: VARIANTES DE FC5 HUMANIZADAS

SEQ ID Nº.	**Variante Humanizada**	**Sequência de Aminoácidos**
10	H11	**E**VQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYTMGW **V**RQAPGK**GL**E**W**VSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNT**L**YLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
11	H12	**E**VQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYT**T**GW **V**RQAPGK**GL**E**W**VSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNT**L**YLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
12	H31	**E**VQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYTMGW FRQAPGK**GL**EFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNTVYLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
13	H32	**E**VQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYT**T**GW FRQAPGK**GL**EFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR

		DN**S**KNTVYLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
14	H61	DVQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYTMGW FRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNTVYLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
15	H62	DVQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYT**T**GW FRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNTVYLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
16	H71	**E**VQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYTMGW FRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNT**L**YLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
17	H72	**E**VQL**VE**SGGGLVQ**P**GGSLRLSCAASGFKITHYT**T**GW FRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISR DN**S**KNT**L**YLQMNSL**RA**EDTA**V**YYCAAGSTSTATPLR VDYWG**Q**GT**L**VTVSS
18	*Articulação curta* hIgG1 Fc agly	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGC
33	*Articulação longa* hIgG1 Fc agly	**AEPKSCD**KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

[319] Um modelo de computador de FC5 foi gerado combinando-se atribuições dos átomos de cadeia principal de um estudo de RMN de FC5, que divulgaram recursos estruturais do framework de FC5 e CDR-H3, com uma análise de conformações prováveis para CDRs H1 e H2, com o uso do servidor web PyIgClassify (http://dunbrack2.fccc.edu/PyIgClassify/). Essa informação foi usada para orientar a seleção de estruturas de cristal de raio x a partir do Banco de Dados de Proteína (PDB) como modelos. Os modelos combinaram coordenadas para o framework e CDRs H1 e H2 de estruturas de cristal e para a CDR-H3 a partir do estudo de RMN. Modelos dos projetos de variante humanizada H62 e H12 são mostrados na **Figura 25**. Os resíduos de cadeia lateral na superfície da interface de VH/VL humana correspondente são indicados.

[320] Variantes de humanização de FC5 foram expressas como fusões de hIgG1 Fc (aglicosiladas), com o ligante de articulação curta (KTHTCPPCP (**SEQ ID Nº:19**)), em células CHO de DG44 e purificadas por cromatografia de afinidade de Sepharose de Proteína A. Para preparação do meio condicionado, células CHO transfectadas a partir de um aglomerado não separado foram expandidas em meios livres de soro, cultivadas até a alta densidade, alimentadas com complementos e comutadas para uma temperatura reduzida. Culturas foram mantidas nessa temperatura reduzida por 14 dias e, então, colhidas por centrifugação e clarificadas por filtração de 0,45 mícron. 1,8 l de meio de cultura clarificado e filtrado foram carregados em uma coluna de Proteína A de 25 ml (MabSelect SuRe; GE). A coluna foi lavada com 20 mM de Na_2HPO_4 pH 7,4, 150 mM de NaCl e moléculas de FC5-hFc foram eluídas com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 2,8, 100 mM de NaCl, neutralizadas com 12,5 mM de Na_2HPO_4 pH 8,6 diluídas a partir de uma solução de reserva de 0,5 M. Proteínas purificadas foram analisadas quanto ao tamanho e homogeneidade desnaturando-se eletroforese

capilar microfluídica (LabChip GXII Protein Express Assay; Perkin Elmer). Todas as moléculas mostraram o tamanho esperado de um dímero VHH-hFc sob condições não redutoras e do monômero correspondente sob condições redutoras (**Figura 26**), sem agregados aparentes ou produtos de proteólise. Análise de espectrometria de massa intacta de amostras reduzidas confirmou a correspondência entre massa prevista e medida para todas as variantes de humanização de FC5-hFc (dentro de 5 Da; **Figura 27**).

[321] Análise de cromatografia de exclusão de tamanho foi realizada para todas as variantes de FC5-hFc em uma coluna de sílica de 7,8 x 300 mm Biosep s3000 (Phenomenex) a 0,6 ml/min em 100 mM de Na_2HPO_4, 200 mM de NaCl, pH 6,8. Todas as variantes de humanização eluíram como picos únicos (**Figura 28**), porém, H11, H12, H31, H32 e H72 tiveram tempos de eluição significativamente atrasados, que é indicativo de interações com a resina de sílica. Notavelmente, H31 e H32 mostraram alargamento de pico extensivo com ombros de ascendência e descendência estreitos.

[322] Testes adicionais de estabilidade molecular foram realizados em variantes de humanização de FC5-hFc. Perfis de estabilidade térmica gerados por calorimetria de varredura diferencial (VP-DSC, MicroCal) para todas as variantes foram similares, com temperaturas de fusão para os domínios de V_HH e CH2 na faixa de 55-62°C e a temperatura de fusão do domínio de CH3 >90°C (**Tabela 5**). Duas principais transições de fusão observadas por DSC em temperaturas Tm1, que caracteriza desdobramento do domínio hFc CH2 e FC5 VHH, e Tm2, que caracteriza o desdobramento do domínio hFc CH3.

TABELA 5: ESTABILIDADE TÉRMICA DE VARIANTES DE HUMANIZAÇÃO FC5-HFC

Molécula	Tm_1CH2/VHH	Tm_2CH3
FC5 Fc hIgG1	56,5	84,4
FC5 H11 hFc	59,9	92,6
FC5 H12 hFc	55,6	91,6
FC5 H31 hFc	59,5	92,3
FC5 H32 hFc	56,0	91,6
FC5 H61 hFc	61,5	92,2
FC5 H62 hFc	56,8	91,9
FC5 H71 hFc	61,3	92,2
FC5 H72 hFc	56,7	92,1

[323] Pequenas quantidades de precipitado fino foram visíveis nas amostras de variantes de H11, H12 e H32 após quatro meses de armazenamento a 4°C.

[324] A atividade biológica das variantes de humanização FC5-hFc foi avaliada no ensaio de cultura celular de transpoço de BBB *in vitro* com o uso de células SV-ARBEC, conforme descrito no Exemplo 2. As moléculas foram coaplicadas na câmara superior do modelo de BBB in vitro em 1,25 µM em combinações emparelhadas (anticorpo de controle A20.1 e molécula de teste) e quantificadas por MRM no compartimento inferior. Um valor de permeabilidade aparente (P_{APP}) para cada amostra foi calculado durante 60 min. Cada molécula de teste foi testada em culturas de transpoço triplicadas. Resultados dessa análise para FC5-hFc e as variantes de humanização são mostradas na **Figura 29**. Todas as amostras de teste, exceto a variante H72, mostraram transporte

mediado por FC5 com valores de P_{APP} médios de 130-220 $x10^{-6}$ cm/min, e a maioria dentro da faixa histórica para FC5-hFc de tipo selvagem (145-190 $x10^{-6}$ cm/min). H72 mostrou atividade de transporte significativamente inferior àquela das outras variantes de humanização.

[325] Para testar se as variantes de humanização FC5-hFc mostraram atividade de transporte de BBB *in vivo*, FC5-hFc de tipo selvagem, assim como as variantes H32 e H62 foram testadas no modelo de Hargreaves de hiperalgesia inflamatória. Nesse modelo, os construtos foram quimicamente conjugados com Dalargin-cisteína, administrados por injeção i.v., e a resposta à dor medida ao longo do tempo (conforme descrito no Exemplo 1). Conforme mostrado na **Figura 30**, a dosagem sistemática dos conjugados de FC5-hFc e Dalargin induziu uma resposta analgésica significativa que não é significativamente diferente entre tipo selvagem e as variantes de humanização H32 ou H62. A resposta analgésica integrada (valores de AUC) para as três moléculas foi similar, na faixa de 20-30% do efeito máximo possível.

EXEMPLO 5: MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE UM SEGUNDO DISSULFETO EM FC5 PARA PROTEÇÃO CONTRA A DEGRADAÇÃO EM SORO DE RATI

[326] Uma série de nove construtos (**Tabela 6**) foram projetados para estabilizar FC5 da degradação por inserção de um segundo dissulfeto nos seguintes sítios: S49C-I70C, T34C-V79C e T33C emparelhados com S102C, T103C, A104C ou T105C em projeto de humanização de FC5 H62, assim como S49C-I70C, T34C-V79C, e T33C-T103C em projeto de humanização de FC5 H32. Modelos moleculares dos dissulfetos modificados geneticamente dentro de V_HH de FC5 são mostrados na **Figura 31**. Nos modelos, as cisteínas modificadas geneticamente são orientadas nas posições que permitiriam que os dissulfetos se formassem. O T34C-V79C cria uma

região de framework de conexão de dissulfeto 2 (entre CDR1 e CDR2) para a região de framework 3 (entre CDR2 e CDR3), S49C-I70C cria regiões de framework de conexão de dissulfeto diferentes 2 e 3, e a série S33C cria dissulfetos que conectam CDRs 1 e 3.

TABELA 6. SEQUÊNCIAS DE FC5 ESTABILIZADAS COM DISSULFETO EXEMPLIFICATIVAS

SEQ ID Nº.	**nº de 4D**	**Posição modificada**	**Sequência de Aminoácidos**
20	4662	H62- S49C/I70C	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTTGWFRQAP GKEREFV**C**RITWGGDNTFYSNSVKGRFT**C**SRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWGQGTLVTVSS
21	4663	H32- S49C/I70C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTTGWFRQAP GKGLEFV**C**RITWGGDNTFYSNSVKGRFT**C**SRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWGQGTLVTVSS
22	4664	H32-T34C/V79C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYT**C**GWFRQAP GKGLEFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNSKNT**C**YLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLR VDYWGQGTLVTVSS
23	4665	H62-T34C/V79C	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYT**C**GWFRQAP GKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNSKNT**C**YLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLR VDYWGQGTLVTVSS
24	4666	H62-T33C/S102C	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHY**C**TGWFRQAP GKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGST**C**TATPLR VDYWGQGTLVTVSS
25	4667	H62-T33C/T103C	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHY**C**TGWFRQAP GKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTS**C**ATPLR VDYWGQGTLVTVSS
26	4668	H62-T33C/A104C	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHY**C**TGWFRQAP GKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTST**C**TPLR VDYWGQGTLVTVSS
27	4669	H62-T33C/T105C	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHY**C**TGWFRQAP GKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTA**C**PLR VDYWGQGTLVTVSS
28	4670	H32-T33C/T103C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHY**C**TGWFRQAP GKGLEFVCRITWGGDNTFYSNSVKGRFTCSRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAGSTS**C**ATPLR VDYWGQGTLVTVSS

[327] Os construtos foram expressos em células CHO e purificados por cromatografia de Sepharose de Proteína A. **A Tabela 7** mostra uma lista dos nove construtos e os rendimentos de purificação de 250 ml do meio condicionado.

TABELA 7. LISTA DE CONSTRUTOS

	n° de 4D	Plasmideo1	Plasmideo2	Proteína	Rendimento mg	Conc. mg/ml
1	4662	YL1289	GC058	FC5-H62(S49C/I70C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	3	1,34
2	4663	YL1290	GC058	FC5-H32(S49C/I70C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	0,5	0,81
3	4664	YL1291	GC058	FC5-H32(T34C/V79C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	2	0,96
4	4665	YL1292	GC058	FC5-H62(T34C/V79C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	6	1,49
5	4666	YL1293	GC058	FC5-H62(T33C/S102C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	3	0,64
6	4667	YL1294	GC058	FC5-H62(T33C/T103C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	3,7	0,75
7	4668	YL1295	GC058	FC5-H62(T33C/A104C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	2,4	0,86
8	4669	YL1296	GC058	FC5-H62(T33C/T105C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	1	1,83
9	4670	YL1297	GC058	FC5-H32(T33C/T103C)-G4S-Li81 T299A hulgG1,kappa	1	0,8

[328] Níveis de expressão dos construtos foram estimados em 7-20 mg/l por Octet. Para purificação, meios de cultura clarificados e filtrados foram carregados em colunas de proteína A de 0,5-0,8 ml, lavados com 5 volumes de coluna de 20 mM de Na_2HPO_4 pH 7,4, 100 mM de NaCl e, então, com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 5,5, 100 mM de NaCl. FC5-Li81 foi eluído a partir das colunas com 25 mM de NaH_2PO_4 pH 2,8, 100 mM de NaCl pH 2,8 e neutralizado com 25 mM de Na_2HPO_4 pH 8,6, diluído a partir de uma solução de reserva de 0,5 M. O teor de proteína das amostras eluídas foi estimado a partir da absorção em 280 nm com o uso de um coeficiente de extinção de 1,4 para uma solução de 1 mg/ml. Análise SDS-PAGE mostrada na **Figura 32** confirmou a expressão da HC e LC, e montagem no complexo tetramérico de HC2LC2 característico sob condições não redutoras. Amostra 4669 mostrou alguma translocação de dissulfetos refletidos na heterogeneidade nas bandas vistas sob condições não redutoras (denotadas com seta). As amostras de FC5-Li81 mostraram todas os perfis de cromatografia de exclusão de tamanho esperados, em que cada um elui como picos proeminentes únicos com massas moleculares de 165 kDa.

[329] A atividade biológica das amostras de FC5-(G_4S)1-Li81 estabilizadas com dissulfeto foi avaliada no ensaio de cultura celular de transpoço de BBB *in vitro* em células SV-ARBEC conforme descrito no Exemplo 2. As moléculas foram coaplicadas na câmara superior do modelo de BBB *in vitro* em combinações emparelhadas (anticorpo de controle Anti-HEL e molécula de teste) e quantificadas por MRM no compartimento inferior; Um valor de P_{APP} para cada amostra foi calculado durante 90 min. A concentração de admissão (câmara superior) estava entre 1,5 e 3 µM (fase linear) com a admissão equimolar do anticorpo de controle coadministrado. Resultados dessa análise para 7 dos construtos estabilizados com dissulfeto são mostrados na **Figura 33**. Todas as amostras de teste mostraram transporte mediado por FC5 com valores de P_{APP} médios de 100-130 $x10^{-6}$ cm/min. Atividade de transporte de FC5-(G_4S)1-Li81 não foi significativamente alterada pela inserção do segundo dissulfeto.

[330] Para avaliar se as cisteínas/dissulfetos inseridos estabilizaram os construtos contra proteólise, amostras foram incubadas com pepsina em uma razão de 1:30 (pepsina:amostra) para 2,5 h a 37°C e analisadas por SDS-PAGE. **As Figuras 34 e 35** mostram resultados dessa análise. Digestão de pepsina de Li81 (**Figura 34** pista 6) resultou na formação do fragmento Fab'2 característico (100 kDa) e fragmentos Fc de baixo peso molecular que são normalmente vistos quando um anticorpo é tratado com pepsina e especificamente descrito para mAb de Li81 (Pepinsky et al., *J Pharmacol Exp Ther.*, 339:519-529 (2011)). A digestão de pepsina de FC5-H32-G_4S-Li81 (Figura 34, pista 8) resultou em uma série de fragmentos levemente maiores consistentes com a presença de FC5 V_HH e fragmentação dentro do domínio de FC5. Conforme visto com mAb de Li81, o tratamento de pepsina desse construto também resultou na clivagem do Fc em fragmentos de baixo peso molecular. Por outro lado, FC5-

H32(T34C/V79C)-G_4S-Li81 e FC5-H32(T33C/T103C)-G_4S-Li81 mostraram menos clivagem das bandas específicas para o domínio de FC5, o que indica estabilização do FC5. Digestão de pepsina de construtos FC5-H62-G4S-Li81 (Figura 35) também resultou nas alterações nos modelos de fragmentação de bandas de pesos de molécula similares. Notavelmente, FC5-H62(S49C/I70C)-G_4S-Li81, FC5-H62(T34C/V79C)-G_4S-Li81, FC5-H62(T33C/T103C)-G_4S-Li81, e FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 foram mais estáveis que FC5-H62(T33C/S102C)-G_4S-Li81 e FC5-H62(T33C/T105C)-G_4S-Li81. Essas constatações indicam que a adição de um segundo dissulfeto pode proteger o FC5 V_HH do tratamento de pepsina e que a posição do dissulfeto adicionado pode impactar a extensão na qual o FC5 é estabilizado. Como uma medida independente de estabilização, as amostras também foram analisadas para as alterações em estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial. Todos os construtos de dissulfeto modificado geneticamente mostraram um aumento de 12-13° em Tm da transição que corresponde ao FC5 com um valor de 60°C sem estabilização e 72,7-73,2°C para todos os construtos com os dissulfetos modificados geneticamente.

[331] Amostras 4662, 4665, 4667 e 4668 foram submetidas à caracterização extensiva por espectrometria de massa e avaliação de estabilidade em soro de rato. Primeiro, a análise de massa intacta das amostras de cadeia pesada reduzida 4662 (massa prevista 62172,0 Da, massa observada 62172 Da), 4665 (massa prevista 62172,0 Da, massa observada 62175 Da), 4667 (massa prevista 62170,0 Da, massa observada 62173 Da) e 4668 (massa prevista 62200,0 Da, massa observada 62202 Da) e cadeias leve (massa prevista 23628,4 Da, massa observada 23630 Da) mostrou que os principais componentes em todas as amostras foram a cadeia leve e a cadeia pesada previstas. Os espectros desconvolutos correspondentes são mostrados nas

Figuras 36 e 37. Nenhuma modificação inesperada no principal componente foi observada.

[332] Avaliação de estabilidade de soro foi realizada incubando-se amostras 4662, 4665, 4667 e 4668 por 70 h a 37°C em soro de rato, então, purificando-as em seleção de Ig e submetendo-as ao mapeamento de peptídeo sob condições redutoras e não redutoras, conforme descrito no Exemplo 3. Amostras foram injetadas em soro de rato Wistar em 100 µg/ml e purificadas em seleção de Ig em 50 µl resina/ml de soro. Cada amostra foi comparada a seu controle sem tratamento de soro. Análise de mapas de peptídeo de dissulfeto das amostras de controle e 70 h de construtos FC5-H62-G4S-Li81 4662, 4665, 4667, e 4668 mostrou que as principais ligações de dissulfeto são todas, conforme esperado para cada construto (**Tabelas 8 a 11**).

TABELA 8. LISTA DE PRINCIPAIS PEPTÍDEOS LIGADOS AO DISSULFETO EM FC5-H62(S49C/I70C)-G$_4$S-Li81 (4662)

Peptídeo	Nº Cys	Massa de Peptídeo Calculada (Da)	RT (Min)	m/z	Estado de Carga	Massa (Da)	Intensidade (Contagens)*		Recuperação (%)	
							controle	70h	controle	70h
LC19-24=LC62-91	C1=C2	3951.793	54.5	1318.262	3	3951.763	1423566	1489651	100	105
LC128-143=LC192-208	C3=C4	3555.749	49.6	1186.247	3	3555.718	2594301	2428337	100	94
LC209-215=HC347-350	C5=C9	1260.486	22.9	631.245	2	1260.475	137555	134140	100	97
LC209-215≡HC347-350	C5≡C9 (trissulfeto)	1292.458	23.9	647.232	2	1292.448	5111	4429		
HC20-28=HC88-108	C1=C4	3027.395	35.6	1010.132	3	3027.374	113731	100069	100	88
HC44-50=HC68-72	C2=C3	1547.697	29.3	774.851	2	1547.685	225228	190093	100	84
HC147-162=HC215-249	C5=C6	5382.348	52.7	1346.586	4	5382.312	144594	191955	100	130
HC147-162=HC215-249 oxM161		5398.343	50.5	1350.584	4	5398.306	17557	17286		
HC147-162=HC215-249 oxM161&W235		5414.338	48.1	1811.445	3	5431.311	3411	6701		
HC262-275=HC276-338	C7=C8	7916.919	58.5	1584.381	5	7916.863	1796647	1925570	100	106
HC262-275=HC276-338 oxW286		7948.909	57.7	1590.778	5	7948.852	112057	105877		
HC351-376=HC351-376	C10=C10, C11=C11	5454.783	57.5	1364.695	4	5454.748	1196705	1351732	100	113
HC384-402=HC449-450	C12=C13	2328.098	34.9	777.034	3	2328.078	1643485	1860372	100	113
HC489-498=HC545-567	C14=C15	3844.824	40.8	1282.606	3	3844.794	1124492	1207385	100	104
HC489-498=HC545-567 oxM556		3860.818	38.6	1287.945	3	3860.810	141956	117190		
HC489-498=HC545-567 oxW546		3876.813	40.2	1293.266	3	3876.774	15506	15738		
HC489-498=HC545-567 oxM556& oxW546		3892.808	37.9	1298.603	3	3892.785	50953	39773		

*Intensidades normalizadas para 2 regiões de Fc de cadeia pesada e 2 peptídeos de cadeia leve na amostra de controle

TABELA 9. LISTA DE PRINCIPAIS PEPTÍDEOS LIGADOS AO DISSULFETO EM FC5-H62(T34C/V79C)-G$_4$S-Li81 (4665)

Peptídeo	Nº Cys	Massa de Peptídeo Calculada (Da)	RT (Min)	m/z	Estado de Carga	Massa (Da)	Intensidade (Contagens)*		Recuperação (%)	
							controle	70h	controle	70h
LC19-24=LC62-91	C1=C2	3951.793	54.6	1318.260	3	3951.757	1425942	1368097	100	96
LC128-143=LC192-208	C3=C4	3555.749	49.8	1186.245	3	3555.712	2311821	2244808	100	97
LC209-215=HC347-350	C5=C9	1260.486	22.9	631.243	2	1260.470	117616	111744	100	94
LC209-215≡HC347-350	C5≡C9 (trissulfeto)	1292.458	23.9	647.229	2	1292.443	4941	3708		
HC20-28=HC88-108	C1=C4	3027.395	35.7	1010.128	3	3027.361	339597	238932	100	70
HC29-38=HC77-87	C2=C3	2622.1931	41.8	875.062	3	2622.163	223896	164272	100	77
HC29-38=HC77-87 oxM83		2638.1880	38.5	880.3936	3	2638.157	50152	37979		
HC29-38=HC77-87 oxW36		2654.1829	39.7	885.7216	3	2654.141	3300	4532		
HC29-38=HC77-87 oxM83 & W36		2638.1880	38.5	880.3936	3	2638.157	50152	37979		
HC147-162=HC215-249	C5=C6	5382.348	52.8	1346.584	4	5382.304	281793	218362	100	75
HC147-162=HC215-249 oxM161		5398.343	50.7	1350.582	4	5398.297	34092	21025		
HC147-162=HC215-249 oxM161&W235		5414.338	48.3	1811.435	3	5431.281	12215	6748		
HC262-275=HC276-338	C7=C8	7916.919	58.6	1584.381	5	7916.863	1829138	2057157	100	107
HC262-275=HC276-338 oxW286		7948.909	57.7	1590.779	5	7948.857	122091	39398		
HC351-376=HC351-376	C10=C10, C11=C11	5454.783	57.6	1364.693	4	5454.740	1183538	1159419	100	98
HC384-402=HC449-450	C12=C13	2328.098	35.0	777.031	3	2328.069	1608257	1690746	100	105
HC489-498=HC545-567	C14=C15	3844.824	40.9	1282.600	3	3844.777	1207967	1093265	100	90
HC489-498=HC545-567 oxM556		3860.818	38.7	1287.935	3	3860.783	129822	115462		
HC489-498=HC545-567 oxW546		3876.813	40.3	1293.263	3	3876.764	15835	12474		
HC489-498=HC545-567 oxM556& oxW546		3892.808	37.9	1298.596	3	3892.765	43580	38199		

*Intensidades normalizadas para 2 regiões de Fc de cadeia pesada e 2 peptídeos de cadeia leve na amostra de controle

TABELA 10. LISTA DE PRINCIPAIS PEPTÍDEOS LIGADOS AO DISSULFETO EM FC5-H62(T33C/T103C)-G$_4$S-Li81 (4667)

Peptídeo	Nº Cys	Massa de Peptídeo Calculada (Da)	RT (Min)	m/z	Estado de Carga	Massa (Da)	Intensidade (Contagens)*		Recuperação (%)	
							controle	70h	controle	70h
LC19-24=LC62-91	C1=C2	3951.793	54.7	1318.252	3	3951.731	1503398	1477844	100	98
LC128-143=LC192-208	C3=C4	3555.749	49.9	1186.238	3	3555.690	2509561	2326577	100	93
LC209-215=HC347-350	C5=C9	1260.486	22.9	631.243	2	1260.470	126372	127719	100	101
LC209-215≡HC347-350	C5≡C9 (trissulfeto)	1292.458	23.9	647.229	2	1292.443	1145	1193		
HC20-28= HC29-38=HC88-108	C1=C3 C2=C4	4309.933	39.3	1078.472	4	4309.857	558117	512343	100	92
HC20-28= HC29-38=HC88-108 oxW36		4341.923	37.8	1448.291	3	4341.849	37311	37369		
HC20-28≡HC29-38=HC88-108/ HC20-28=HC29-38≡HC88-108	C1≡C3 C2=C4/ C1=C3 C2≡C4 (trissulfeto)	4341.905	39.8	1086.466	4	4341.830	70183	60037		
HC147-162=HC215-249	C5=C6	5382.348	52.8	1346.575	4	5382.269	191461	207595	100	106
HC147-162=HC215-249 oxM161		5398.343	50.7	1350.573	4	5398.261	25976	22073		
HC262-275=HC276-338	C7=C8	7916.919	58.7	1584.366	5	7916.790	2120976	2125042	100	98
HC262-275=HC276-338 oxW286		7948.909	57.8	1590.766	5	7948.791	163884	123893		
HC351-376=HC351-376	C10=C10, C11=C11	5454.783	57.7	1364.683	4	5454.701	1253039	1295230	100	103
HC384-402=HC449-450	C12=C13	2328.098	35.0	777.026	3	2328.055	1717043	1913877	100	111
HC489-498=HC545-567	C14=C15	3844.824	41.0	1282.594	3	3844.757	1170518	1156914	100	97
HC489-498=HC545-567 oxM556		3860.818	38.7	1287.931	3	3860.770	142015	127815		
HC489-498=HC545-567 oxW546		3876.813	40.4	1293.253	3	3876.737	16963	14321		
HC489-498=HC545-567 oxM556& oxW546		3892.808	38.0	1298.590	3	3892.745	57799	44725		

*Intensidades normalizadas para 2 regiões de Fc de cadeia pesada e 2 peptídeos de cadeia leve na amostra de controle

TABELA 11. LISTA DE PRINCIPAIS PEPTÍDEOS LIGADOS AO DISSULFETO EM FC5-H62(T33C/A104C)-G$_4$S-Li81 (4668)

Peptídeo	Nº Cys	Massa de Peptídeo Calculada (Da)	RT (Min)	m/z	Estado de Carga	Massa (Da)	Intensidade (Contagens)*		Recuperação (%)	
							controle	70h	controle	70h
LC19-24=LC62-91	C1=C2	3951.793	66.9	1318.280	3	3951.817	2250228	2381326	100	106
LC128-143=LC192-208	C3=C4	3555.749	58.2	1186.263	3	3555.6765	3066559	3344356	100	109
LC209-215=HC347-350	C5=C9	1260.486	22.8	631.252	2	1260.487	353717	380399	100	107
LC209-215≡HC347-350	C5≡C9 (trissulfeto)	1292.458	23.8	647.237	2	1292.459	5879	5760		
HC20-28=HC29-38=HC88-108	C1=C3 C2=C4	4339.943	39.3	1085.996	4	4339.952	244385	290784	100	126
HC20-28= HC29-38=HC88-108 oxW36		4371.933	37.8	1093.995	4	4371.948	7310	28718		
HC20-28≡HC29-38=HC88-108/ HC20-28=HC29-38≡HC88-108	C1≡C3 C2=C4/ C1=C3 C2≡C4 (trissulfeto)	4371.916	39.1	1093.990	4	4371.929	14748	15359		
HC147-162=HC215-249	C5=C6	5382.348	65.1	1346.603	4	5382.381	174158	244362	100	144
HC147-162=HC215-249 oxM161		5398.343	62.3	1350.600	4	5398.369	2158	9770		
HC262-275=HC276-338	C7=C8	7916.919	70.5	1584.403	5	7916.978	2414802	2772867	100	121
HC262-275=HC276-338 oxW286		7948.909	69.6	1590.803	5	7948.974	58684	209217		
HC351-376=HC351-376	C10=C10, C11=C11	5454.783	69.4	1364.713	4	5454.821	2060734	2252746	100	109
HC384-402=HC449-450	C12=C13	2328.098	34.7	777.042	3	2328.103	2123906	2092584	100	99
HC489-498=HC545-567	C14=C15	3844.824	40.2	1282.619	3	3844.834	1882199	1833684	100	100
HC489-498=HC545-567 oxM556		3860.818	38.0	773.174	5	3860.829	8510	18830		
HC489-498=HC545-567 oxW546		3876.813	39.6	1293.283	3	3876.826	7189	25999		
HC489-498=HC545-567 oxM556& oxW546		3892.808	37.3	1298.614	3	3892.819	9536	36006		

*Intensidades normalizadas para 2 regiões de Fc de cadeia pesada e 2 peptídeos de cadeia leve na amostra de controle

[333] Além disso, nenhuma ligação perdida foi detectada para os resíduos Cys da região variável e região de FC5 de cadeias pesadas. Análise mostrou que os construtos 4667 e 4668 contêm uma ligação de trissulfeto na região de FC5, *isto é,* uma ligação de trissulfeto em aglomerado de peptídeo ligado ao dissulfeto que contém C1, C2, C3, e C4 [HC 20-28 (C1), HC 88-108 (C3, C4), HC 29-38 (C2)]. O nível do trissulfeto foi de ~11% em construto 4667 e de ~6% em construto 4668. A ligação de trissulfeto entre a cadeia pesada (Cys348) e a cadeia leve (Cys215) foi a maior (13-16%) em construtos 4807 e 4809 (4807 = FC5-H32(E1Q)-G$_4$S-Li81; 4809 = FC5-H62(D1Q)-G$_4$S-Li81), porém, baixa (1-4%) nos construtos restantes 4662, 4665, 4667 e 4668. Apenas pequenas diminuições nos níveis de trissulfetos foram observadas nas amostras de 70 h incubadas em soro de rato Wistar, quando comparadas ao nível em controles. Nenhuma outra modificação Cys foi observada em um nível significativo para qualquer uma das amostras. Os mapas de Lys-C/trípticos reduzidos de seis pares de construtos tratados com 4-vinilpiridina, de controle não reduzidos e de 70 h também foram examinados para avaliar se há alguma diferença significativa no

nível de tiois livres nas amostras nativas. Análise revelou pequenas quantidades de tiois livres em todas as amostras, e nenhuma diferença significativa entre amostras de controle e 70 h. Os níveis de trissulfetos em amostras variam pelas diferenças em condições de cultura e, portanto, os níveis relatados não devem refletir atributos específicos de produto.

[334] A comparação sistemática das recuperações de peptídeo nos mapas de peptídeo reduzido das amostras de 70 h com aquelas nos mapas das amostras de controle correspondentes indicou que o recorte de N terminal anteriormente observado da cadeia pesada (consultar o Exemplo 3) foi significativamente reduzido/eliminado pela adição de uma ponte de dissulfeto na região de FC5 da cadeia pesada. Resultados dessa análise são mostrados nas **Figuras 38 e 39**. Recuperação de peptídeo das amostras de 70 h de construtos mutantes de FC5-H62 4667 (T33C = T103C) e 4668 (T33C = A104C), com ligações de dissulfeto entre C1 (o primeiro Cys) e C3 (o terceiro Cys) e entre C2 (o segundo Cys) e C4 (o quarto Cys), foi similar àquela para amostras de controle, enquanto a recuperação de peptídeo das amostras de 70 h de construtos mutantes de FC5-H62 4662 (S49C = I70C) e 4665 (T34C = V79C), com ligações de dissulfeto entre C1 e C4 e entre C2 e C3, foi cerca de 85% e 70% daquela do controle, respectivamente. Essas constatações indicam que a adição de um segundo dissulfeto no FC5 protege a porção de FC5 da proteína de fusão da degradação proteolítica em soro que foi vista na **Figura 23** com a proteína de FC5 de tipo selvagem.

[335] O primeiro aminoácido em H62 FC5 é um resíduo de ácido aspártico. Uma vez que anticorpos frequentemente começam com piroglutamato e essa modificação poderia fornecer proteção da atividade de amino peptidase, os inventores projetaram um construto (4809) que conteve a sequência de H62 FC5 de tipo selvagem, porém,

começou com glutamina (D1Q), o que resultaria na formação de um piroglutamato de N terminal. Curiosamente, quando essa amostra foi testada para estabilidade de soro (**Figura 38**) a mesma foi bastante desestabilizada mostrando apenas 30% de recuperação do peptídeo de N terminal em relação ao controle. Recuperação de peptídeo de cadeia leve de amostra de 70 h foi muito similar àquela da amostra de controle correspondente. A plotagem para a recuperação dos peptídeos de cadeia leve é mostrada na **Figura 39**.

[336] Com base nos melhoramentos na estabilidade de soro de H62-T33C/A104C (Nº de 4D4668), visto na **Figura 38**, o mesmo foi submetido à análise PK em ratos com medição de níveis de soro e CSF depois de uma administração i.v. de 10 mg/kg (~65 nmol/kg). Resultados dessa análise são mostrados na **Figura 40**. Níveis de soro e CSF para o produto estabilizado com dissulfeto foram maiores do que a versão não estabilizada em todos os pontos no tempo. O CSF/soro mostrado no painel inferior da **Figura 40** revelou que a modificação genética de dissulfeto evitou a perda em atividade de transporte ao longo do tempo, que foi observada com o construto de tipo selvagem. Níveis cerebrais também foram medidos em 24 horas por MRM, em que os valores de FC5, Li81 e hFc refletem as concentrações de peptídeos de assinatura a partir dos respectivos domínios (**Tabela 12**).

TABELA 12. ANÁLISE DE NÍVEIS CEREBRAIS DE AMOSTRAS DE FC5-LI81 EM 24 H

Anticorpo	Rato	Tempo (h)	Peptídeos de IgG cerebral (ng/g de tecido)			
			FC5	Li81	hFc	Médio
FC5-(G4S)1-Li81 hIgG1	DE7	24	351	401	414	389
FC5-(G4S)1-Li81 hIgG1	DE8	24	442	409	462	438
FC5-H62(T33C/A104C)-(G4S)1-Li81 hIgG1	DE9	24	508	657	615	594
FC5-H62(T33C/A104C)-(G4S)1-Li81 hIgG1	DE10	24	639	676	560	625

[337] Estabilização de dissulfeto resultou em um aumento de cerca de 30% em níveis cerebrais. Para testar se outras variantes estabilizadas com dissulfeto melhoraram a exposição ao SNC depois da administração sistemática os inventores testaram H62-S49C/I70C (Nº de 4D4662), H62-T34C/V79C (Nº de 4D4665), H62-T33C/A104C (Nº de 4D4668) em análise lado a lado. Resultados dessa análise são mostrados nas **Figuras 41** (análise de soro) e **42** (CSF e análise de tecido cerebral). Todas as três formas mostraram níveis de soro superiores ao Li81 e resultaram em níveis aumentados em SNC. Esses melhoramentos se traduziram em níveis de CSF e cerebrais superiores.

[338] Na análise dos inventores de projetos de framework diferentes no Exemplo 1, os mesmos observaram que tanto o construto 3438, no qual FC5 foi preso ao terminal N de Li81, quanto o construto 3440, no qual FC5 foi preso ao Fc com uma articulação longa e o Fab de Li81 foi preso no terminal C do Fc (**Tabela 1**, **Figura 11**), mostraram boa atividade de transporte. Como resultado dessa constatação, os inventores modificaram geneticamente uma versão estabilizada com dissulfeto do construto 3440 que contém o projeto de FC5 H62 T33C/A104C, além da versão estabilizada do construto 3438 descrito acima (**Figura 40**). A análise PK em ratos de ambas as amostras mostradas na **Figura 43** revelou que ambas resultaram em níveis de CSF melhorados, em que o FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-G_4S-Li81(VH,CH1) (formato 3440) mostra níveis superiores sobre a primeira administração IV após 72 horas e o FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 huIgG1 (formato 3438) mostra níveis de CSF mais modestos, porém, mais constantes durante a administração IV após 168 horas. Esquemas na esquerda do painel mostram os dois projetos de modificação genética.

[339] Investigação adicional de FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 (no formato de construto 3438) em macaco cinomolgo mostrou que a

exposição de CSF melhorada desse anticorpo biespecífico, em relação ao Li81 monoespecífico, não se traduz em primatas não humanos. Macacos foram implantados com cateteres intratecais lombares para coleta de CSF repetida e receberam 65 nmol/kg de artigos de teste de anticorpo por meio de injeção de bolo IV única, com 12 animais virgens por grupo. Níveis de anticorpo em amostra de soro e CSF foram quantificados por nanoLC-MRM depois da desnaturação térmica e digestão tríptica, monitorando-se dois peptídeos para Li81 e três peptídeos para FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 com relação aos padrões de proteína em matrizes correspondentes. Resultados para níveis de anticorpo de soro e CSF durante um período de três semanas depois da administração IV são mostrados na **Figura 44**. PK de soro foi similar para ambas as moléculas, embora uma queda em níveis de fármaco de soro de FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 em comparação com Li81 tenha sido observada em alguns animais >10 dias após a dosagem. Isso correspondeu à detecção de anticorpos antifármaco e uma redução em meia-vida média (**Tabela 13**). Níveis de CSF foram elevados para FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 em comparação com Li81 durante a primeira semana após administração IV. Razões de CSF/soro foram elevadas em ~3 vezes para FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81 sobre Li81, o que persiste do dia 4 ao 14 depois da administração IV. Análise de farmacocinética não compartimental foi realizada com o uso do software Pheonix 8.1 e parâmetros farmacocinéticos são relatados na **Tabela 13**.

TABELA 13. PARÂMETRO PK ESTIMA A PARTIR DA ANÁLISE NÃO COMPARTIMENTAL DE PERFIS DE CONCERTAÇÃO-TEMPO DE SORO E CSF DE FC5-Li81 E Li81 EM MACACOS CINOMOLGOS

Parâmetro	Unidade	Li81	FC5-H62(T33C/A104C)-G_4S-Li81
C_{max}	nM	1088 ± 125	1277 ± 167
$t_{1/2}$	h	269 ± 69	106 ± 14
AUC_{0-T}	nmol*h/ml	266 ± 17	223 ± 20
$AUC_{0-\infty}$	nmol*h/ml	358 ± 40	232 ± 23
CL	ml/h/kg	0,19 ± 0,02	0,30 ± 0,03
AUC_{0-T} de CSF/AUC_{0-T} de soro	%	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,02

C_{max}: concentração de pico observada em soro. $t_{1/2}$: meia-vida em soro. AUC_{0-T}: área sob a curva de tempo de concentração de soro a partir de 0 até a última concentração medida. $AUC_{0-\infty}$: área sob a curva de tempo de concentração de soro a partir de 0 até o infinito. *CL*: folga corporal total. Estimativas são relatadas como média ± sd.

[340] Para investigar se a forma humanizada e estabilizada com dissulfeto de FC5 (FC5-H62(T33C/A104C); também denominado hFC5.2) pode aumentar permeabilidade de célula endotelial cerebral de outros anticorpos contra alvos cerebrais, sem interferir na ligação a esses alvos, os inventores geraram fusões de hFC5.2 com anticorpos anti-beta amiloide (12F6A), anti-alfa sinucleína (12F4), e anti-tau (6C5) em diferentes formatos. Todos os construtos foram expressos em CHO e purificados por cromatografia de afinidade de Proteína A, conforme descrito para as fusões de FC5-Li81. Cromatografia de exclusão de tamanho foi usada para remover agregados e contaminantes somente de cadeia pesada ou cadeia leve livre em amostras de moléculas em que FC5 foi fundido com a cadeia leve.

[341] Para anticorpo 12F6A, FC5-H62(T33C/A104C) foi fundido ao terminal N da cadeia pesada por meio de um ligante G_4S (**SEQ ID Nº: 5**) para formar o construto de FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A.

[342] FC5-H62(T33C/A104C)-G4S-12F6A

[343] *Cadeia pesada pYL1446*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SGGGGSQVQL VESGGGVVQP GRSLRLSCAA SGFAFSSYGM HWVRQAPGKG LEWVAVIWFD GTKKYYTDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN TLRAEDTAVY YCARDRGIGA RRGPYYMDVW GKGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (SEQ ID Nº:34)

[344] *Cadeia leve pJD010*

MDMRVPAQLL GLLLWFPGSR CDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASQSI SSYLNWYQQK PGKAPKLLIY AASSLQSGVP SRFSGSGSGT DFTLTISSLQ PEDFATYYCQ QSYSTPLTFG GGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID Nº:35)

[345] Essa fusão mostrou ligação muito similar ao beta amiloide em um ensaio de ligação de ELISA como o anticorpo 12F6A (Figura

45A). Um construto com o Fab de 12F6A fundido ao terminal C de hIgG1 Fc mostrou perda significativa em ligação ao beta amiloide, assim fusões de FC5-H62(T33C/A104C) não foram buscadas nesse formato. FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A também mostrou penetração aumentada através de células endoteliais cerebrais de rato no ensaio de transpoço de SVARBEC (Figura 45B), com valores de P_{APP} 4-8 vezes superiores a um anticorpo de controle (IgG1 murina anti-HEL; Goldbaum et al., *J Immunol*., 162:6040-6045 (1999); Genbank AF110316 VH e AY277254.1 VL). No entanto, 12F6A sozinho também mostrou P_{APP} ~2 vezes superior ao controle, de modo que o P_{APP} para FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A fosse ~3 vezes superior ao 12F6A sozinho. Transcitose nas células endoteliais de cérebro humano também foi demonstrada em um modelo de BBB de transpoço derivado de célula tronco pluripotente humana (hu-iPSC) (Ribecco-Lutkiewicz et al. *Sci Rep*., 8(1):1873 (2018); Figura 45C), no qual valores de P_{APP} significativamente maiores foram observados para FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A (>10 vezes sobre o anticorpo de controle; ~5 vezes sobre o 12F6A sozinho).

[346] Para anticorpo 12F4, fusão de FC5-H62(T33C/A104C) foi feita no terminal N da cadeia leve com o uso de um ligante G_4S único (SEQ ID Nº:5) para criar FC5-H62(T33C/A104C)-12F4(LC), conforme a modificação do terminal N da cadeia pesada foi anteriormente determinada para reduzir levemente ligação à alfa-sinucleína.

[347] *Cadeia leve pYL1593*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SGGGGSSYEL TQPPSVSVSP GQTARITCSG EALPMQFAHW YQQRPGKAPV IVVYKDSERP SGVPERFSGS SSGTTATLTI TGVQAEDEAD YYCQSPDSTN

TYEVFGGGTK LTVLSQPKAA PSVTLFPPSS EELQANKATL VCLISDFYPG AVTVAWKADS SPVKAGVETT TPSKQSNNKY AASSYLSLTP EQWKSHRSYS CQVTHEGSTV EKTVAPTECS (SEQ ID Nº:36)

[348] Para investigar se a transcitose com base em FC5 é afetada pelas diferenças na região de Fc, que modula a ligação aos receptores de Fc, FC5-H62(T33C/A104C)-12F4(LC) foi coexpresso com cadeias pesadas 12F4 com subclasse de hIgG1 de tipo selvagem, assim como três arcabouços com função efetora reduzida: hIgG1 agly (N297Q), hIgG2 SAA (*consultar,* Vafa et al. *Methods*. 65(1):114-26 (2014), e hIgG4P/G1 agly (*consultar,* documento Nº U.S. 2012/0100140 A1).

[349] 12F4 hIgG1 (HC)

EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFDFEKAWMSWVRQAPGQGL QWVARIKSTADGGTTSYAAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTED TAVYYCTSAHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID Nº:29)

[350] 12F4 hIgG1 agly

EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFDFEKAWMSWVRQAPGQGL QWVARIKSTADGGTTSYAAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTED TAVYYCTSAHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID Nº:30)

[351] 12F4 hIgG2 SAA

EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFDFEKAWMSWVRQAPGQGL
QWVARIKSTADGGTTSYAAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTED
TAVYYCTSAHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPAAAPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID Nº:31)

[352] 12F4 hIgG4P/G1

EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFDFEKAWMSWVRQAPGQGL
QWVARIKSTADGGTTSYAAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTED
TAVYYCTSAHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID Nº:32)

[353] Além disso, um construto com FC5-H62(T33C/A104C) fundido ao hIgG1 Fc de articulação longa e o Fab de 12F4 através da ligação de G_4S do terminal C de Fc à cadeia leve 12F4 (FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-12F4 Fab(LC) foi gerado.

[354] *FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-12F4 Fab(LC), pYL1607*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGGGGGSSY ELTQPPSVSV SPGQTARITC SGEALPMQFA HWYQQRPGKA PVIVVYKDSE RPSGVPERFS GSSSGTTATL TITGVQAEDE ADYYCQSPDS TNTYEVFGGG TKLTVLSQPK AAPSVTLFPP SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE TTTPSKQSNN KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS (SEQ ID Nº:37)

[355] *12F4(VH-CH1) pYL1595*

MDMRVPAQLL GLLLLWFPGS RCEVQLVESG GGLVEPGGSL RLSCAVSGFD FEKAWMSWVR QAPGQGLQWV ARIKSTADGG TTSYAAPVEG RFIISRDDSR NMLYLQMNSL KTEDTAVYYC TSAHWGQGTL VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSC (SEQ ID Nº:38)

[356] Análise dessas moléculas por ELISA de ligação direta de alfa-sinucleína mostrou que o domínio de FC5-H62(T33C/A104C) fundido diretamente à cadeia leve 12F4 não prejudica a ligação à alfa-sinucleína, em comparação com a ligação de 12F4 hIgG1 (Figura 46A). Por outro lado, a molécula de FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-12F4 Fab(LC) mostrou ligação gravemente prejudicada à alfa-sinucleína. A série de variantes de função efetora de moléculas de FC5-H62(T33C/A104C)-

12F4(LC) hIgG foram testadas adicionalmente para transcitose funcional no ensaio de transpoço de célula endotelial cerebral de rato (SVARBEC) (Figura 46B). Todas as moléculas, independentemente do framework de Fc, mostraram transporte melhorado, com valores de P_{APP} que foram 4 a 9 vezes superiores a um anticorpo de controle de mIgG1 anti-HEL incluído em cada transpoço, enquanto 12F4 sem FC5 preso não mostrou diferença significativa em permeabilidade transcelular do controle.

[357] Para identificar um anticorpo de ligação anti-tau bifuncional com penetração em BBB intensificada, FC5-H62(T33C/A104C)-6C5 hIgG1 foi gerado como ambas as moléculas de fusão de cadeia pesada e cadeia leve.

[358] FC5-H62(T33C/A104C)-G4S-6C5 hIgG1 (HC)

[359] *Cadeia Pesada pYL1611*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SGGGGSQVQL VESGGGVVQP GRSLRVSCAA SGFTFSSYDM HWVRQAPGKG LEWVAVIWFD GSNEFYADSV KGRFTISRDN SKNTLFLQMN SLRAEDTAVY YCARDLGASV TTSNAENFHH WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

[360] (SEQ ID Nº:39)

[361] *Cadeia leve pEAG2942*

MDMRVPAQLL GLLLLWFPGS RCSYELTQPP SVSVSPGQTA RITCSGDALP KRYVYWYQQK SGQAPVLVIY EDSKRPSGIP ETFSGSSSGT MATLTISGAQ VEDEADYYCY STDSNGHHWV FGGGTKLTVL GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID Nº:40)

[362] FC5-H62(T33C/A104C)-G4S-6C5 (LC)

[363] *Cadeia leve pYL1613*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SGGGGSSYEL TQPPSVSVSP GQTARITCSG DALPKRYVYW YQQKSGQAPV LVIYEDSKRP SGIPETFSGS SSGTMATLTI SGAQVEDEAD YYCYSTDSNG HHWVFGGGTK LTVLGQPKAA PSVTLFPPSS EELQANKATL VCLISDFYPG AVTVAWKADS SPVKAGVETT TPSKQSNNKY AASSYLSLTP EQWKSHRSYS CQVTHEGSTV EKTVAPTECS (SEQ ID Nº:41)

[364] *Cadeia pesada, pEAG2974*

MDMRVPAQLL GLLLLWFPGS RCQVQLVESG GGVVQPGRSL RVSCAASGFT FSSYDMHWVR QAPGKGLEWV AVIWFDGSNE FYADSVKGRF TISRDNSKNT LFLQMNSLRA EDTAVYYCAR DLGASVTTSN AENFHHWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK

PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID Nº:42)

[365] Além disso, o formato alternativo FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-6C5 Fab foi gerado como moléculas de fusão de cadeia pesada e cadeia leve.

[366] FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-6C5 Fab(HC)

[367] *Cadeia pesada, pYL1612*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGGGGGSQV QLVESGGGVV QPGRSLRVSC AASGFTFSSY DMHWVRQAPG KGLEWVAVIW FDGSNEFYAD SVKGRFTISR DNSKNTLFLQ MNSLRAEDTA VYYCARDLGA SVTTSNAENF HHWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR

[368] VEPKSC (SEQ ID Nº:43)

[369] *Cadeia leve pEAG2942*

MDMRVPAQLL GLLLLWFPGS RCSYELTQPP SVSVSPGQTA RITCSGDALP KRYVYWYQQK SGQAPVLVIY EDSKRPSGIP ETFSGSSSGT MATLTISGAQ VEDEADYYCY STDSNGHHWV

FGGGTKLTVL GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID Nº:44)

[370] FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-6C5 Fab(LC)

[371] *pYL1614*

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFKITH YCTGWFRQAP GKEREFVSRI TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCAAGST STCTPLRVDY WGQGTLVTVS SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGGGGGSSY ELTQPPSVSV SPGQTARITC SGDALPKRYV YWYQQKSGQA PVLVIYEDSK RPSGIPETFS GSSSGTMATL TISGAQVEDE ADYYCYSTDS NGHHWVFGGG TKLTVLGQPK AAPSVTLFPP SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE TTTPSKQSNN KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS

[372] (SEQ ID Nº:45)

[373] *pYL1596*

MDMRVPAQLL GLLLLWFPGS RCQVQLVESG GGVVQPGRSL RVSCAASGFT FSSYDMHWVR QAPGKGLEWV AVIWFDGSNE FYADSVKGRF TISRDNSKNT LFLQMNSLRA EDTAVYYCAR DLGASVTTSN AENFHHWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC

[374] (SEQ ID Nº:46)

[375] FC5-H62(T33C/A104C)-6C5 hIgG1 mostrou ligação similar ao tau como 6C5 hIgG1 (Figura 47A), enquanto moléculas de FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-6C5 Fab mostraram ligação significativamente reduzida ao tau. Moléculas de FC5-H62(T33C/A104C)-6C5(HC) hIgG1 e FC5-H62(T33C/A104C)-6C5(LC) hIgG1 foram adicionalmente testadas para transcitose no ensaio de transpoço de SVARBEC (Figura 47B), e mostraram P_{APP} de 4 a 8 vezes superior ao anticorpo de controle. 6C5 hIgG1 mostrou P_{APP} levemente superior ao controle (1,7 vezes sobre mIgG1 anti-HEL).

[376] Para validar que o FC5 modificado geneticamente com dissulfeto, fundido aos anticorpos 12F4 e 12F6A, tem estabilidade molecular melhorada sobre variantes não modificadas geneticamente com dissulfeto, como foi mostrado para FC5-H62(T33C/A104C)-Li81 modificado geneticamente com dissulfeto (Figura 35), a digestão de pepsina foi realizada. FC5-H62(T33C/A104C)-Li81 hIgG1 agly foi usado como um exemplo de uma molécula com boa estabilidade contra a digestão de pepsina, FC5-H32-Li81 hIgG1 agly foi usado como um exemplo de uma molécula com fraca estabilidade e digestões de pepsina dos mesmos foram comparados com digestões de FC5-H62(T33C/A104C)-12F4 modificado geneticamente com dissulfeto (em ambos os arcabouços de tipo selvagem e hIgG1 aglicosilado), FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A hIgG1 e FC5-H32-12F6A hIgG1 não estabilizado (Figura 48). Todas as digestões de proteína foram realizadas em 20 mM de acetato de sódio, pH 3,6 a 1 mg/ml e 0,033 mg/ml de pepsina, incubadas a 37°C por uma hora ou 2,5 h. Todas as moléculas com o dissulfeto adicional (fusões de FC5-H62(T33C/A104C)) mostraram intensidade superior das bandas de peso molecular superior por análise SDS-PAGE que depois da digestão em comparação com as moléculas que não foram modificadas

geneticamente com dissulfeto (fusões de FC5-H32). Uma redução nas bandas de peso molecular inferior, destacadas pelas setas na Figura 48, foi observada para as fusões de FC5-H32, é um controle positivo para sensitividade de protease sem estabilização de dissulfeto.

OUTRAS MODALIDADES

[377] Embora a invenção tenha sido descrita em combinação com a descrição detalhada da mesma, a descrição supracitada pretende ilustrar e não limitar o escopo da invenção, que é definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Domínio variável de anticorpo que transmigra através da barreira hematoencefálica, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% idêntica à SEQ ID Nº:1, sendo que a sequência de aminoácidos compreende a região de determinação de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR2 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50, e em que:

(i) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47, CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51 e a sequência de aminoácidos compreende cisteínas nas posições que correspondem às posições 49 e 70 da SEQ ID Nº:1;

(ii) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:48, CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51 e a sequência de aminoácidos compreende cisteína na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1;

(iii) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:52;

(iv) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:52;

(v) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:53;

(vi) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:53;

(vii) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:54;

(viii) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:54;

(ix) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:49 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:55; ou

(x) CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:58 e CDR3 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:55.

2. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 1, 5, 6, 14, 37, 44, 45, 47, 75, 87, 88, 93, 114 ou 117 da SEQ ID Nº:1.

3. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende um ou mais dentre:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1;

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1;

prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1;

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1;

serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1;

arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1;

alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1;

glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou

leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

4. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 ou 117 da SEQ ID Nº:1.

5. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende um ou mais dentre:

valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1;

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1;

prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1;

serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1;

arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1;

alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1;

glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou

leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

6. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 44 e 45 da SEQ ID Nº:1.

7. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1.

8. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 44 e 45 da SEQ ID Nº:1.

9. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a

reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1.

10. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

11. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

12. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

13. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

14. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

15. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

16. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

17. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a

reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

18. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1.

19. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1;

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

20. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, nas posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1.

21. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1;

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

22. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID Nº: 20 a 28.

23. Domínio variável de anticorpo que transmigra através da barreira hematoencefálica, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% idêntica à sequência apresentada na SEQ ID Nº:1, sendo que a sequência de aminoácidos compreende:

(i) substituições de aminoácido, em comparação com a

SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1; e

(ii) região de determinação de complementaridade (CDR)1 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47 ou 57, CDR2 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:50 e CDR3 que compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:51.

24. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em pelo menos quatro das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1.

25. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em pelo menos cinco das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1.

26. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em pelo menos seis das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1.

27. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácido, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em cada uma das posições que correspondem às posições 5, 6, 14, 75, 87, 88, 93, 114 e 117 da SEQ ID Nº:1.

28. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:47.

29. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a CDR1 compreende a sequência apresentada na SEQ ID Nº:57.

30. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende um ou mais dentre:

valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1;

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1;

prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1;

serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1;

arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1;

alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1;

glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; ou

leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

31. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

valina na posição que corresponde à posição 5 da SEQ ID Nº:1;

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 6 da SEQ ID Nº:1;

prolina na posição que corresponde à posição 14 da SEQ ID Nº:1;

serina na posição que corresponde à posição 75 da SEQ ID Nº:1;

arginina na posição que corresponde à posição 87 da SEQ ID Nº:1;

alanina na posição que corresponde à posição 88 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 93 da SEQ ID Nº:1;

glutamina na posição que corresponde à posição 114 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 117 da SEQ ID Nº:1.

32. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende substituições, em comparação com a SEQ ID Nº:1, em uma ou mais dentre as posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45, 47 ou 79 da SEQ ID Nº:1.

33. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende um ou mais dentre:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1;

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; ou

leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

34. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 44 e 45 da SEQ ID Nº:1.

35. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1.

36. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 1, 44 e 45 da SEQ ID Nº:1.

37. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1.

38. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

39. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

40. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 1, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

41. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

42. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

43. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

44. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 1, 37, 44, 45 e 47 da SEQ ID Nº:1.

45. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

ácido glutâmico na posição que corresponde à posição 1 da SEQ ID Nº:1;

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1; e

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1.

46. Domínio variável de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende, em comparação com a SEQ ID Nº:1, substituições nas posições que correspondem às posições 37, 44, 45, 47 e 79 da SEQ ID Nº:1.

47. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende:

valina na posição que corresponde à posição 37 da SEQ ID Nº:1;

glicina na posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID Nº:1;

leucina na posição que corresponde à posição 45 da SEQ ID Nº:1;

triptofano na posição que corresponde à posição 47 da SEQ ID Nº:1; e

leucina na posição que corresponde à posição 79 da SEQ ID Nº:1.

48. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID Nº: 10 a 17.

49. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº:20.

50. Domínio variável de anticorpo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos é a sequência apresentada na SEQ ID Nº:26.

51. Molécula quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50.

52. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que compreende uma região Fc de anticorpo.

53. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 51 ou 52, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo, um peptídeo, uma enzima, um oligonucleotídeo, um fármaco de molécula pequena ou um lipossoma ou uma nanopartícula lipídica, que encapsula um ácido nucleico, fármaco de molécula pequena ou peptídeo.

54. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que o domínio variável de anticorpo é ligado:

(i) diretamente, ou

(ii) por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente,

ao terminal N de uma região de articulação de um anticorpo, e em que a região de articulação é fundida a uma porção química de Fc.

55. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que a região de articulação compreende a sequência AEPKSCD (SEQ ID Nº:56), AEPKSSD (SEQ ID Nº:59) ou KTHTCPPCP (SEQ ID Nº:19).

56. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma dentre:

uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo; uma região variável de cadeia leve de um anticorpo;

uma enzima;

um peptídeo ou um ligante que compreende a sequência de aminoácidos 3X(G4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

57. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que a porção química de Fc é selecionada dentre o grupo que consiste em hIgG1 Fc, hIgG2 Fc, hIgG3 Fc, hIgG4 Fc, hIgG1agly Fc, hIgG2 SAA Fc, hIgG4(S228P)/G1 agly Fc, hIgG4(S228P) Fc e hIgG4(S228P) agly Fc.

58. Molécula quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 57, caracterizada pelo fato de que a porção química de Fc é ligada diretamente ou por meio de uma segunda sequência de aminoácidos interveniente a um polipeptídeo que compreende

um segundo domínio variável de anticorpo;

um Fab;

um scFv;

um anticorpo de domínio único;

um peptídeo;

uma enzima;

um ácido nucleico ou um oligonucleotídeo.

59. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que a região de articulação é ligada a um ácido nucleico.

60. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o ácido nucleico é um oligonucleotídeo antissenso.

61. Molécula quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, em que o domínio variável de anticorpo é ligado:

(i) diretamente, ou

(ii) por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente, a um lipossoma ou nanopartícula lipídica.

62. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 61, caracterizada pelo fato de que o lipossoma ou nanopartícula lipídica encapsula uma molécula pequena ou um ácido nucleico.

63. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 61, caracterizada pelo fato de que o lipossoma ou nanopartícula lipídica encapsula um ácido nucleico que é um oligonucleotídeo antissenso.

64. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que o oligonucleotídeo antissenso é um gapmer ou um oligonucleotídeo antissenso de comutação de splice.

65. Molécula quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, em que o domínio variável de anticorpo é ligado:

(i) diretamente, ou

(ii) por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente, a um anticorpo inteiro.

66. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 51 ou 52, caracterizada pelo fato de que compreende ainda albumina de soro humano (HSA).

67. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) uma proteína quimérica que compreende

(i) o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, e

(ii) uma primeira proteína que compreende uma primeira região de articulação de um anticorpo e uma primeira porção química de Fc, em que o terminal C da primeira região de articulação é ligado ao terminal N da primeira porção química de Fc, e em que o

terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da primeira região de articulação;

(2) uma segunda proteína que compreende uma segunda região de articulação de um anticorpo e uma segunda porção química de Fc, em que o terminal C da segunda região de articulação é ligado ao terminal N da segunda porção química de Fc, sendo que a segunda proteína emparelha com a primeira proteína; e

(3) um agente terapêutico.

68. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) uma primeira proteína quimérica que compreende

(i) um primeiro domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, e

(ii) uma primeira proteína que compreende uma primeira região de articulação de um anticorpo e uma primeira porção química de Fc, em que o terminal C da primeira região de articulação é ligado ao terminal N da primeira porção química de Fc, e em que o C terminal do primeiro domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da primeira região de articulação;

(2) uma segunda proteína quimérica que compreende

(i) um segundo domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50; e

(ii) uma segunda proteína que compreende uma segunda região de articulação de um anticorpo e uma segunda porção química de Fc, em que o terminal C da segunda região de articulação é ligado ao terminal N da segunda porção química de Fc, em que o C terminal do segundo domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos

interveniente ao terminal N da segunda região de articulação, e em que a segunda proteína emparelha com a primeira proteína; e

(3) um agente terapêutico.

69. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) uma primeira proteína quimérica que compreende

(i) um primeiro domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, e

(ii) uma primeira proteína que compreende uma primeira região de articulação de um anticorpo e uma primeira porção química de Fc, em que o terminal C da primeira região de articulação é ligado ao terminal N da primeira porção química de Fc, e em que o C terminal do primeiro domínio variável de anticorpo é fundido por meio de uma primeira sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da primeira região de articulação; e

(2) uma segunda proteína quimérica que compreende

(i) um segundo domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50; e

(ii) uma segunda proteína que compreende uma segunda região de articulação de um anticorpo e uma segunda porção química de Fc, sendo que o terminal C da segunda região de articulação é ligado ao terminal N da segunda porção química de Fc, em que o C terminal do segundo domínio variável de anticorpo é fundido por meio de uma segunda sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da segunda região de articulação, e em que a segunda proteína emparelha com a primeira proteína;

em que a primeira e a segunda sequências de aminoácidos intervenientes são Fabs que atuam como agentes terapêuticos.

70. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a região de

articulação compreende a sequência AEPKSCD (SEQ ID Nº:56) ou AEPKSSD (SEQ ID Nº:59).

71. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a região de articulação compreende a sequência KTHTCPPCP (SEQ ID Nº:19).

72. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a primeira e a segunda porções químicas de Fc têm uma sequência de aminoácidos idêntica.

73. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a primeira e a segunda porções químicas de Fc têm diferentes sequências de aminoácidos.

74. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a primeira e a segunda porções químicas de Fc são aglicosiladas.

75. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a primeira e a segunda porções químicas de Fc são selecionadas dentre o grupo que consiste em hIgG1 Fc, hIgG2 Fc, hIgG3 Fc, hIgG4 Fc, hIgG1agly Fc, h IgG2 SAA Fc, hIgG4(S228P) Fc, hIgG4(S228P)/G1 agly Fc e hIgG4(S228P) agly Fc.

76. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizada pelo fato de que a primeira e a segunda regiões de articulação têm uma sequência de aminoácidos idêntica.

77. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 76, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é uma molécula de ligação que compreende um domínio variável de anticorpo.

78. Composição, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação é um Fab e o terminal N do domínio de VH ou VL do Fab é ligado ao terminal C da primeira porção química de Fc.

79. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 76, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é um oligonucleotídeo antissenso.

80. Composição, de acordo com a reivindicação 79, caracterizada pelo fato de que o oligonucleotídeo antissenso é ligado à primeira e/ou à segunda região de articulação.

81. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 76, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é um fármaco de molécula pequena ou um ácido nucleico encapsulado em um lipossoma ou nanopartícula lipídica.

82. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) uma proteína quimérica que compreende

(i) o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, e

(ii) uma cadeia leve de um anticorpo, em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia leve do anticorpo; e

(2) uma cadeia pesada do anticorpo que emparelha com a cadeia leve do anticorpo.

83. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) uma proteína quimérica que compreende

(i) o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50; e

(ii) uma cadeia pesada de um anticorpo, em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia pesada do anticorpo; e

(2) uma cadeia leve do anticorpo que emparelha com a cadeia pesada do anticorpo.

84. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) uma primeira proteína quimérica que compreende

(i) um primeiro domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, e

(ii) uma cadeia leve de um anticorpo, em que o terminal C do primeiro domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia leve do anticorpo; e

(2) uma segunda proteína quimérica que compreende

(i) um segundo domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, e

(ii) uma cadeia pesada do anticorpo, em que o terminal C do segundo domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da cadeia pesada do anticorpo.

85. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 84, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é 3X(G_4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

86. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína quimérica que compreende

(i) o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50,

(ii) uma proteína que compreende uma região de articulação de um anticorpo e uma porção química de Fc, em que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente ao terminal N da região de articulação da proteína, e (iii) um agente terapêutico.

87. Composição, de acordo com a reivindicação 86, caracterizada pelo fato de que compreende um dímero da proteína quimérica.

88. Composição, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, caracterizada pelo fato de que a região de articulação compreende a sequência AEPKSCD (SEQ ID Nº:56) ou AEPKSSD (SEQ ID Nº:59).

89. Composição, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, caracterizada pelo fato de que a região de articulação compreende a sequência KTHTCPPCP (SEQ ID Nº:19).

90. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, caracterizada pelo fato de que a porção química de Fc é aglicosilada.

91. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, caracterizada pelo fato de que a porção química de Fc é selecionada dentre o grupo que consiste em hIgG1 Fc, hIgG2 Fc, hIgG3 Fc, hIgG4 Fc, hIgG1agly Fc, hIgG2 SAA Fc, hIgG4(S228P)/G1 agly Fc, hIgG4(S228P) Fc e hIgG4(S228P) agly Fc.

92. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 91, caracterizada pelo fato de que o terminal C do domínio variável de anticorpo é fundido diretamente ao terminal N da região de articulação da proteína.

93. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 92, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é uma molécula de ligação que compreende um segundo domínio variável de anticorpo.

94. Composição, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação é um Fab e o terminal N do domínio de VH ou VL do Fab é ligado ao terminal C da porção química de Fc.

95. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 92, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é um oligonucleotídeo antissenso.

96. Composição, de acordo com a reivindicação 95, caracterizada pelo fato de que o oligonucleotídeo antissenso é um oligonucleotídeo de comutação de splice ou um gapmer.

97. Composição, de acordo com a reivindicação 95 ou 96, caracterizada pelo fato de que o oligonucleotídeo antissenso é ligado à região de articulação.

98. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 92, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é uma molécula pequena ou ácido nucleico encapsulado em um lipossoma ou nanopartícula lipídica.

99. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, a molécula quimérica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 51 a 66, ou a composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 67 a 98, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

100. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50.

101. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 100.

102. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido na reivindicação 101.

103. Método para produzir um domínio variável de anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar a célula hospedeira, conforme definida na reivindicação 102, em um meio de cultura celular sob condições que resultam na expressão do domínio variável de anticorpo; e

isolar o domínio variável de anticorpo do meio de cultura celular.

104. Método para tratar doença de Alzheimer em um indivíduo humano que necessita do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente beta-amiloide humano.

105. Método, de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante de 3X(G_4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

106. Método, de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc.

107. Método, de acordo com a reivindicação 104 ou 105, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab.

108. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 104 a 107, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 12F6A.

109. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 104 a 107, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 12F6A.

110. Método para tratar uma sinucleinopatia em um indivíduo humano que necessita do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente alfa-sinucleína humana.

111. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante de 3X(G_4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

112. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc.

113. Método, de acordo com a reivindicação 110 ou 111, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab.

114. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 110 a 113, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 12F4 ou 21D11.

115. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 110 a 113, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 12F4 ou 21D11.

116. Método para tratar uma tauopatia em um indivíduo humano que necessita do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, ligado

diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente tau humana.

117. Método, de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante de 3X(G_4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

118. Método, de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc.

119. Método, de acordo com a reivindicação 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab.

120. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 119, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 6C5, 40E8 ou BMS-986168.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 119, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 6C5, 40E8 ou BMS-986168.

122. Método para tratar demência frontotemporal em um indivíduo humano que necessita do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente TDP-43 humana.

123. Método, de acordo com a reivindicação 122,

caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante de 3X(G_4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

124. Método, de acordo com a reivindicação 122, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc.

125. Método, de acordo com a reivindicação 122 ou 123, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab.

126. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 125, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de 41D1, 14W3 ou 51C1.

127. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 125, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de 41D1, 14W3 ou 51C1.

128. Método para tratar esclerose múltipla em um indivíduo humano que necessita do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente LINGO-1 humana.

129. Método, de acordo com a reivindicação 128, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é um ligante de 3X(G_4S) (SEQ ID Nº:60), G_4S (SEQ ID Nº:5), GG ou G.

130. Método, de acordo com a reivindicação 128,

caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente é uma região de articulação de um anticorpo fundido a uma porção química de Fc.

131. Método, de acordo com a reivindicação 128 ou 129, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab.

132. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 128 a 131, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende as seis CDRs de Li81 ou Li113.

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 128 a 131, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende a VH e VL de Li81 ou Li113.

134. Método para tratar atrofia muscular espinhal em um indivíduo humano que necessita do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, ligado diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente à nusinersena.

135. Método, de acordo com a reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que nusinersena é encapsulada em um lipossoma ou nanopartícula lipídica.

136. Método, de acordo com a reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos interveniente compreende uma região de articulação fundida a uma porção química de Fc e a nusinersena é ligada à região de articulação ou locais de ligação de não articulação.

137. Método para avaliar a labilidade de um domínio variável de anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um domínio variável de anticorpo;

adicionar o domínio variável de anticorpo a uma amostra de soro para criar uma mistura;

incubar a mistura;

purificar o domínio variável de anticorpo; e

realizar mapeamento de peptídeo.

138. Método, de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a amostra de soro é soro de rato.

139. Método, de acordo com a reivindicação 137 ou 138, caracterizado pelo fato de que o domínio variável de anticorpo está no soro em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 137 a 139, caracterizado pelo fato de que a mistura é incubada a cerca de 37 ˚C por cerca de 70 horas

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que o domínio variável de anticorpo compreende uma variante de FC5.

142. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que o domínio variável de anticorpo compreende uma forma estabilizada de FC5.

143. Método para examinar uma forma estabilizada de FC5, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um domínio variável de anticorpo que compreende uma variante de FC5 que se difere da SEQ ID Nº:1 em um ou mais aminoácidos;

adicionar o domínio variável de anticorpo a uma amostra de soro para criar uma mistura;

incubar a mistura;

purificar o domínio variável de anticorpo;

realizar mapeamento de peptídeo; e

selecionar um domínio variável de anticorpo que exibe recuperação de peptídeo aumentada.

144. Método, de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que a variante de FC5 se difere da SEQ ID Nº:1 em um a 10 aminoácidos.

145. Método, de acordo com a reivindicação 143 ou 144, caracterizado pelo fato de que a amostra de soro é soro de rato.

146. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 143 a 145, caracterizado pelo fato de que o domínio variável de anticorpo está no soro em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml.

147. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 143 a 146, caracterizado pelo fato de que a mistura é incubada a cerca de 37 ˚C por cerca de 70 horas

148. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica a molécula quimérica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 51 a 66.

149. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 148.

150. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido na reivindicação 149.

151. Método para produzir uma molécula quimérica, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar a célula hospedeira, conforme definida na reivindicação 150, em um meio de cultura celular sob condições que resultam na expressão da molécula quimérica; e

isolar a molécula quimérica do meio de cultura celular.

152. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica a composição, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 98.

153. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 152.

154. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido na reivindicação 153.

155. Método para produzir uma composição, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar a célula hospedeira, conforme definida na reivindicação 154, em um meio de cultura celular sob condições que resultam na expressão da composição; e

isolar a composição do meio de cultura celular.

156. Molécula quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende o domínio variável de anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 50, em que o domínio variável de anticorpo é ligado:

(i) diretamente, ou

(ii) por meio de uma sequência de aminoácidos interveniente,

a um capsídeo viral que contém um vetor terapêutico.

157. Molécula quimérica, de acordo com a reivindicação 156, caracterizada pelo fato de que o capsídeo viral é AAV.

Petição 870210048205, de 27/05/2021, pág. 192/249

Nº de Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Aminoácido	D	V	Q	L	Q	A	S	G	G	G	L	V	Q	A	G	G	S	L	R	L

Nº de Posição	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Aminoácido	S	C	**A**	**A**	**S**	**G**	**F**	**K**	**I**	**T**	**H**	**Y**	**T**	**M**	**G**	W	F	R	Q	A

Position No.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Amino Acid	P	G	K	E	R	E	F	V	S	**R**	**I**	**T**	**W**	**G**	**G**	**D**	**N**	**T**	**F**	**Y**

Nº de Posição	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Aminoácido	**S**	**N**	**S**	**V**	**K**	**G**	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	V	Y

Nº de Posição	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Aminoácido	L	Q	M	N	S	L	K	P	E	D	T	A	D	Y	Y	C	**A**	**A**	**G**	**S**

Nº de Posição	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Aminoácido	**T**	**S**	**T**	**A**	**T**	**P**	**L**	**R**	**V**	**D**	**Y**	W	G	K	G	T	Q	V	T	V

Nº de Posição	121	122	
Aminoácido	S	S	**(SEQ ID NO: 1)**

FIG. 1

Sequências

Cadeia Leve de Li81 (pCN406)

MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCDIQMTQSP ATLSLSPGER ATLSCRASQS VSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI
YDASNRATGI PARFSGSGSG TDFTLTISSL EPEDFAVYYC QQRSNWPMYT FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI
FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE
KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

Cadeia Pesada de FC5-3x(G4S)-HC Li81 (pY892)

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLQASGGGL VQAGGSLRLS CAASGFKITH YTMGWFRQAP GKEREFVSRI
TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMNSLKPEDT ADYYCAAGST STATPLRVDY WGKGTQVTVS
SGGGGSGGGG SGGGGSEVQL LESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSAYEM KWVRQAPGKG LEWVSVIGPS
GGFTFYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCATEGDNDA FDIWGQGTTV TVSSASTKGP
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG

Cadeia Leve de FC5-3x(G4S)-LC Li81 (pYL894)

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLQASGGGL VQAGGSLRLS CAASGFKITH YTMGWFRQAP GKEREFVSRI
TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMNSLKPEDT ADYYCAAGST STATPLRVDY WGKGTQVTVS
SGGGGSGGGG SGGGGSDIQM TQSPATLSLS PGERATLSCR ASQSVSSYLA WYQQKPGQAP RLLIYDASNR
ATGIPARFSG SGSGTDFTLT ISSLEPEDFA VYYCQQRSNW PMYTFGQGTK LEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA
CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C

FIG. 2

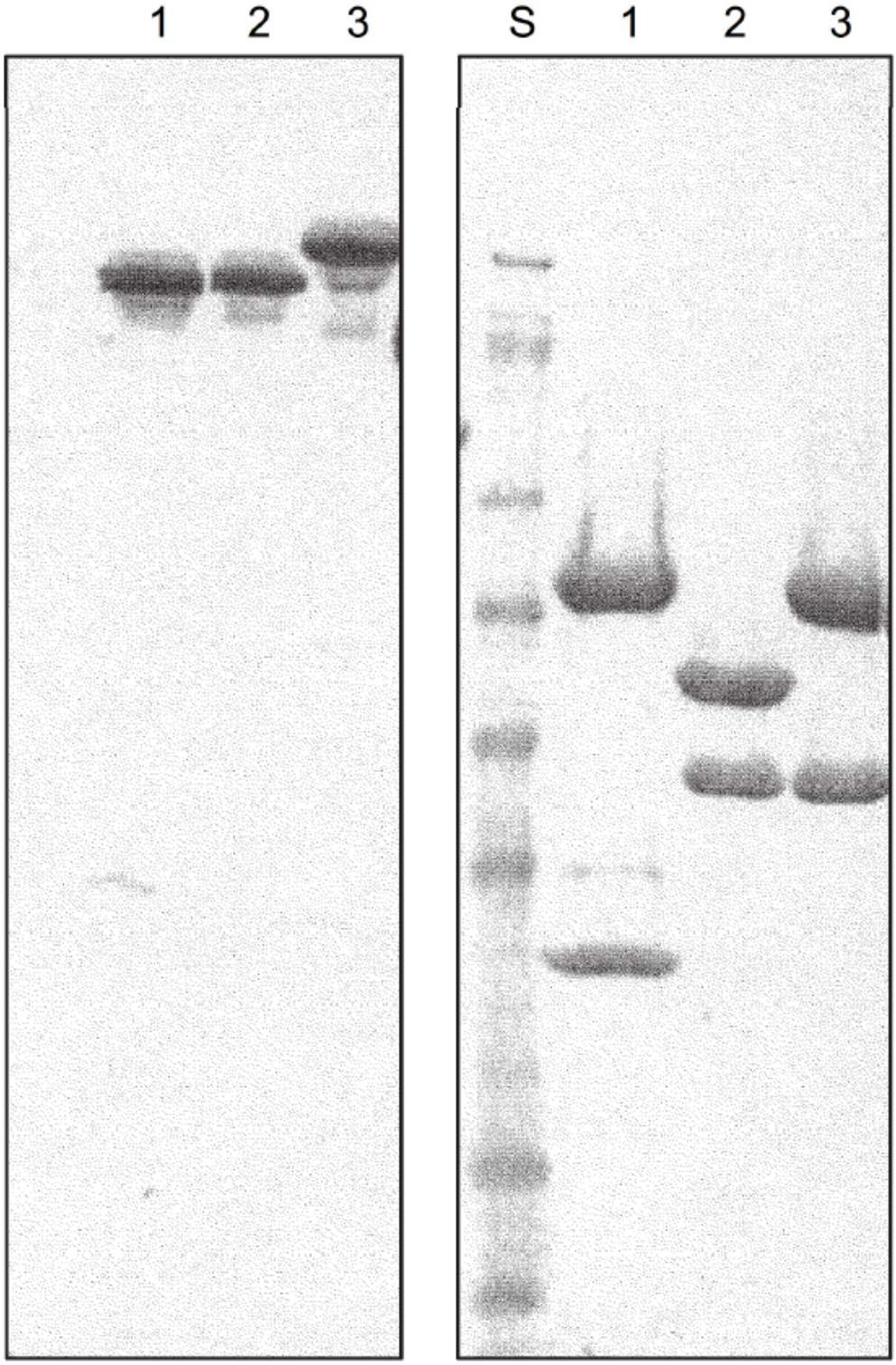


FIG. 3

Espectros de massa desconvolutos da cadeia leve (4A) e cadeia pesada (4B) de Li81 FC5-H + L reduzido

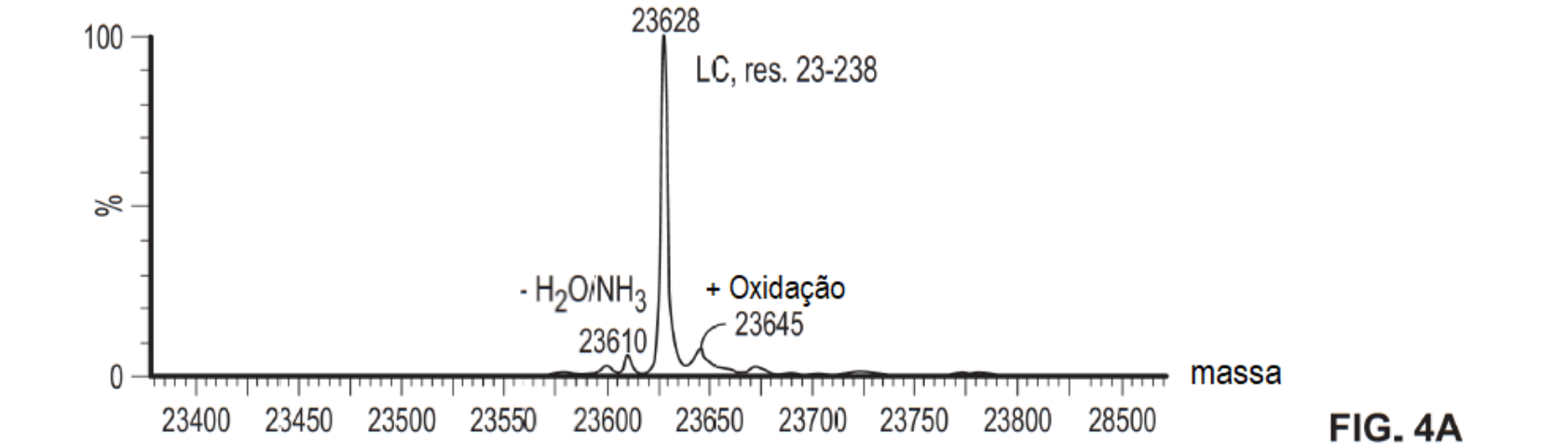


FIG. 4A

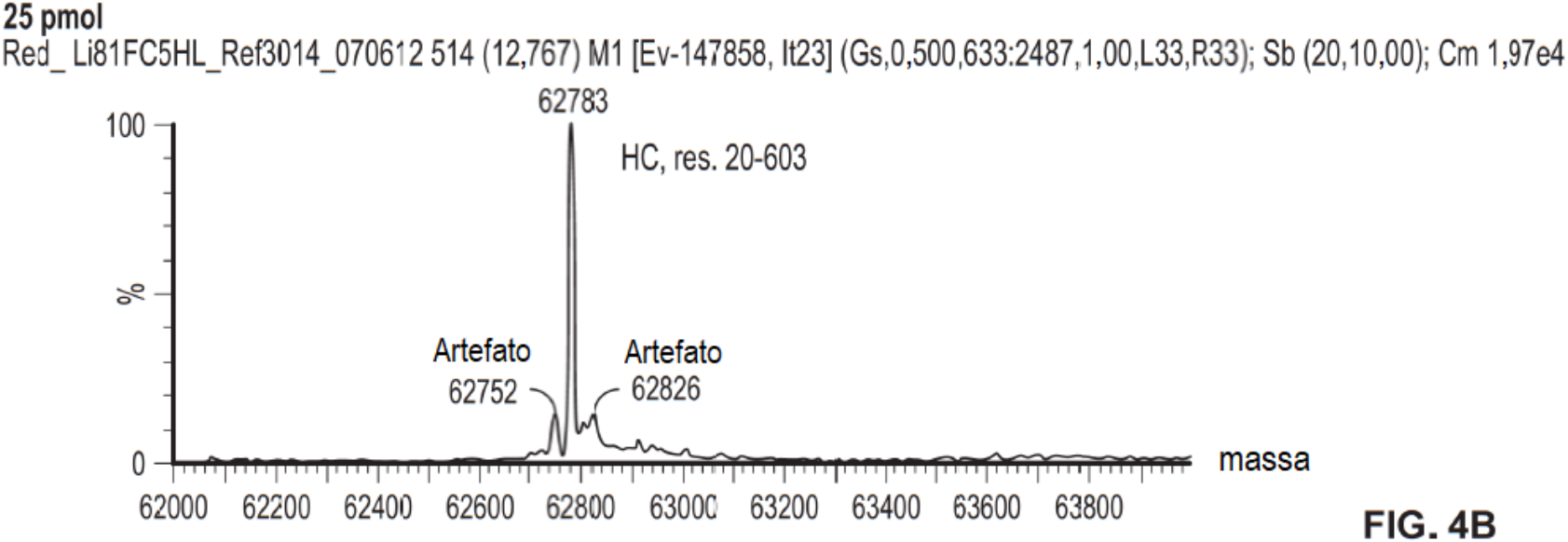


FIG. 4B

Petição 870210048205, de 27/05/2021, pág. 196/249

Espectros de massa desconvolutos da cadeia leve (5A) e cadeia pesada (5B) de Li81 FC5-L reduzido

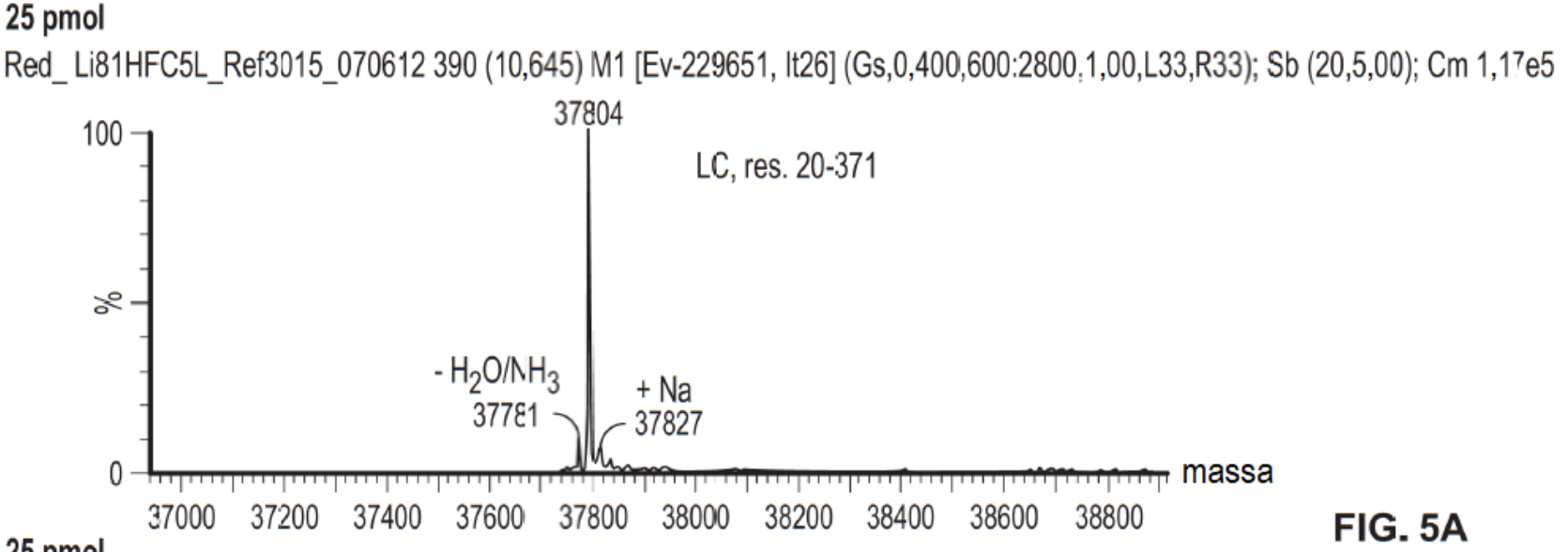


FIG. 5A

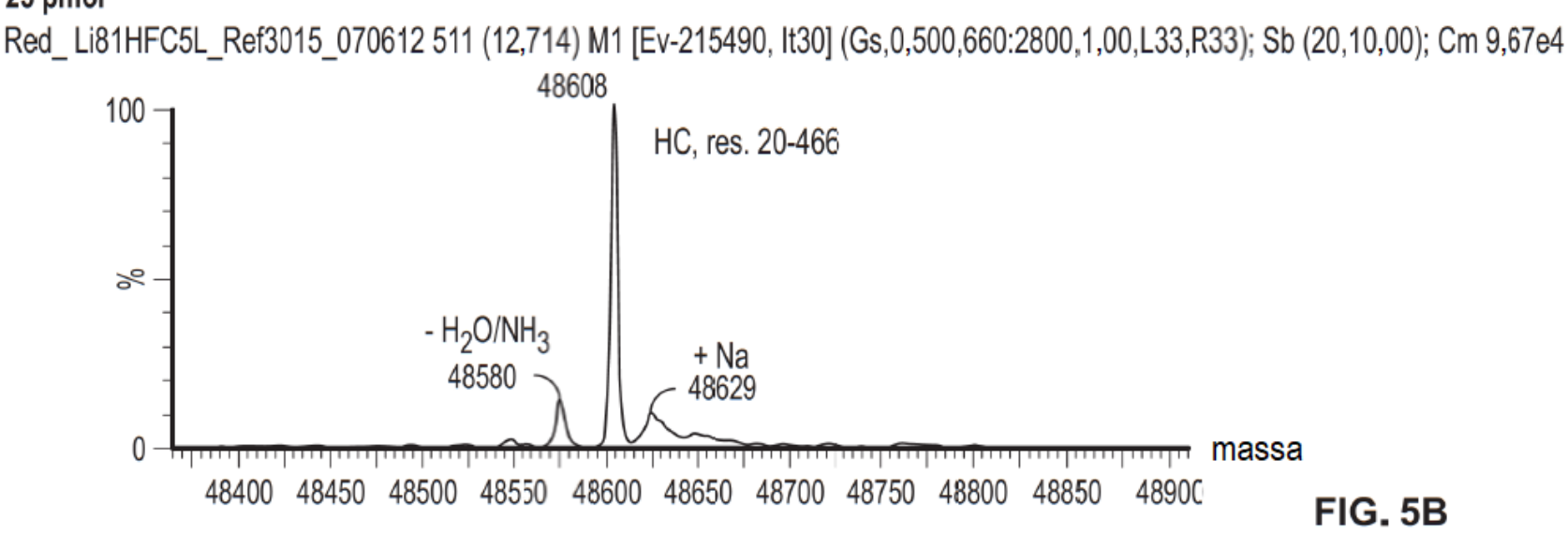


FIG. 5B

Espectros de massa desconvolutos da cadeia leve (6A) e cadeia pesada (6B) de Li81 FC5-H + FC5-L reduzido

25 pmol

Red_ Li81FC5HL-Ref3016_070612-2 352 (9,997) M1 [Ev-252408, It30] (Gs,0,400,600:2800,1,00,L33,R33); Sb (20,5,00); Cm 3,92e5

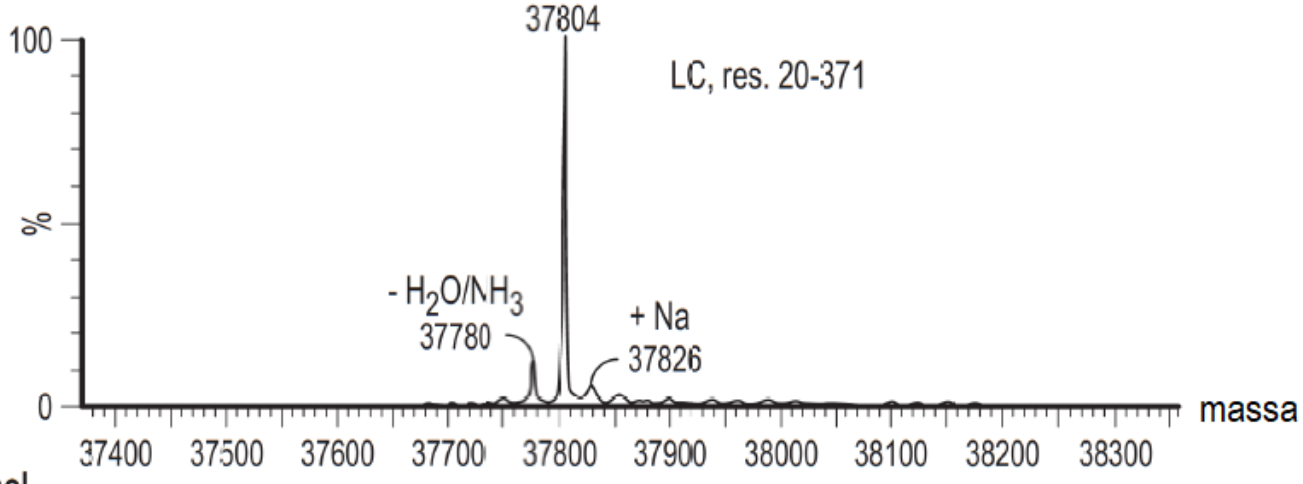


FIG. 6A

25 pmol

Red_ Li81FC5HL-Ref3016_070612-2 460 (11,843) M1 [Ev-219611, It28] (Gs,0,500,631:2755,1,00,L33,R33); Sb (20,10,00); Cm 1,46e5

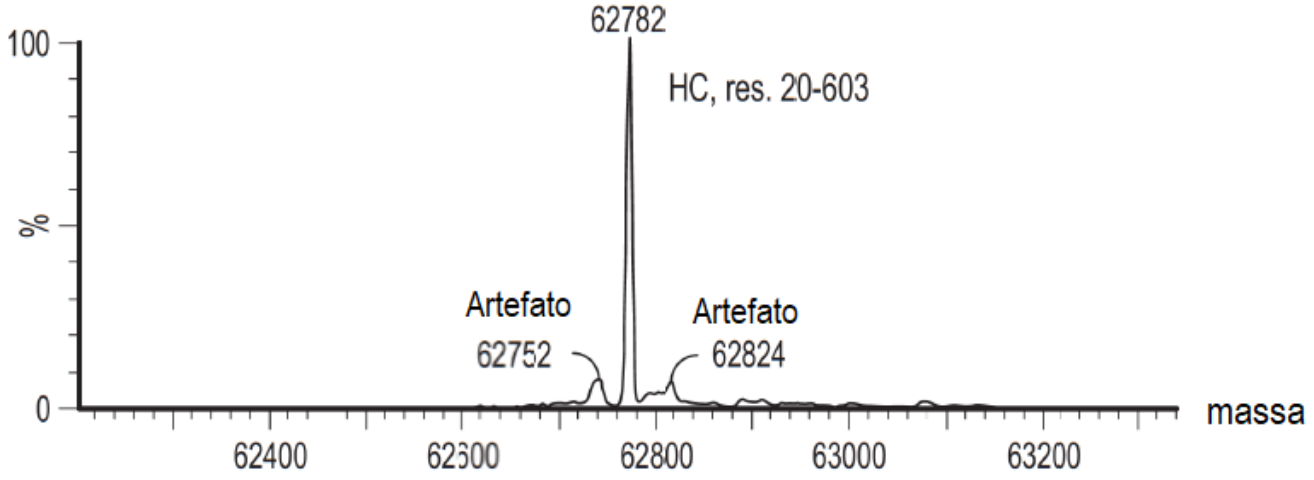


FIG. 6B

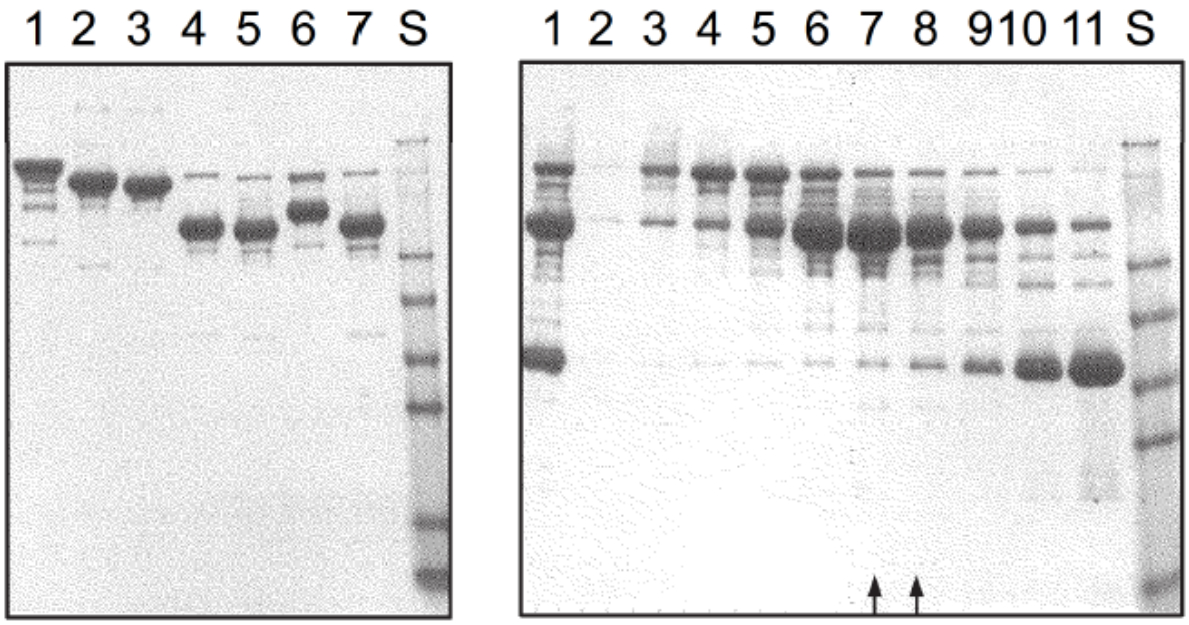


FIG. 7

Li81, cadeia leve (GC058)

MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCDIQMTQSP ATLSLSPGER ATLSCRASQS VSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI
YDASNRATGI PARFSGSGSG TDFTLTISSL EPEDFAVYYC QQRSNWPMYT FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI
FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE
KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

FC5-(G4S)1-Li81 hulgG1 agly, cadeia pesada (pYL945)

MGWSLILLFL VAVATRVLSD VQLQASGGGL VQAGGSLRLS CAASGFKITH YTMGWFRQAP GKEREFVSRI
TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMNSLKPEDT ADYYCAAGST STATPLRVDY WGKGTQVTVS
SGGGGSEVQL LESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFIFSAYEM KWVRQAPGKG LEWVSVIGPS GGFIFYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCATEGDNDA FDIWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK
STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN
HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG

articulação longa de FC5-Fc-(G4S)1-Li81 hulgG1 agly, cadeia pesada (pYL972)

MDWTWRVFCL LAVAPGAHSD VQLQASGGGL VQAGGSLRLS CAASGFKITH YTMGWFRQAP GKEREFVSRI
TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMNSLKPEDT ADYYCAAGST STATPLRVDY WGKGTQVTVS
SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKGGGGSE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSA YEMKWVRQAP
GKGLEWVSVI GPSGGFTFYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCATEGD NDAFDIWGQG
TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC

articulação curta de FC5-Fc-(G4S)1-Li81 hulgG1 agly, cadeia pesada (pYL973)

MDWTWRVFCL LAVAPGAHSD VQLQASGGGL VQAGGSLRLS CAASGFKITH YTMGWFRQAP GKEREFVSRI
TWGGDNTFYS NSVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMNSLKPEDT ADYYCAAGST STATPLRVDY WGKGTQVTVS
SKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSAY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSEVQLLESG GGLVQPGGSL RLSCAASGFT FSAYEMKWVR QAPGKGLEWV
SVIGPSGGFT FYADSVKGRF TISRDNSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAT EGDNDAFDIW GQGTTVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC

FIG. 8

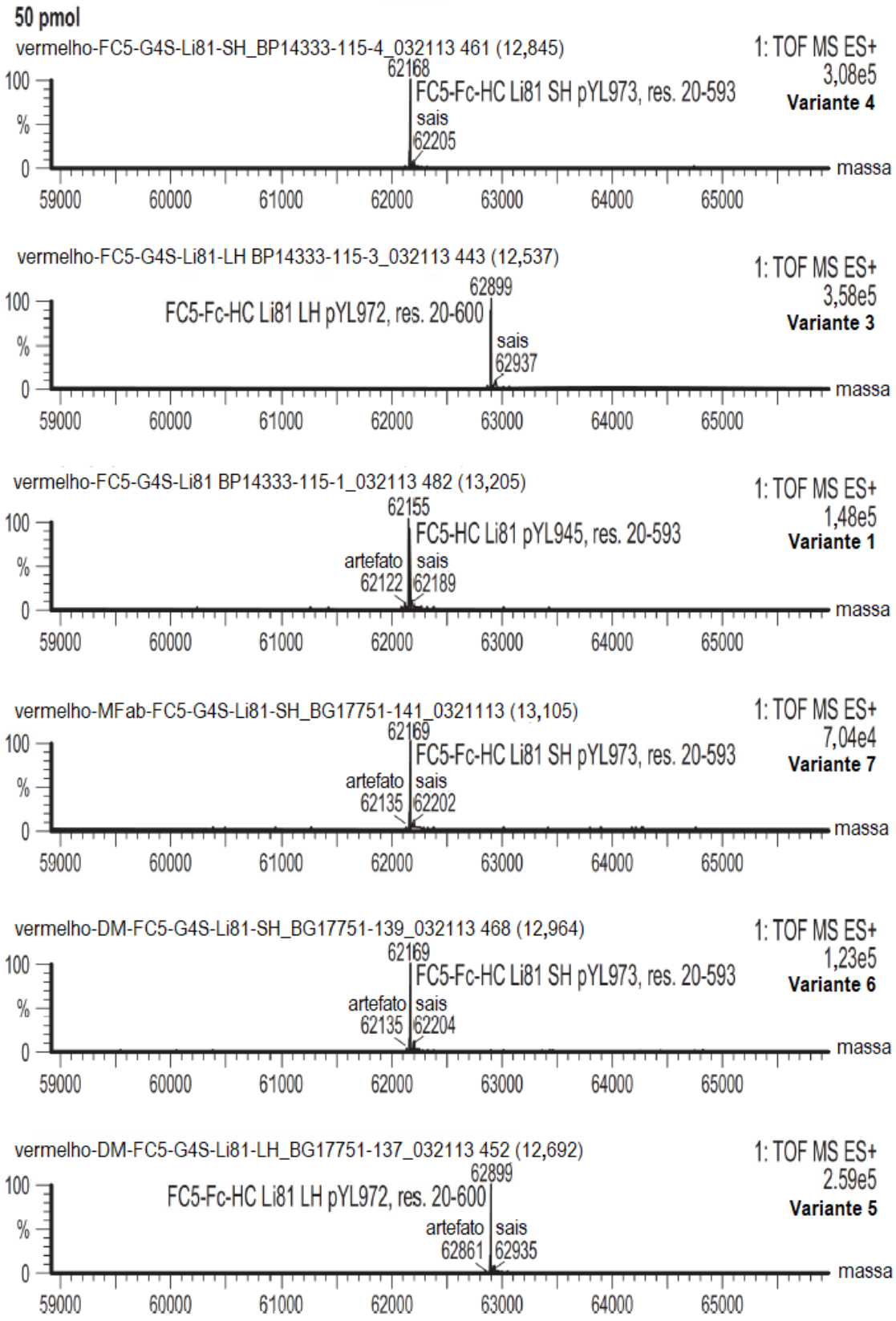

50 pmol
vermelho-FC5-G4S-Li81-SH_BP14333-115-4_032113 461 (12,845)
1: TOF MS ES+
3,08e5
Variante 4
62168
FC5-Fc-HC Li81 SH pYL973, res. 20-593
sais
62205
vermelho-FC5-G4S-Li81-LH BP14333-115-3_032113 443 (12,537)
1: TOF MS ES+
3,58e5
Variante 3
62899
FC5-Fc-HC Li81 LH pYL972, res. 20-600
sais
62937
vermelho-FC5-G4S-Li81 BP14333-115-1_032113 482 (13,205)
1: TOF MS ES+
1,48e5
Variante 1
62155
FC5-HC Li81 pYL945, res. 20-593
artefato
62122
sais
62189
vermelho-MFab-FC5-G4S-Li81-SH_BG17751-141_0321113 (13,105)
1: TOF MS ES+
7,04e4
Variante 7
62169
FC5-Fc-HC Li81 SH pYL973, res. 20-593
artefato
62135
sais
62202
vermelho-DM-FC5-G4S-Li81-SH_BG17751-139_032113 468 (12,964)
1: TOF MS ES+
1,23e5
Variante 6
62169
FC5-Fc-HC Li81 SH pYL973, res. 20-593
artefato
62135
sais
62204
vermelho-DM-FC5-G4S-Li81-LH_BG17751-137_032113 452 (12,692)
1: TOF MS ES+
2.59e5
Variante 5
62899
FC5-Fc-HC Li81 LH pYL972, res. 20-600
artefato
62861
sais
62935
100
%
0
59000
60000
61000
62000
63000
64000
65000
massa

FIG. 9

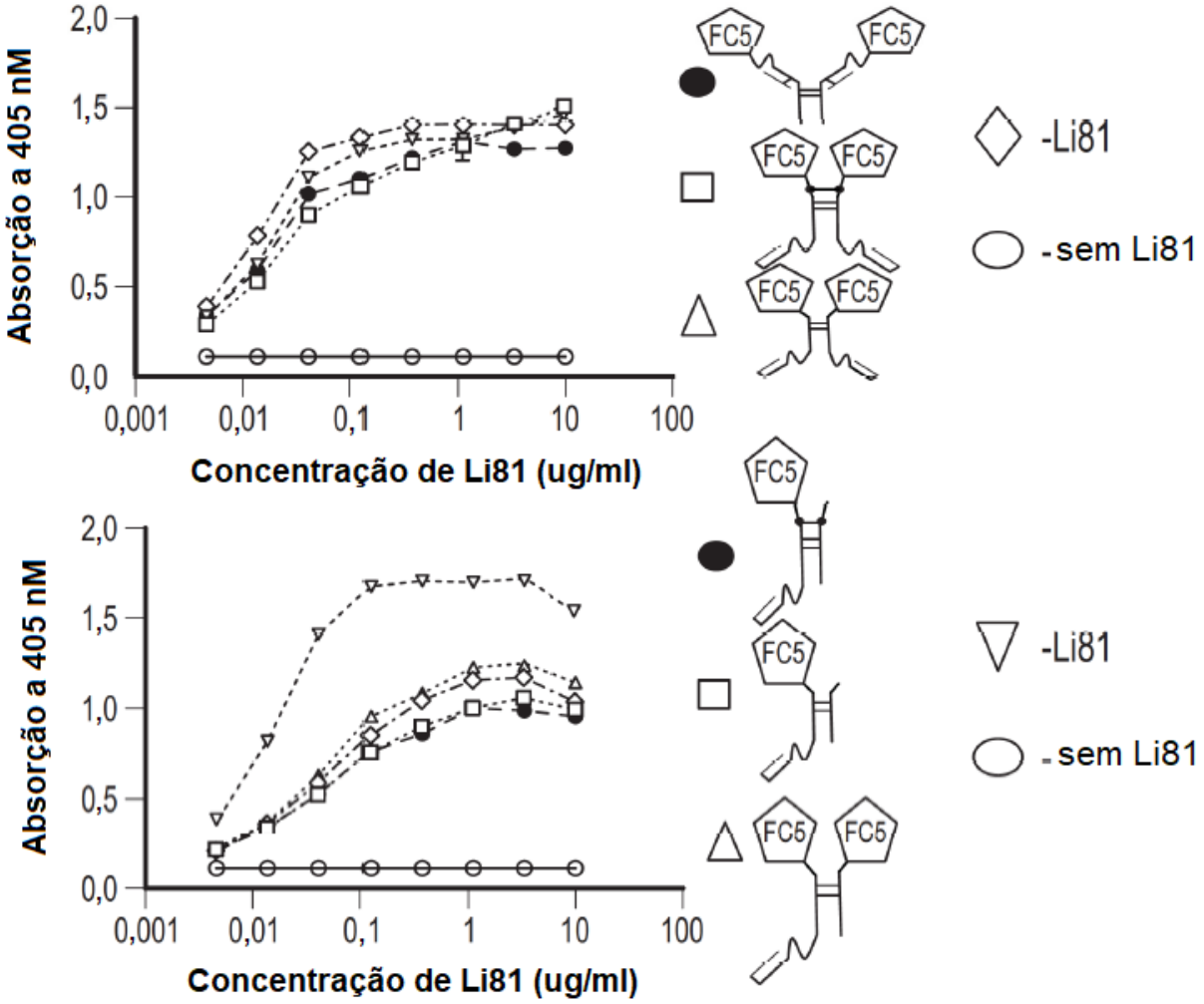

Absorção a 405 nM
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentração de Li81 (ug/ml)
FC5
-Li81
- sem Li81
Absorção a 405 nM
Concentração de Li81 (ug/ml)
FC5
-Li81
- sem Li81

FIG. 10

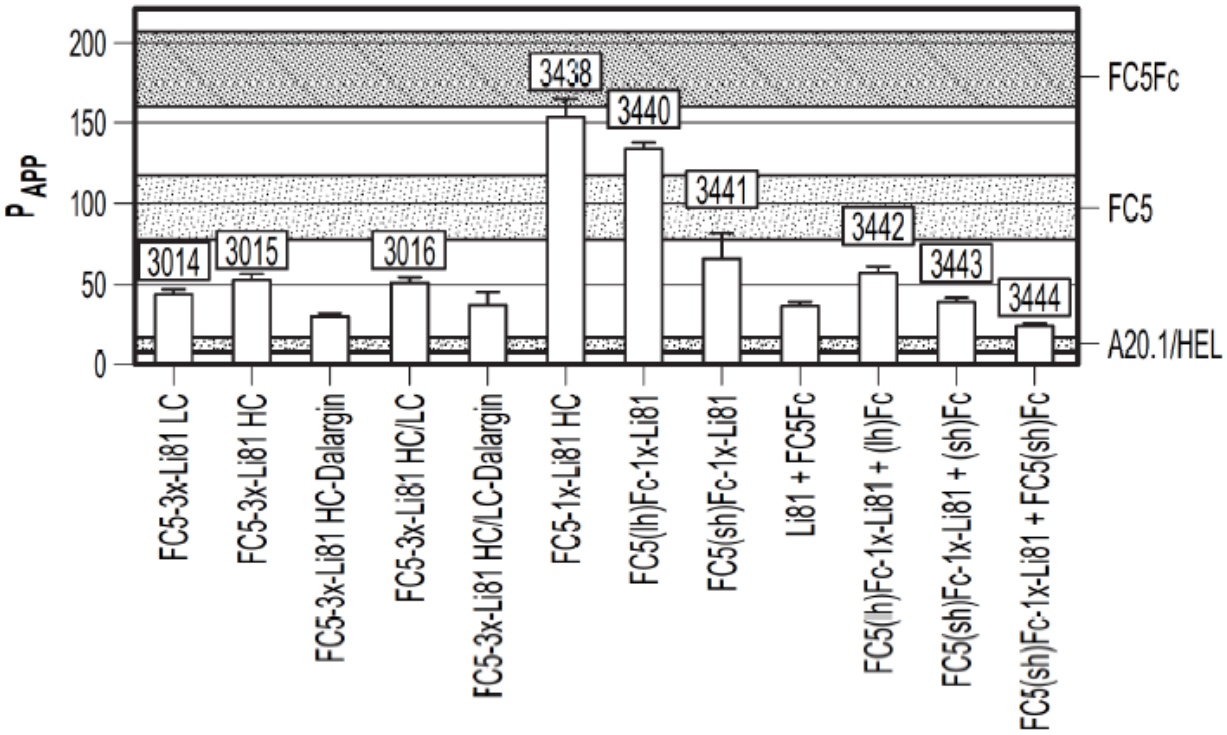

200
150
100
50
0
P_{APP}
3438
3440
3441
3442
3443
3444
3014
3015
3016
FC5Fc
FC5
A20.1/HEL
FC5-3x-Li81 LC
FC5-3x-Li81 HC
FC5-3x-Li81 HC-Dalargin
FC5-3x-Li81 HC/LC
FC5-3x-Li81 HC/LC-Dalargin
FC5-1x-Li81 HC
FC5(lh)Fc-1x-Li81
FC5(sh)Fc-1x-Li81
Li81 + FC5Fc
FC5(lh)Fc-1x-Li81 + (lh)Fc
FC5(sh)Fc-1x-Li81 + (sh)Fc
FC5(sh)Fc-1x-Li81 + FC5(sh)Fc

FIG. 11

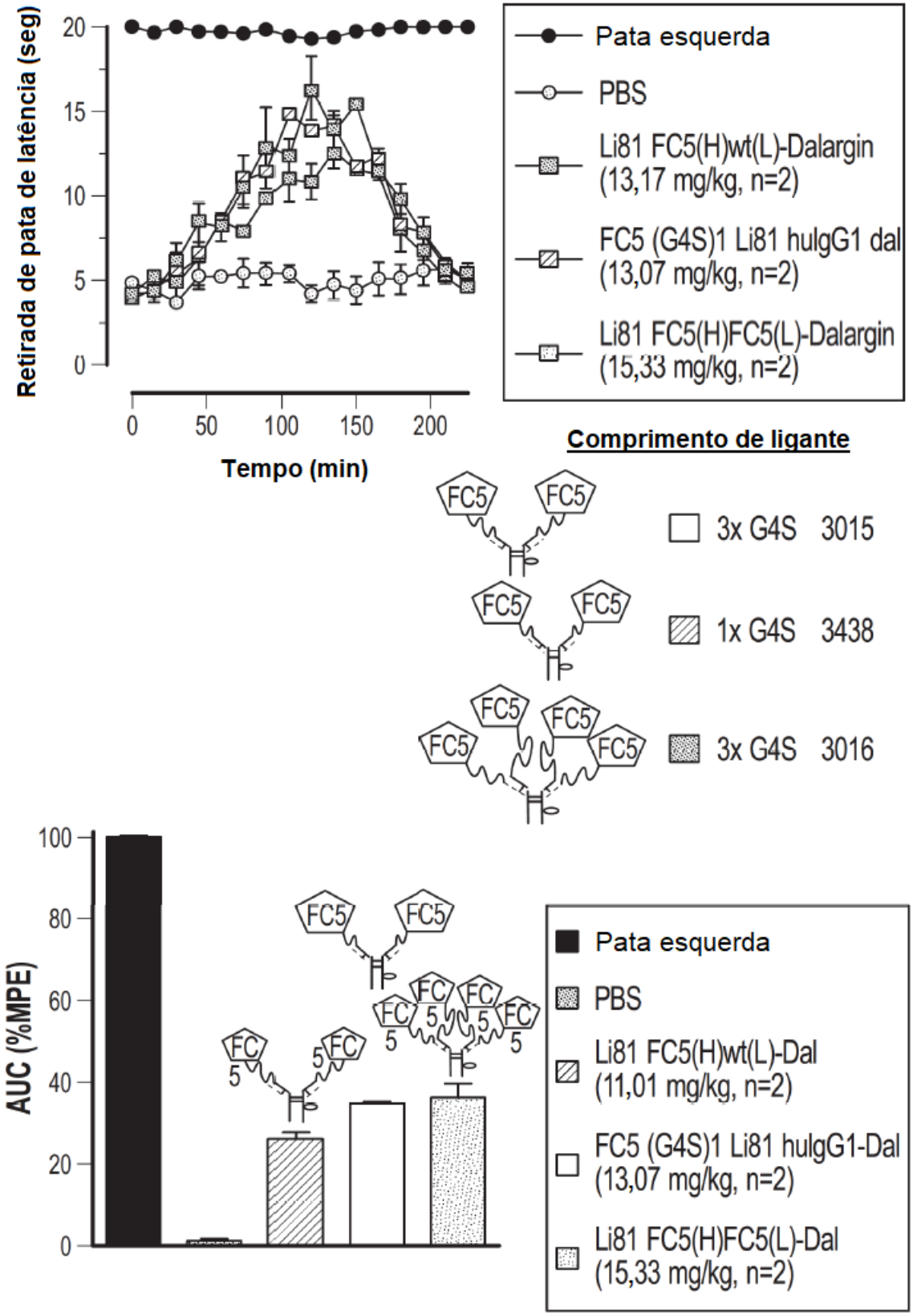

Retirada de pata de latência (seg)
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
Tempo (min)
Pata esquerda
PBS
Li81 FC5(H)wt(L)-Dalargin
(13,17 mg/kg, n=2)
FC5 (G4S)1 Li81 hulgG1 dal
(13,07 mg/kg, n=2)
Li81 FC5(H)FC5(L)-Dalargin
(15,33 mg/kg, n=2)
Comprimento de ligante
FC5
3x G4S 3015
1x G4S 3438
3x G4S 3016
AUC (%MPE)
100
80
60
40
20
0
Pata esquerda
PBS
Li81 FC5(H)wt(L)-Dal
(11,01 mg/kg, n=2)
FC5 (G4S)1 Li81 hulgG1-Dal
(13,07 mg/kg, n=2)
Li81 FC5(H)FC5(L)-Dal
(15,33 mg/kg, n=2)

FIG. 12

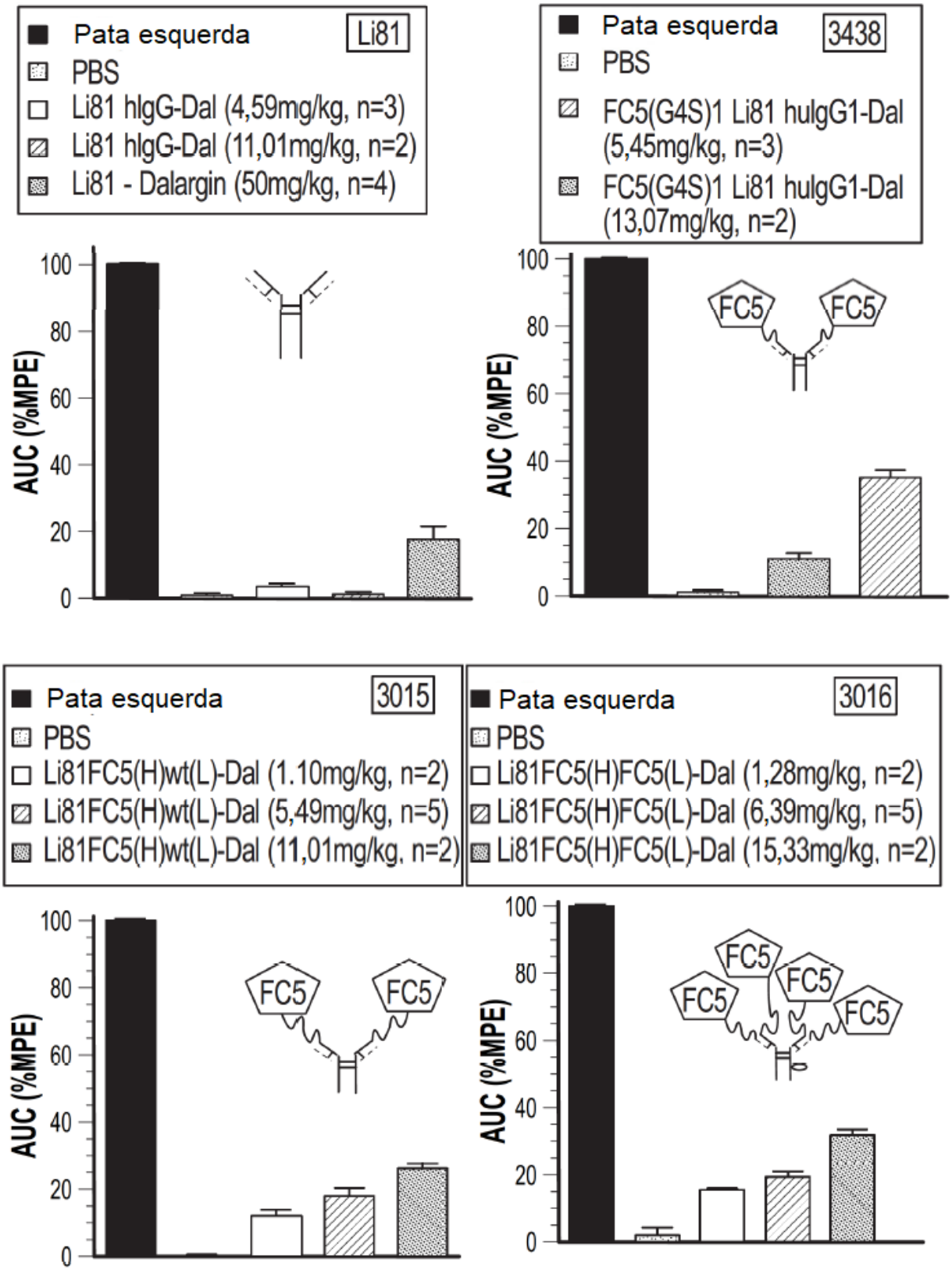

Pata esquerda
Li81
PBS
Li81 hIgG-Dal (4,59mg/kg, n=3)
Li81 hIgG-Dal (11,01mg/kg, n=2)
Li81 - Dalargin (50mg/kg, n=4)
AUC (%MPE)
Pata esquerda
3438
PBS
FC5(G4S)1 Li81 hulgG1-Dal (5,45mg/kg, n=3)
FC5(G4S)1 Li81 hulgG1-Dal (13,07mg/kg, n=2)
FC5
Pata esquerda
3015
PBS
Li81FC5(H)wt(L)-Dal (1.10mg/kg, n=2)
Li81FC5(H)wt(L)-Dal (5,49mg/kg, n=5)
Li81FC5(H)wt(L)-Dal (11,01mg/kg, n=2)
Pata esquerda
3016
PBS
Li81FC5(H)FC5(L)-Dal (1,28mg/kg, n=2)
Li81FC5(H)FC5(L)-Dal (6,39mg/kg, n=5)
Li81FC5(H)FC5(L)-Dal (15,33mg/kg, n=2)

FIG. 13A

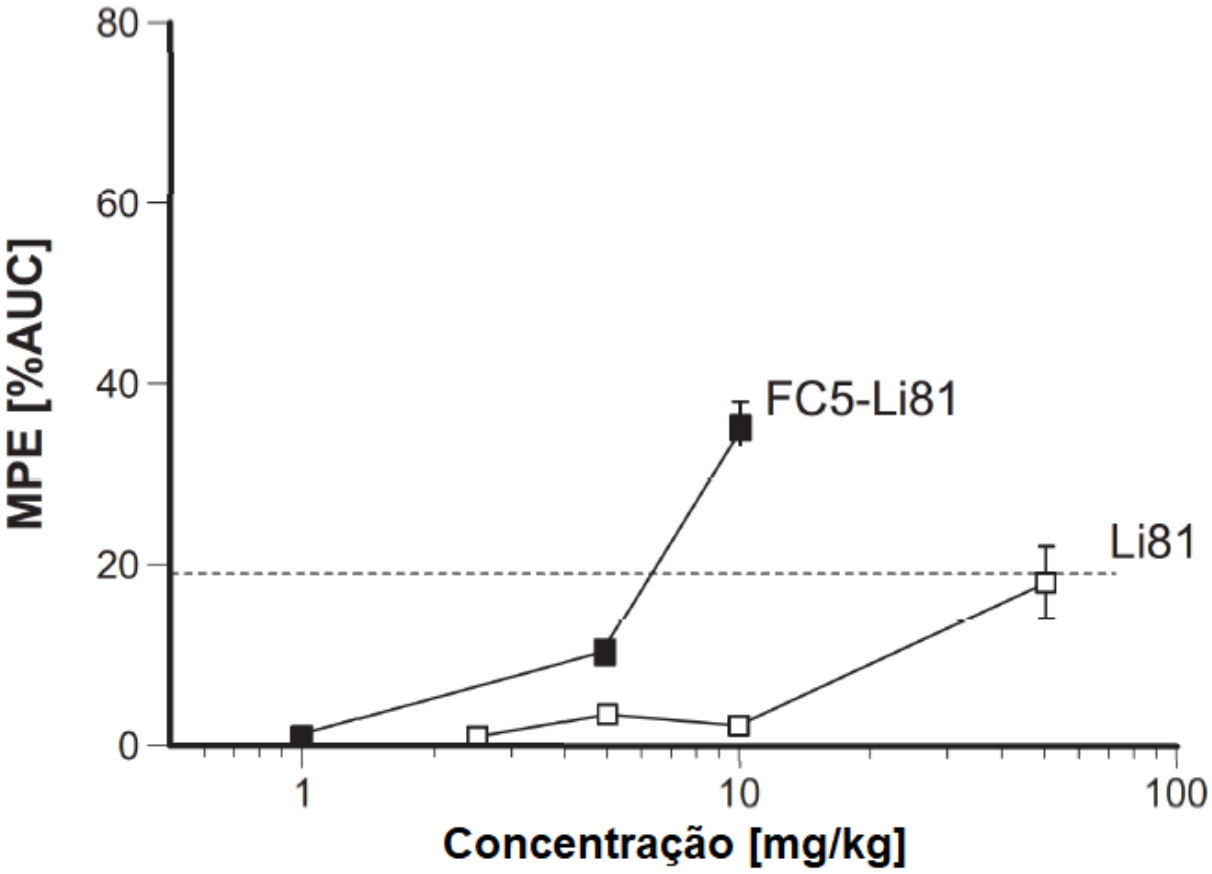


FIG. 13B

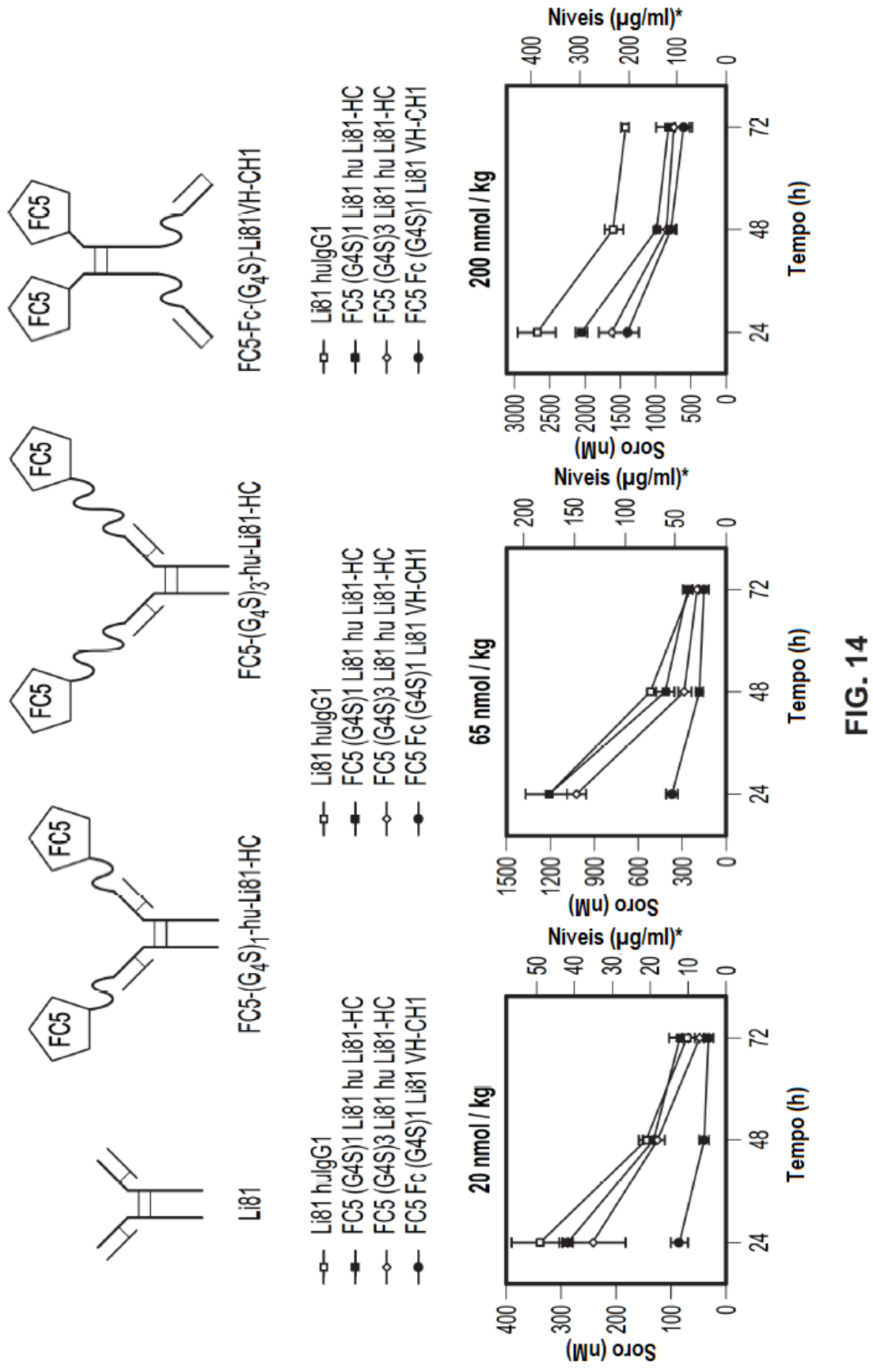

Li81
FC5-(G4S)1-hu-Li81-HC
FC5-(G4S)3-hu-Li81-HC
FC5-Fc-(G4S)-Li81VH-CH1
FC5
Li81 hulgG1
FC5 (G4S)1 Li81 hu Li81-HC
FC5 (G4S)3 Li81 hu Li81-HC
FC5 Fc (G4S)1 Li81 VH-CH1
Li81 hJlgG1
20 nmol / kg
65 nmol / kg
200 nmol / kg
Soro (nM)
Niveis (µg/ml)*
Tempo (h)

FIG. 14

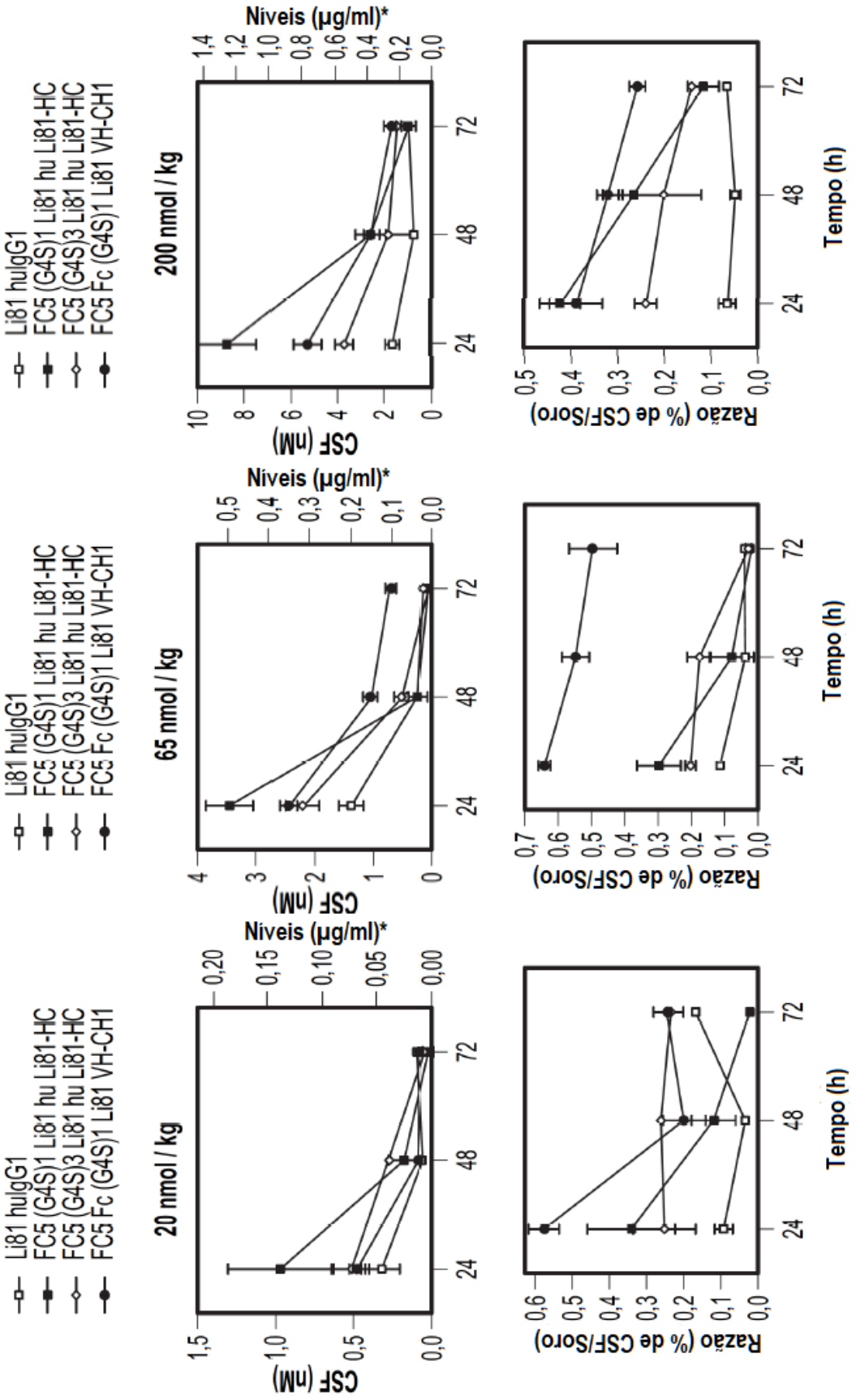

Li81 hulgG1
FC5 (G4S)1 Li81 hu Li81-HC
FC5 (G4S)3 Li81 hu Li81-HC
FC5 Fc (G4S)1 Li81 VH-CH1
200 nmol / kg
65 nmol / kg
20 nmol / kg
CSF (nM)
Niveis (µg/ml)*
Razão (% de CSF/Soro)
Tempo (h)

FIG. 14 (Cont.)

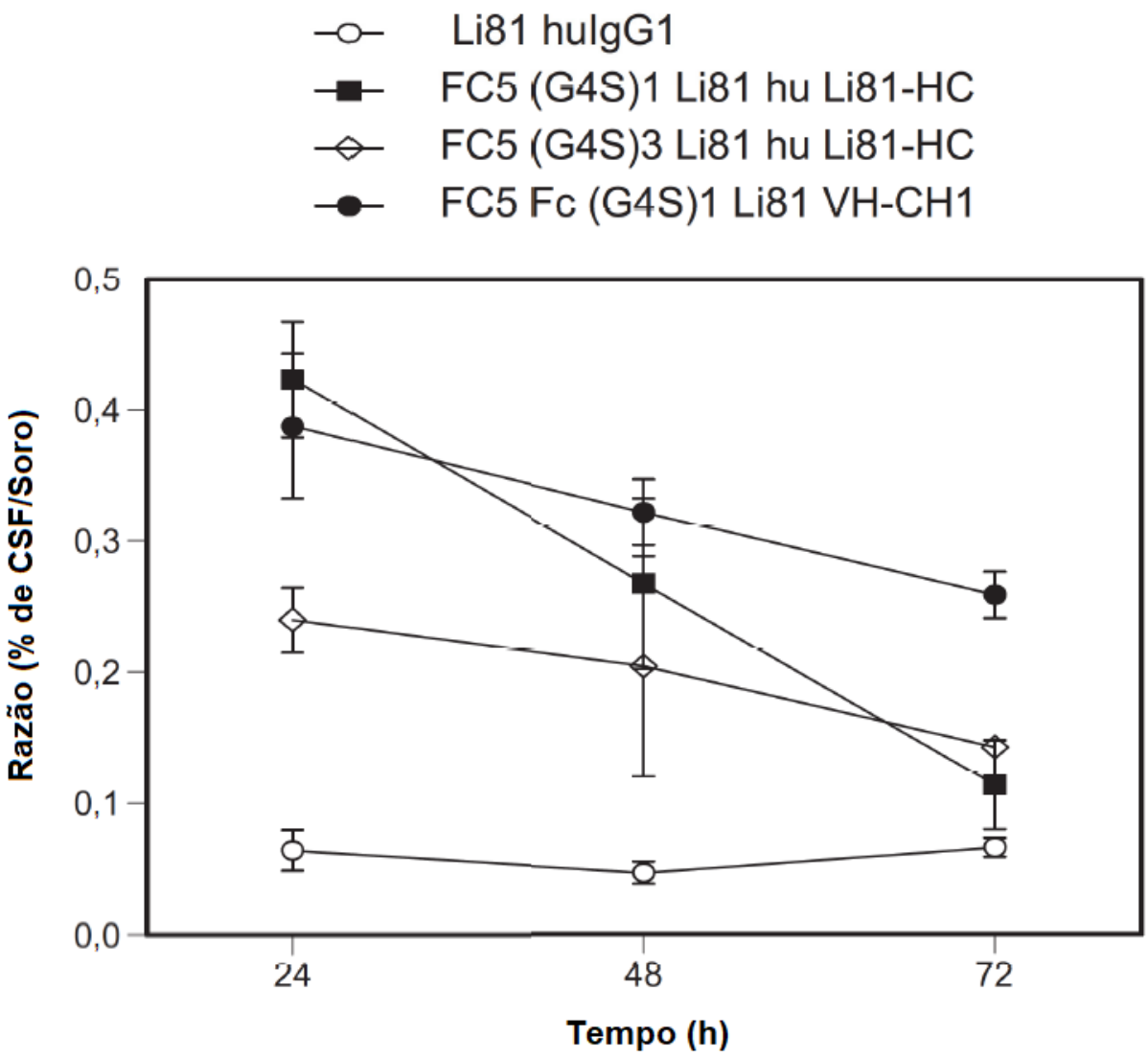

Li81 hulgG1
FC5 (G4S)1 Li81 hu Li81-HC
FC5 (G4S)3 Li81 hu Li81-HC
FC5 Fc (G4S)1 Li81 VH-CH1
Razão (% de CSF/Soro)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
24
48
72
Tempo (h)

FIG. 15

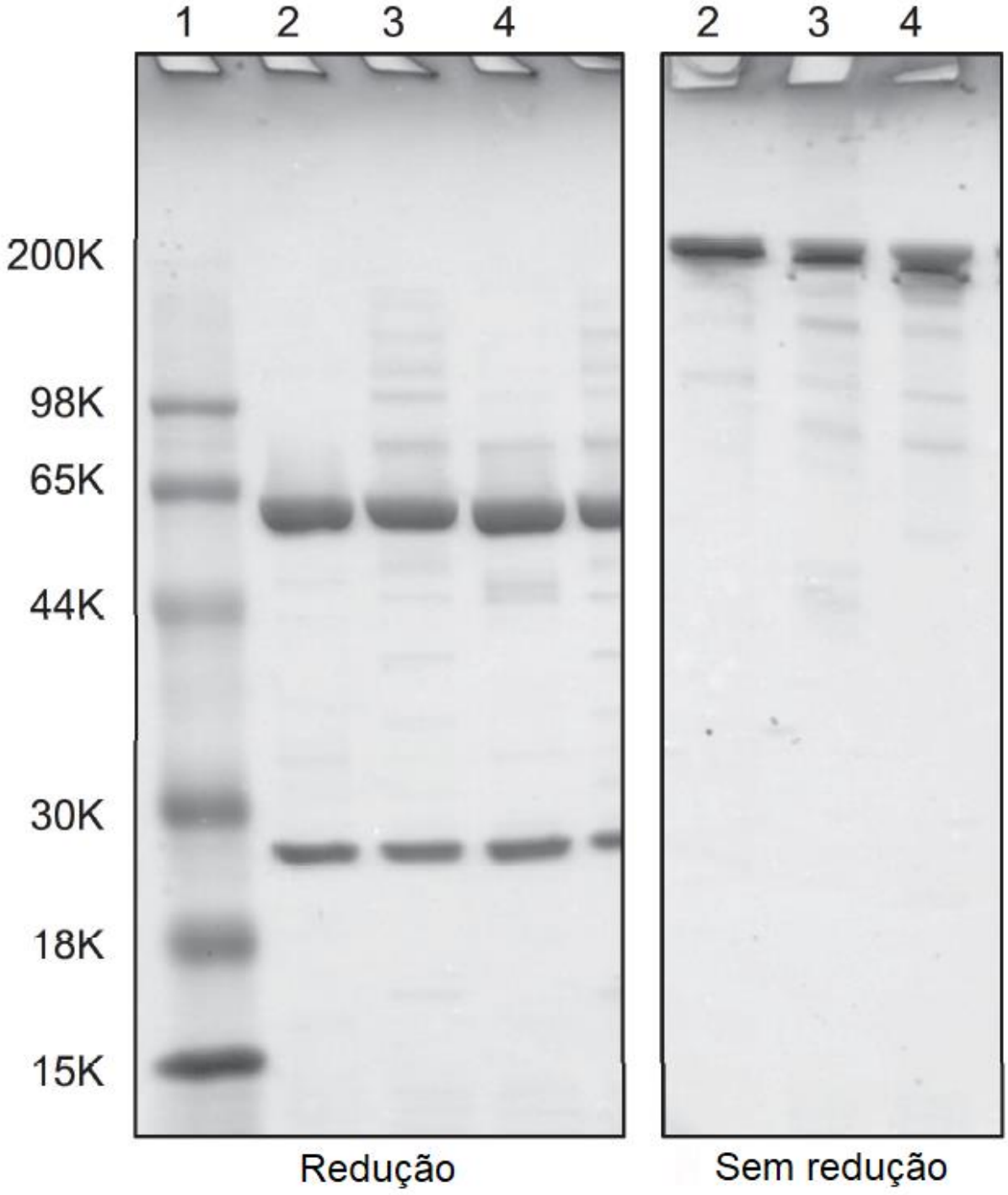
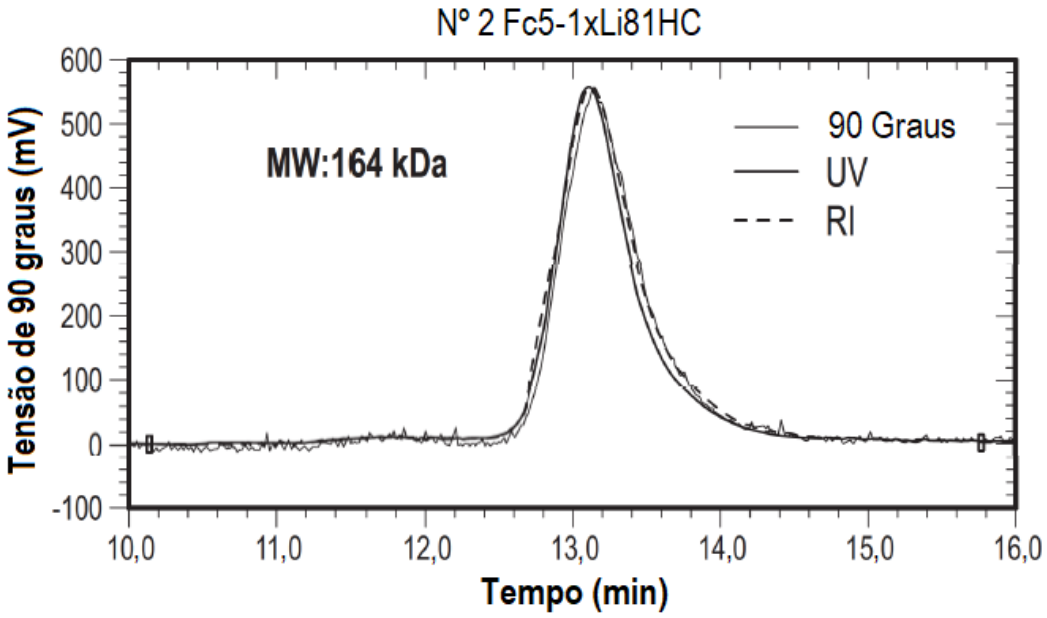
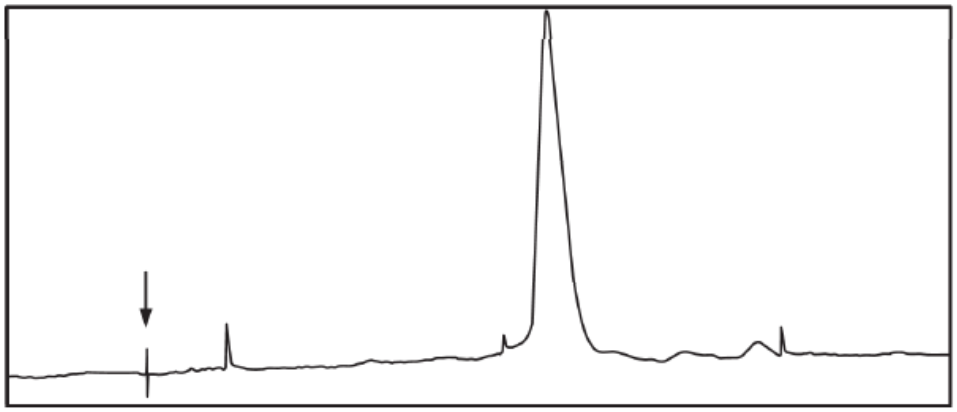


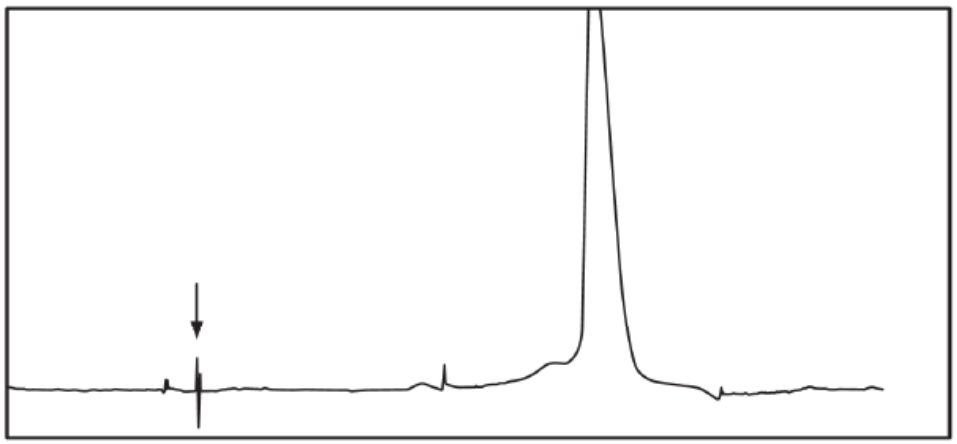
FIG. 16



Solução de dosagem (SEC/LS)



Amostra de pico 25 µg



Amostra de soro em 72 h 25 µg

FIG. 17

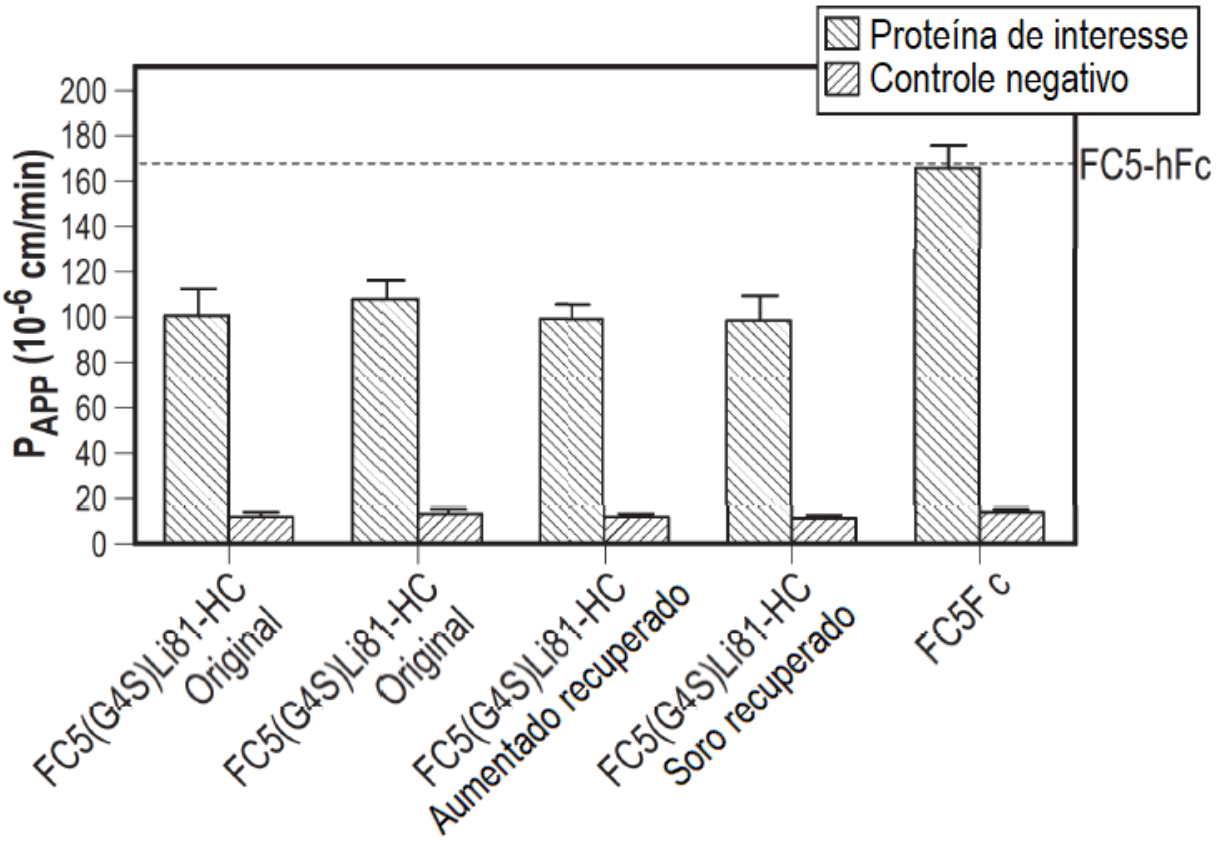

Proteína de interesse
Controle negativo
FC5-hFc
P_{APP} (10^{-6} cm/min)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
FC5(G4S)Li81-HC Original
FC5(G4S)Li81-HC Original
FC5(G4S)Li81-HC Aumentado recuperado
FC5(G4S)Li81-HC Soro recuperado
FC5F c

FIG. 18

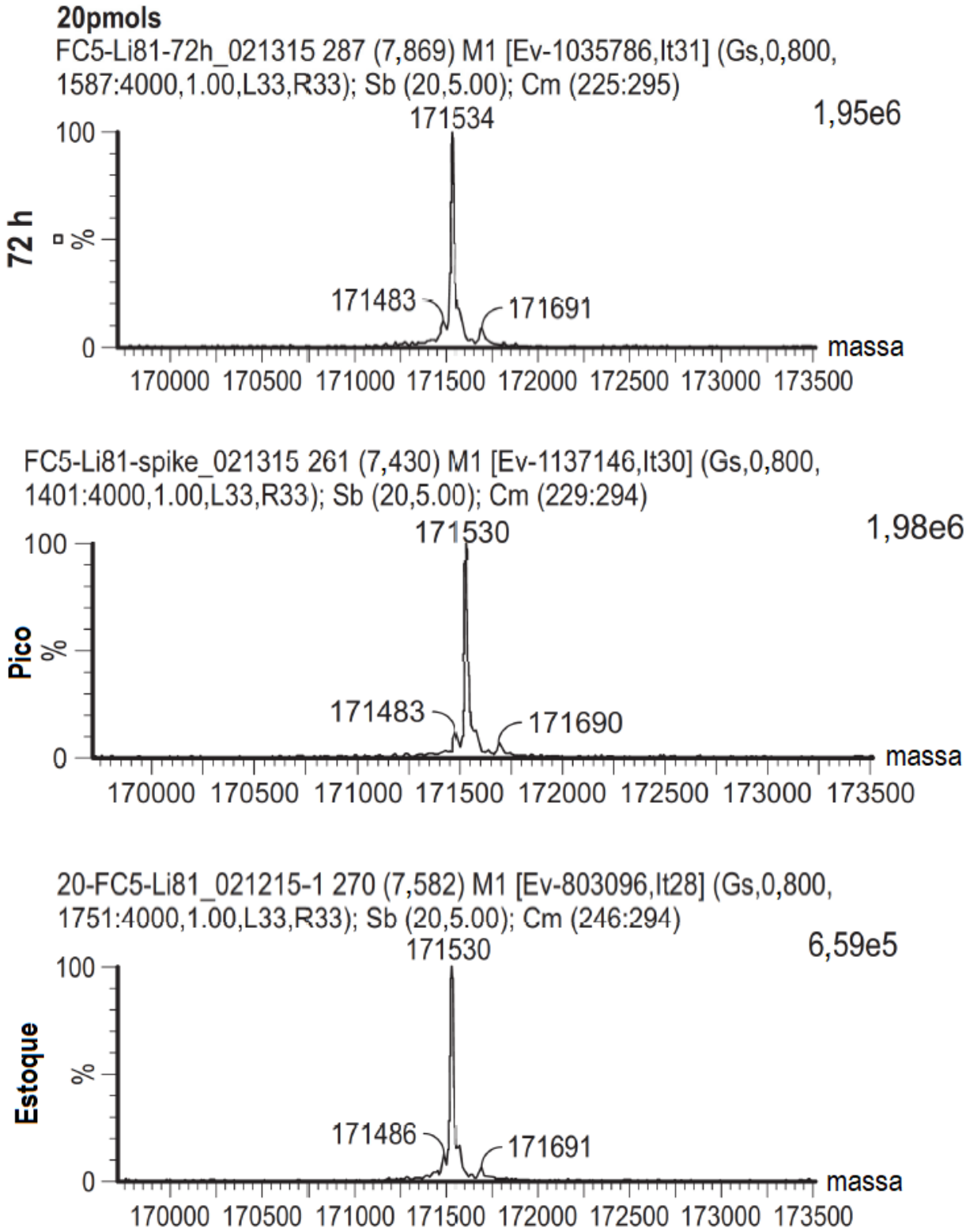

20pmols
FC5-Li81-72h_021315 287 (7,869) M1 [Ev-1035786,It31] (Gs,0,800, 1587:4000,1.00,L33,R33); Sb (20,5.00); Cm (225:295)
171534
1,95e6
100
%
72 h
0
171483
171691
massa
170000 170500 171000 171500 172000 172500 173000 173500
FC5-Li81-spike_021315 261 (7,430) M1 [Ev-1137146,It30] (Gs,0,800, 1401:4000,1.00,L33,R33); Sb (20,5.00); Cm (229:294)
171530
1,98e6
100
%
Pico
0
171483
171690
massa
170000 170500 171000 171500 172000 172500 173000 173500
20-FC5-Li81_021215-1 270 (7,582) M1 [Ev-803096,It28] (Gs,0,800, 1751:4000,1.00,L33,R33); Sb (20,5.00); Cm (246:294)
171530
6,59e5
100
%
Estoque
0
171486
171691
massa
170000 170500 171000 171500 172000 172500 173000 173500

FIG. 19

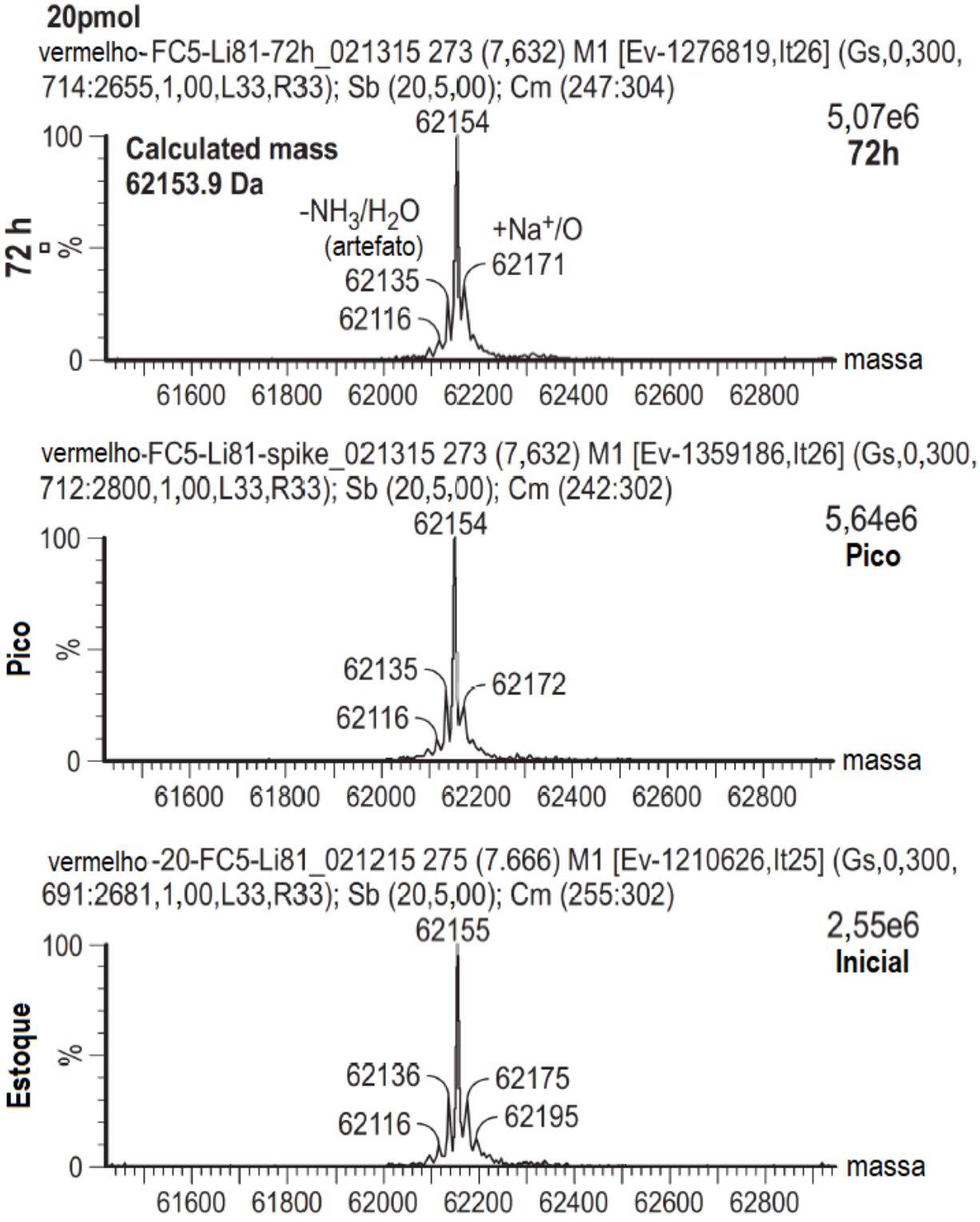

20pmol
vermelho-FC5-Li81-72h_021315 273 (7,632) M1 [Ev-1276819,It26] (Gs,0,300, 714:2655,1,00,L33,R33); Sb (20,5,00); Cm (247:304)
62154
5,07e6
72h
100
Calculated mass
62153.9 Da
-NH3/H2O
(artefato)
+Na+/O
62171
62135
62116
72 h
%
0
massa
61600 61800 62000 62200 62400 62600 62800
vermelho-FC5-Li81-spike_021315 273 (7,632) M1 [Ev-1359186,It26] (Gs,0,300, 712:2800,1,00,L33,R33); Sb (20,5,00); Cm (242:302)
62154
5,64e6
Pico
100
62135
62172
62116
Pico
%
0
massa
61600 61800 62000 62200 62400 62600 62800
vermelho-20-FC5-Li81_021215 275 (7.666) M1 [Ev-1210626,It25] (Gs,0,300, 691:2681,1,00,L33,R33); Sb (20,5,00); Cm (255:302)
62155
2,55e6
Inicial
100
62136
62175
62116
62195
Estoque
%
0
massa
61600 61800 62000 62200 62400 62600 62800

FIG. 20

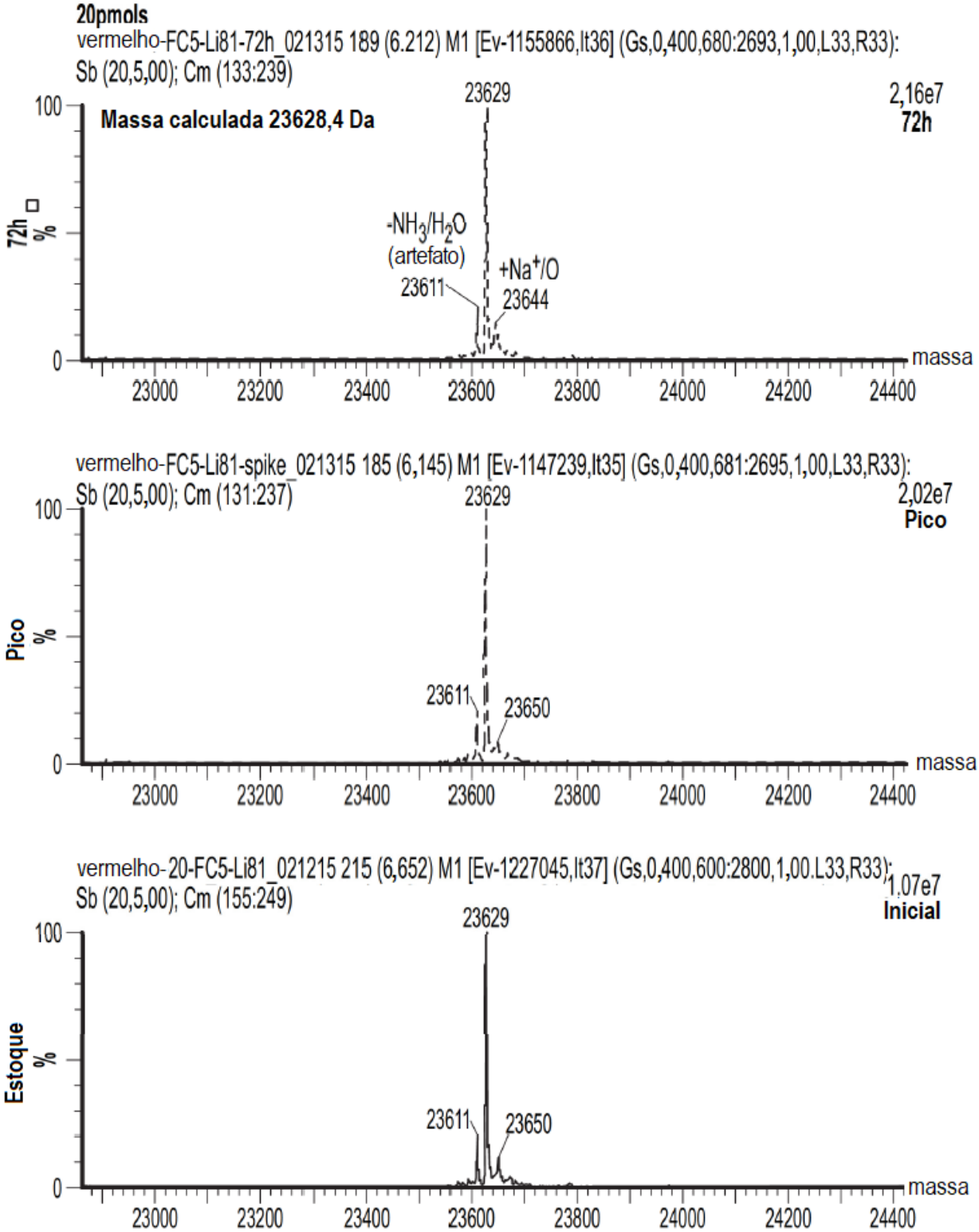

20pmols
vermelho-FC5-Li81-72h_021315 189 (6.212) M1 [Ev-1155866,It36] (Gs,0,400,680:2693,1,00,L33,R33):
Sb (20,5,00); Cm (133:239)
Massa calculada 23628,4 Da
23629
2,16e7
72h
72h %
-NH3/H2O
(artefato)
23611
+Na+/O
23644
massa
vermelho-FC5-Li81-spike_021315 185 (6,145) M1 [Ev-1147239,It35] (Gs,0,400,681:2695,1,00,L33,R33):
Sb (20,5,00); Cm (131:237)
23629
2,02e7
Pico
Pico %
23611
23650
massa
vermelho-20-FC5-Li81_021215 215 (6,652) M1 [Ev-1227045,It37] (Gs,0,400,600:2800,1,00.L33,R33);
Sb (20,5,00); Cm (155:249)
1,07e7
Inicial
23629
Estoque %
23611
23650
massa
100
0
23000
23200
23400
23600
23800
24000
24200
24400

FIG. 21

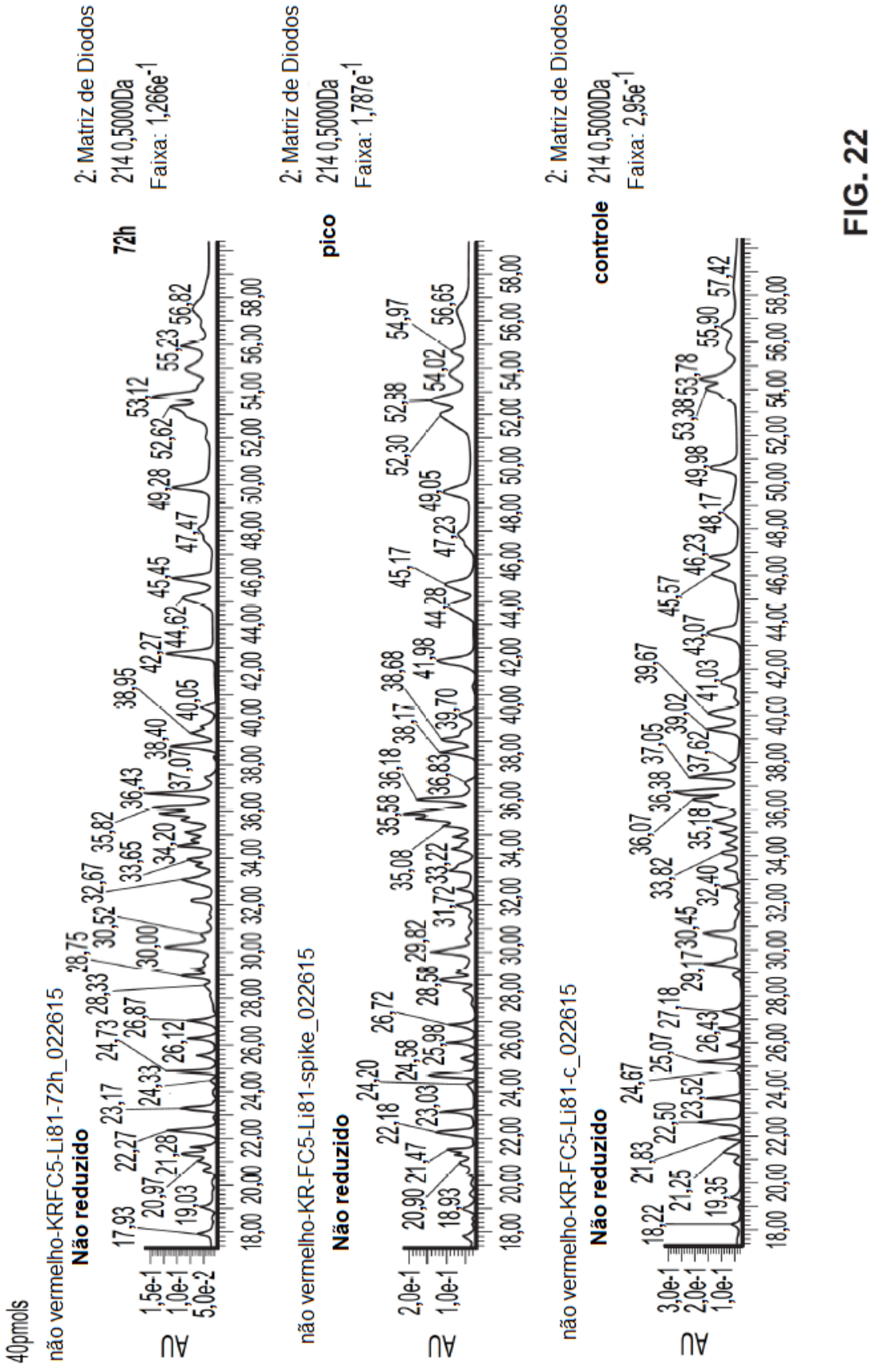

40pmols
não vermelho-KRFC5-Li81-72h_022615
Não reduzido
2: Matriz de Diodos
214 0,5000Da
Faixa: 1,266e-1
72h
não vermelho-KR-FC5-Li81-spike_022615
Não reduzido
2: Matriz de Diodos
214 0,5000Da
Faixa: 1,787e-1
pico
não vermelho-KR-FC5-Li81-c_022615
Não reduzido
2: Matriz de Diodos
214 0,5000Da
Faixa: 2,95e-1
controle
AU

FIG. 22

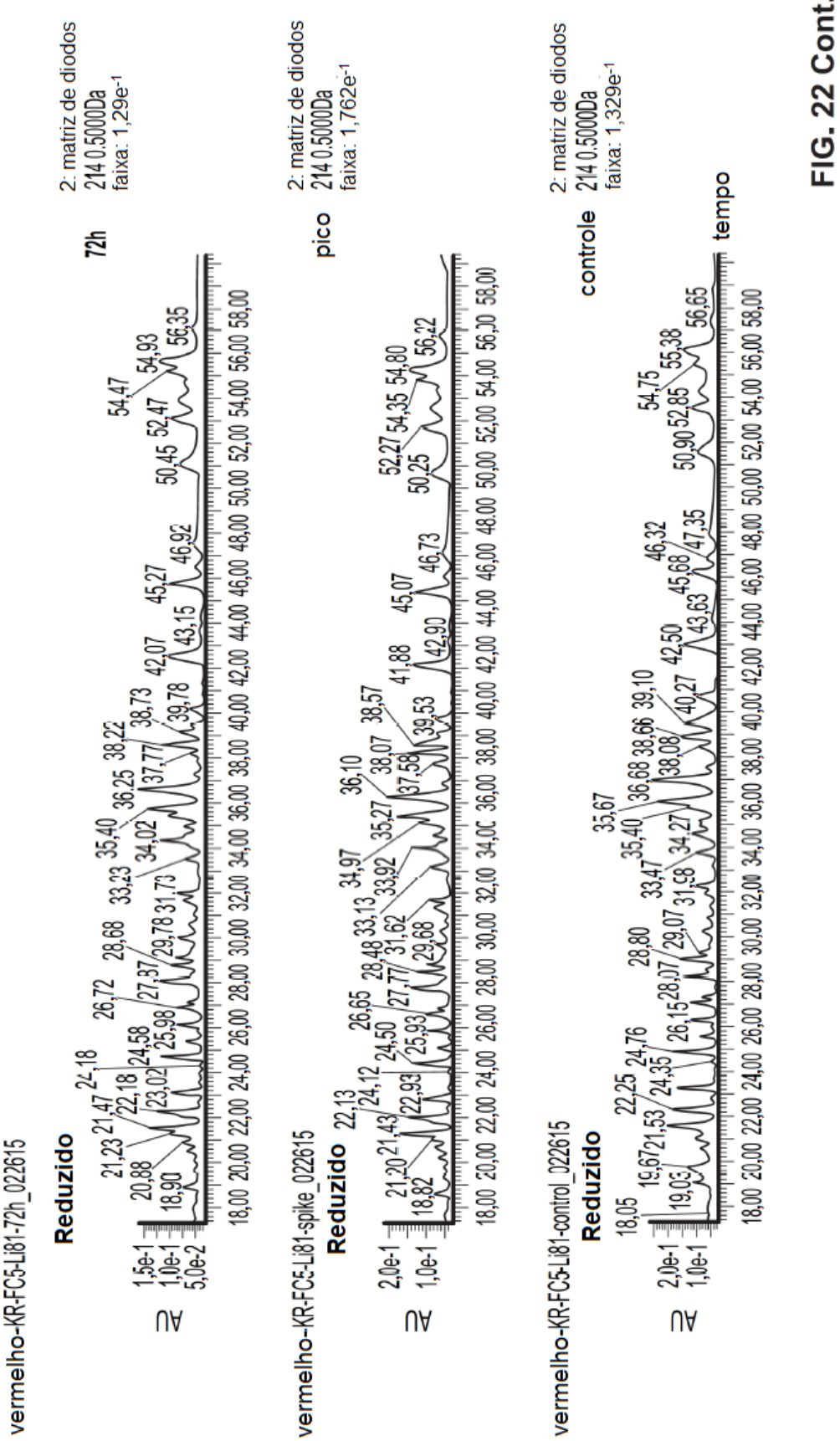
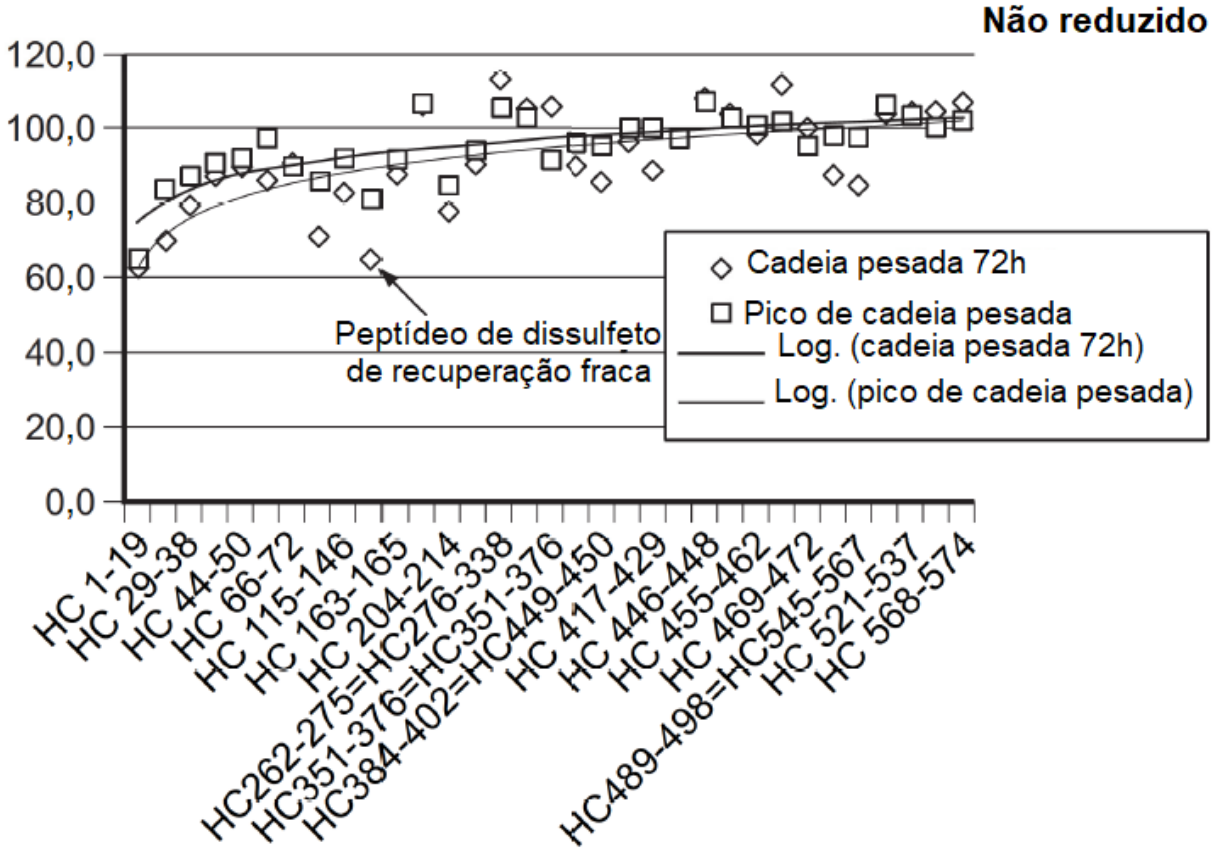

vermelho-KR-FC5-Li81-72h_022615
Reduzido
72h
2: matriz de diodos
214 0.5000Da
faixa: 1,29e-1
AU
tempo
vermelho-KR-FC5-Li81-spike_022615
Reduzido
pico
2: matriz de diodos
214 0.5000Da
faixa: 1,762e-1
AU
tempo
vermelho-KR-FC5-Li81-control_022615
Reduzido
controle
2: matriz de diodos
214 0.5000Da
faixa: 1,329e-1
AU
tempo

FIG. 22 Cont.


Não reduzido
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Peptídeo de dissulfeto de recuperação fraca
Cadeia pesada 72h
Pico de cadeia pesada
Log. (cadeia pesada 72h)
Log. (pico de cadeia pesada)
HC 1-19
HC 29-38
HC 44-50
HC 66-72
HC 115-146
HC 163-165
HC 204-214
HC262-275=HC276-338
HC351-376=HC351-376
HC384-402=HC449-450
HC 417-429
HC 446-448
HC 455-462
HC 469-472
HC489-498=HC545-567
HC 521-537
HC 568-574

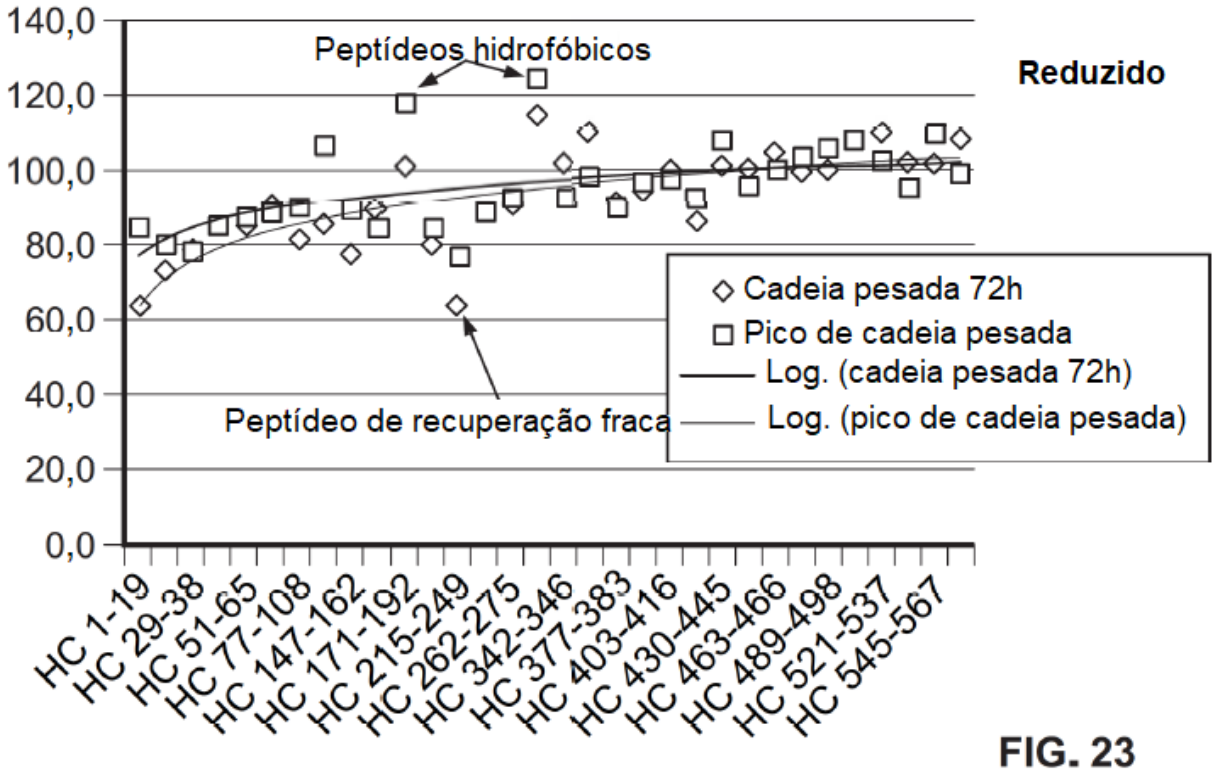
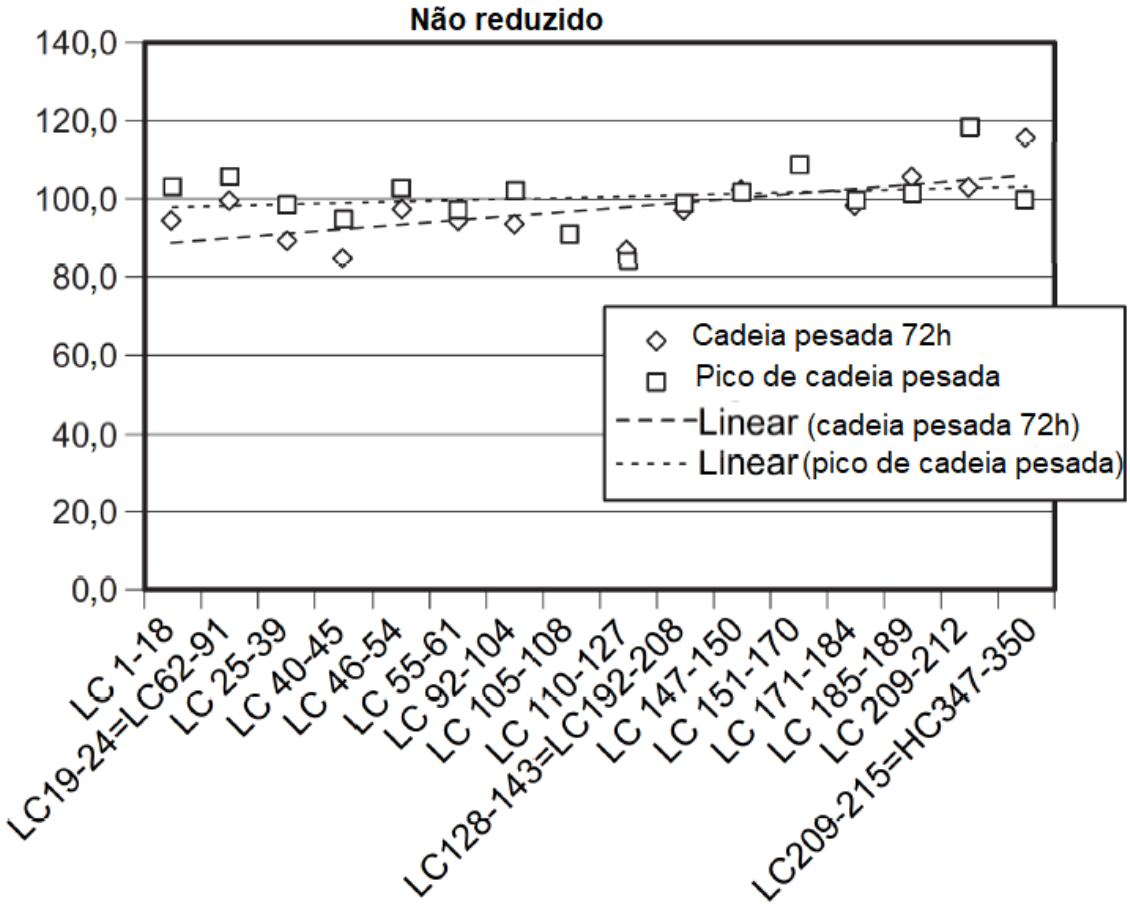

Reduzido
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Peptídeos hidrofóbicos
Peptídeo de recuperação fraca
Cadeia pesada 72h
Pico de cadeia pesada
Log. (cadeia pesada 72h)
Log. (pico de cadeia pesada)
HC 1-19
HC 29-38
HC 51-65
HC 77-108
HC 147-162
HC 171-192
HC 215-249
HC 262-275
HC 342-346
HC 377-383
HC 403-416
HC 430-445
HC 463-466
HC 489-498
HC 521-537
HC 545-567

FIG. 23


Não reduzido
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Cadeia pesada 72h
Pico de cadeia pesada
Linear (cadeia pesada 72h)
Linear (pico de cadeia pesada)
LC 1-18
LC19-24=LC62-91
LC 25-39
LC 40-45
LC 46-54
LC 55-61
LC 92-104
LC 105-108
LC 110-127
LC128-143=LC192-208
LC 147-150
LC 151-170
LC 171-184
LC 185-189
LC 209-212
LC209-215=HC347-350

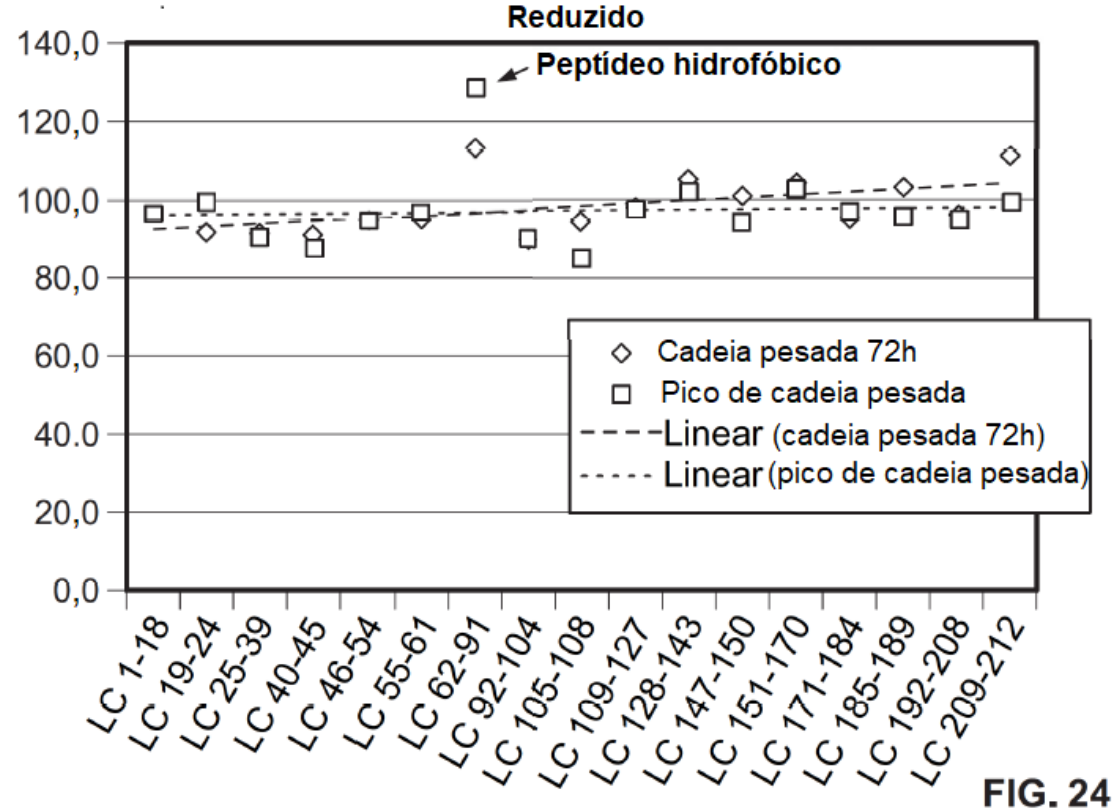

Reduzido
Peptídeo hidrofóbico
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40.0
20,0
0,0
Cadeia pesada 72h
Pico de cadeia pesada
Linear (cadeia pesada 72h)
Linear (pico de cadeia pesada)
LC 1-18
LC 19-24
LC 25-39
LC 40-45
LC 46-54
LC 55-61
LC 62-91
LC 92-104
LC 105-108
LC 109-127
LC 128-143
LC 147-150
LC 151-170
LC 171-184
LC 185-189
LC 192-208
LC 209-212

FIG. 24

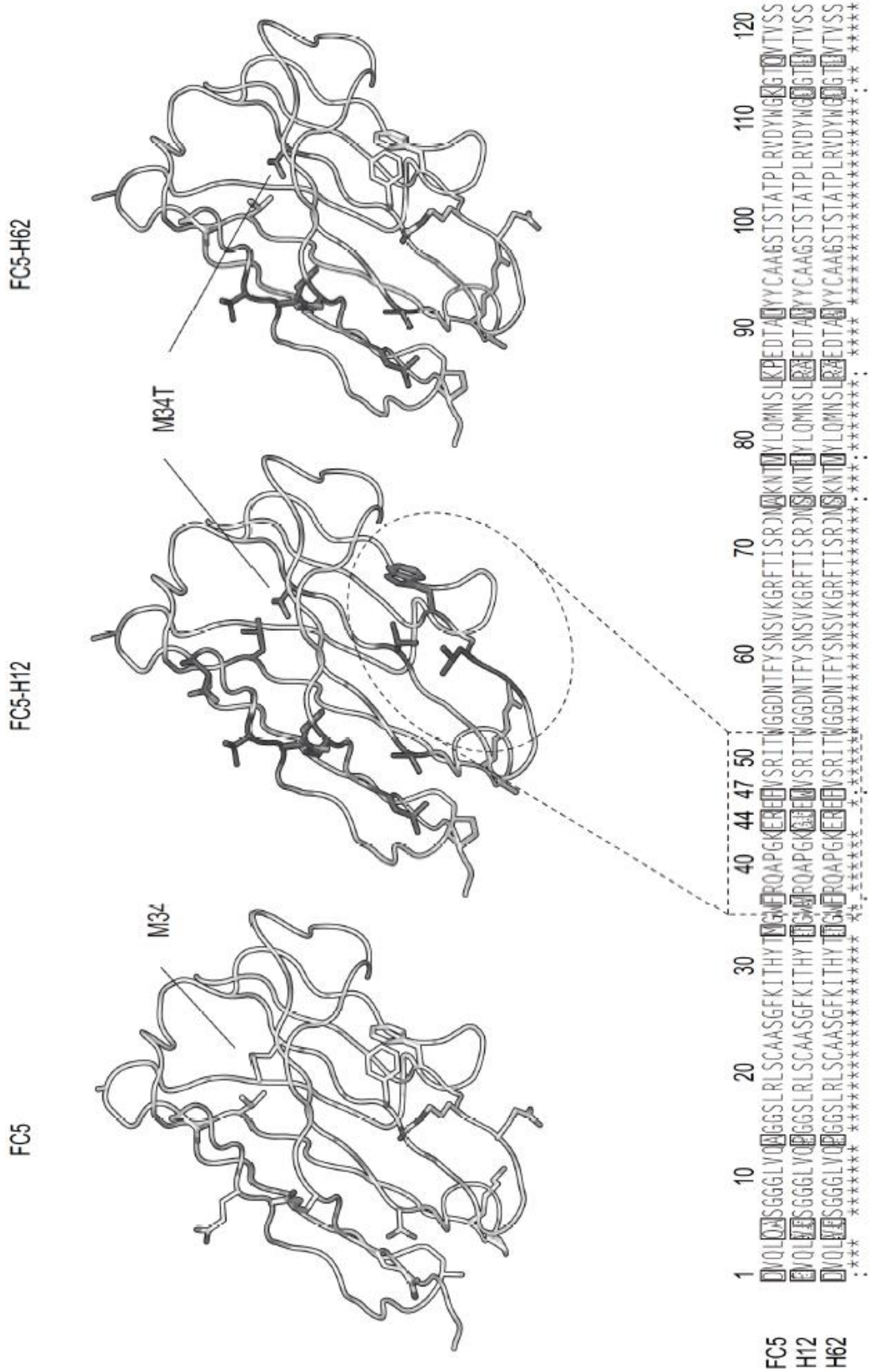


FIG. 25

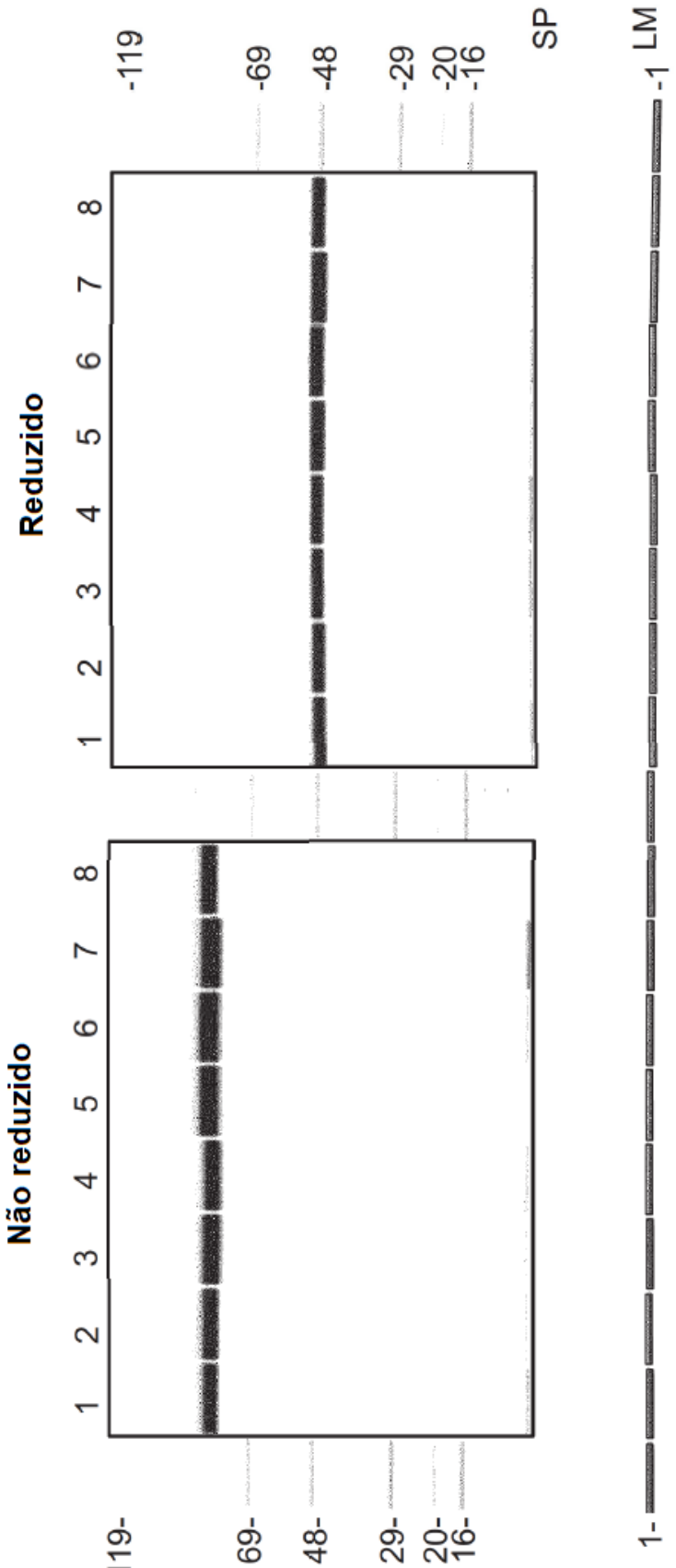

Não reduzido
Reduzido
1
2
3
4
5
6
7
8
119-
69-
48-
29-
20-
16-
-119
-69
-48
-29
-20
-16
SP
1-
-1
LM

FIG. 26

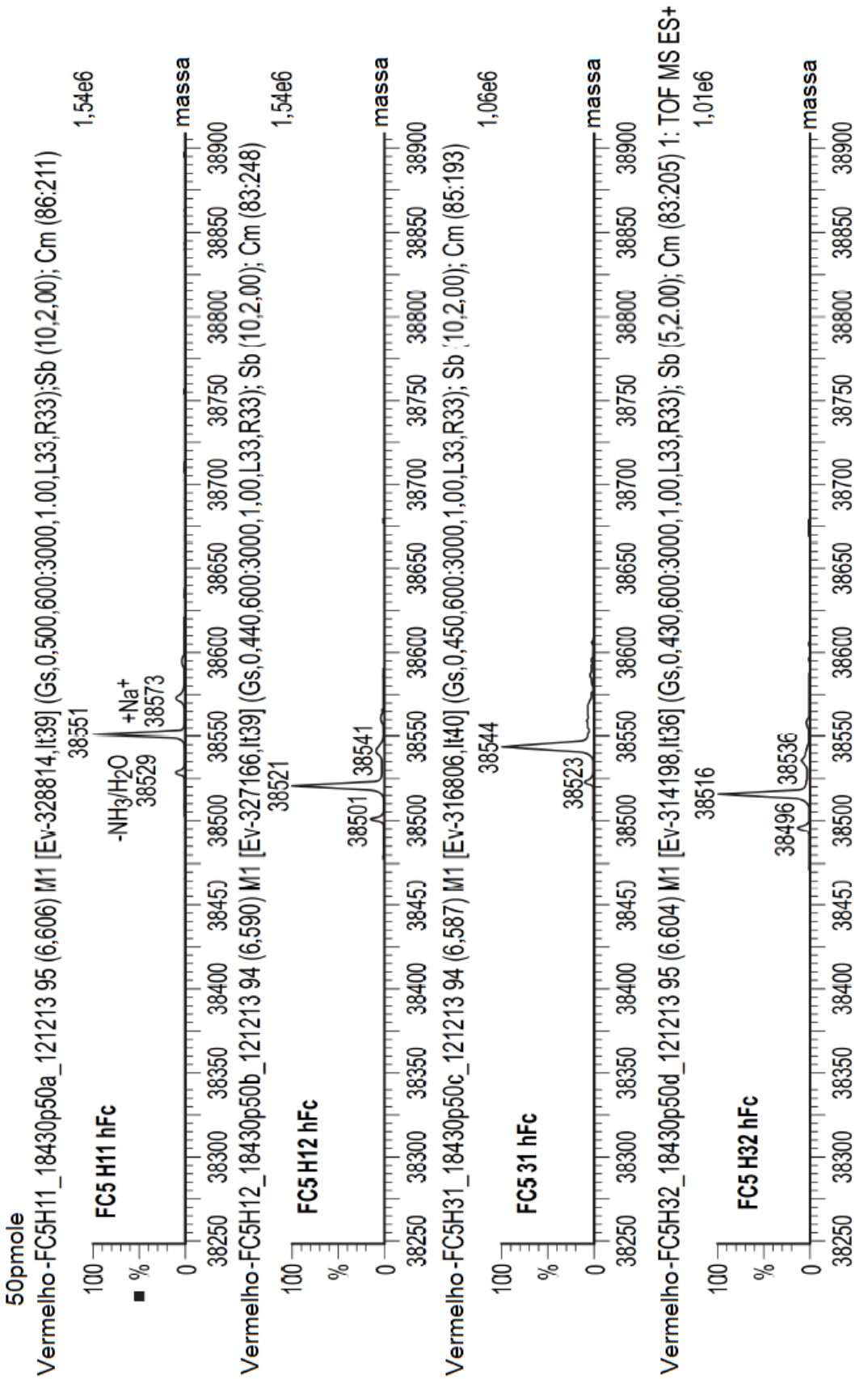

50pmole
Vermelho-FC5H11_18430p50a_121213 95 (6,606) M1 [Ev-328814,It39] (Gs,0,500,600:3000,1.00,L33,R33);Sb (10,2,00); Cm (86:211)
FC5 H11 hFc
-NH3/H2O
+Na+
38529
38551
38573
1,54e6
Vermelho-FC5H12_18430p50b_121213 94 (6,590) M1 [Ev-327166,It39] (Gs,0,440,600:3000,1,00,L33,R33); Sb (10,2,00); Cm (83:248)
FC5 H12 hFc
38501
38521
38541
1,54e6
Vermelho-FC5H31_18430p50c_121213 94 (6,587) M1 [Ev-316806,It40] (Gs,0,450,600:3000,1,00,L33,R33); Sb (10,2,00); Cm (85:193)
FC5 31 hFc
38523
38544
1,06e6
Vermelho-FC5H32_18430p50d_121213 95 (6.604) M1 [Ev-314198,It36] (Gs,0,430,600:3000,1,00,L33,R33); Sb (5,2.00); Cm (83:205) 1: TOF MS ES+
FC5 H32 hFc
38496
38516
38536
1,01e6
100
%
0
38250
38300
38350
38400
38450
38500
38550
38600
38650
38700
38750
38800
38850
38900
massa

FIG. 27

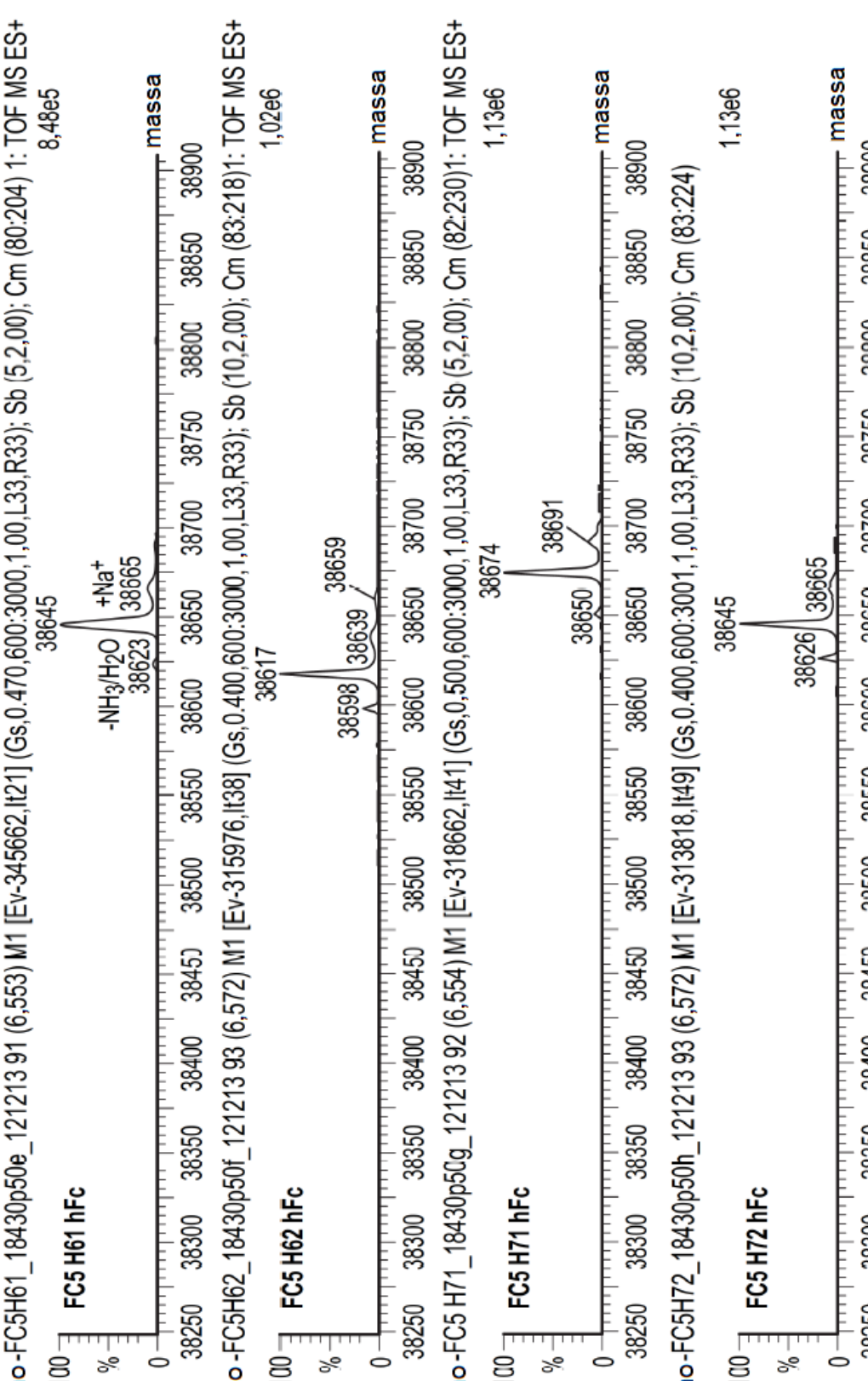

Vermelho -FC5H61_18430p50e_121213 91 (6,553) M1 [Ev-345662,It21] (Gs,0.470,600:3000,1,00,L33,R33); Sb (5,2,00); Cm (80:204) 1: TOF MS ES+
8,48e5
FC5 H61 hFc
38645
+Na+
38665
-NH3/H2O
38623
massa
Vermelho -FC5H62_18430p50f_121213 93 (6,572) M1 [Ev-315976,It38] (Gs,0.400,600:3000,1,00,L33,R33); Sb (10,2,00); Cm (83:218)1: TOF MS ES+
1,02e6
FC5 H62 hFc
38617
38659
38598
38639
massa
Vermelho -FC5 H71_18430p50g_121213 92 (6,554) M1 [Ev-318662,It41] (Gs,0,500,600:3000,1,00,L33,R33); Sb (5,2,00); Cm (82:230)1: TOF MS ES+
1,13e6
FC5 H71 hFc
38674
38691
38650
massa
Vermelho-FC5H72_18430p50h_121213 93 (6,572) M1 [Ev-313818,It49] (Gs,0.400,600:3001,1,00,L33,R33); Sb (10,2,00); Cm (83:224)
1,13e6
FC5 H72 hFc
38645
38626
38665
massa
100
%
0
38250
38300
38350
38400
38450
38500
38550
38600
38650
38700
38750
38800
38850
38900

FIG. 27 (Cont.)

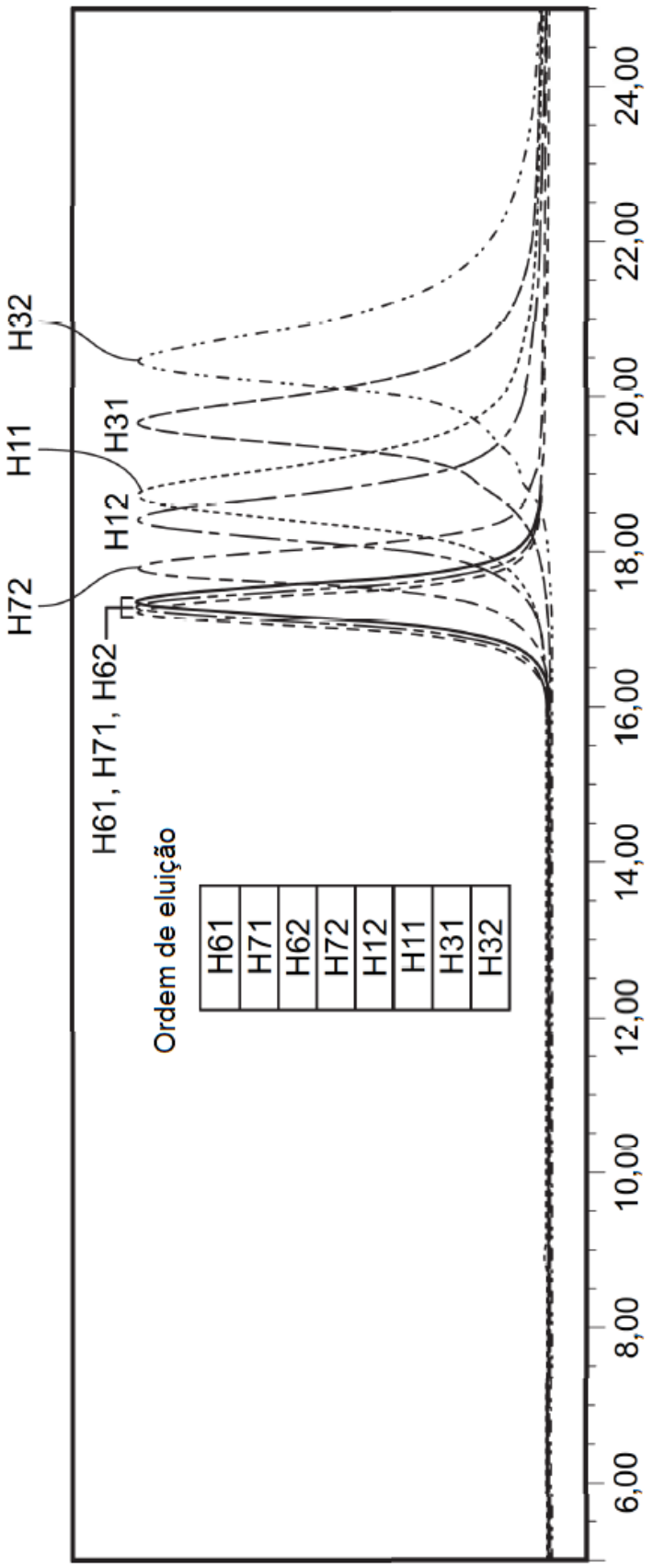

H32
H11
H31
H12
H72
H61, H71, H62
Ordem de eluição
H61
H71
H62
H72
H12
H11
H31
H32
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
16,00
18,00
20,00
22,00
24,00
Minutos

FIG. 28

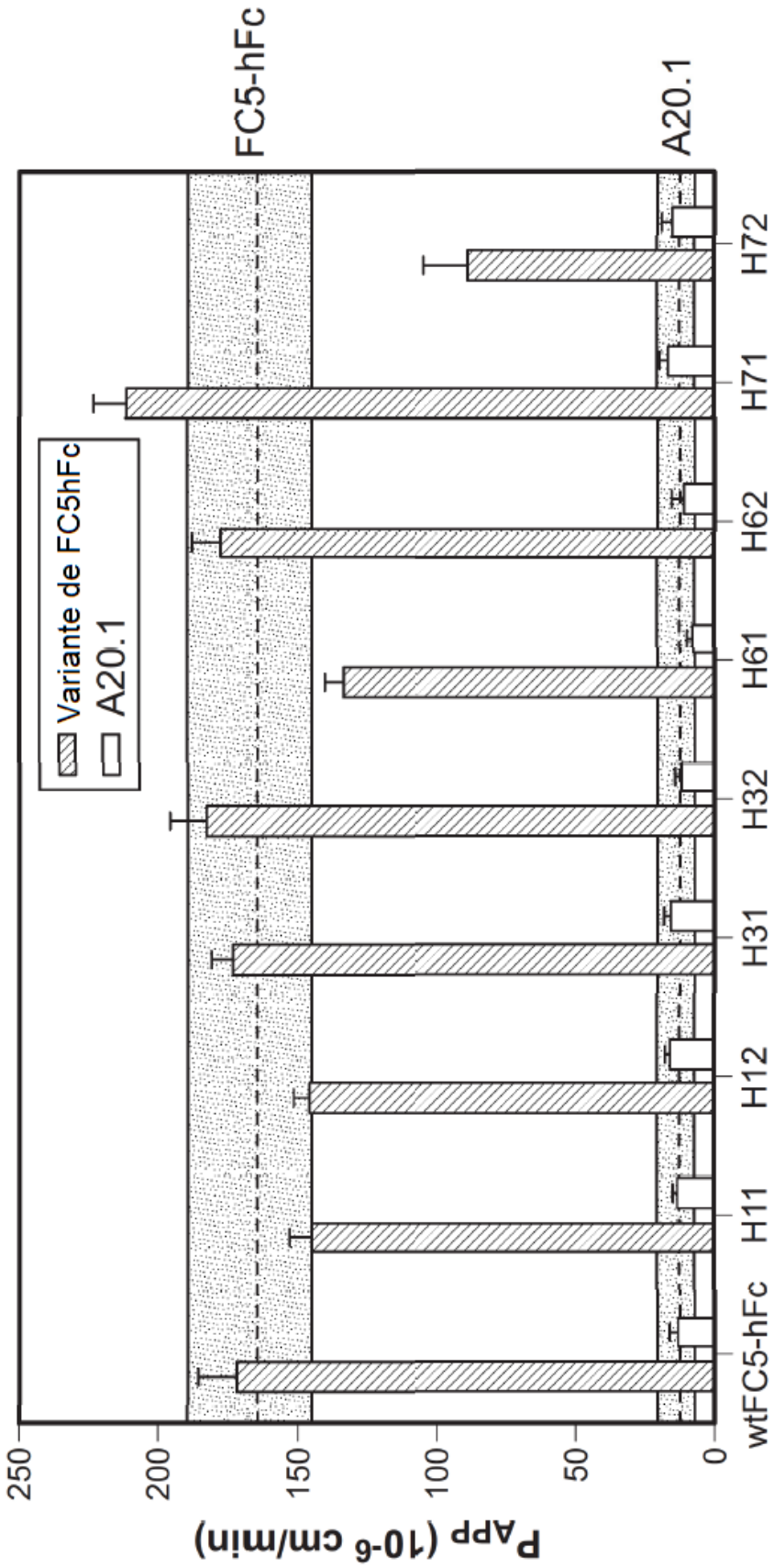

FC5-hFc
A20.1
Variante de FC5hFc
A20.1
P_{APP} (10^{-6} cm/min)
250
200
150
100
50
0
wtFC5-hFc
H11
H12
H31
H32
H61
H62
H71
H72

FIG. 29

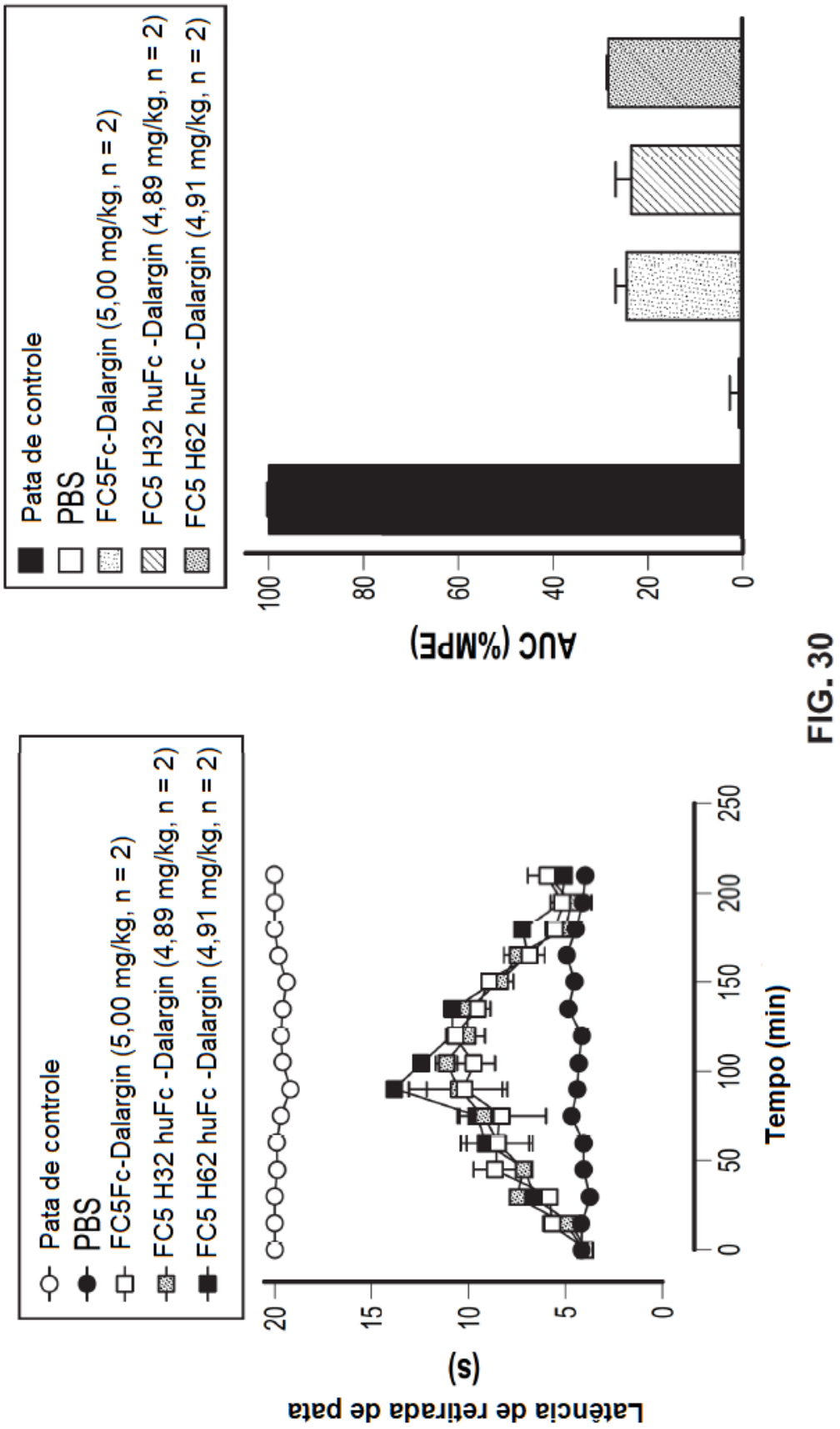

Pata de controle
PBS
FC5Fc-Dalargin (5,00 mg/kg, n = 2)
FC5 H32 huFc -Dalargin (4,89 mg/kg, n = 2)
FC5 H62 huFc -Dalargin (4,91 mg/kg, n = 2)
AUC (%MPE)
0
20
40
60
80
100
Pata de controle
PBS
FC5Fc-Dalargin (5,00 mg/kg, n = 2)
FC5 H32 huFc -Dalargin (4,89 mg/kg, n = 2)
FC5 H62 huFc -Dalargin (4,91 mg/kg, n = 2)
Latência de retirada de pata (s)
0
5
10
15
20
Tempo (min)
0
50
100
150
200
250

FIG. 30

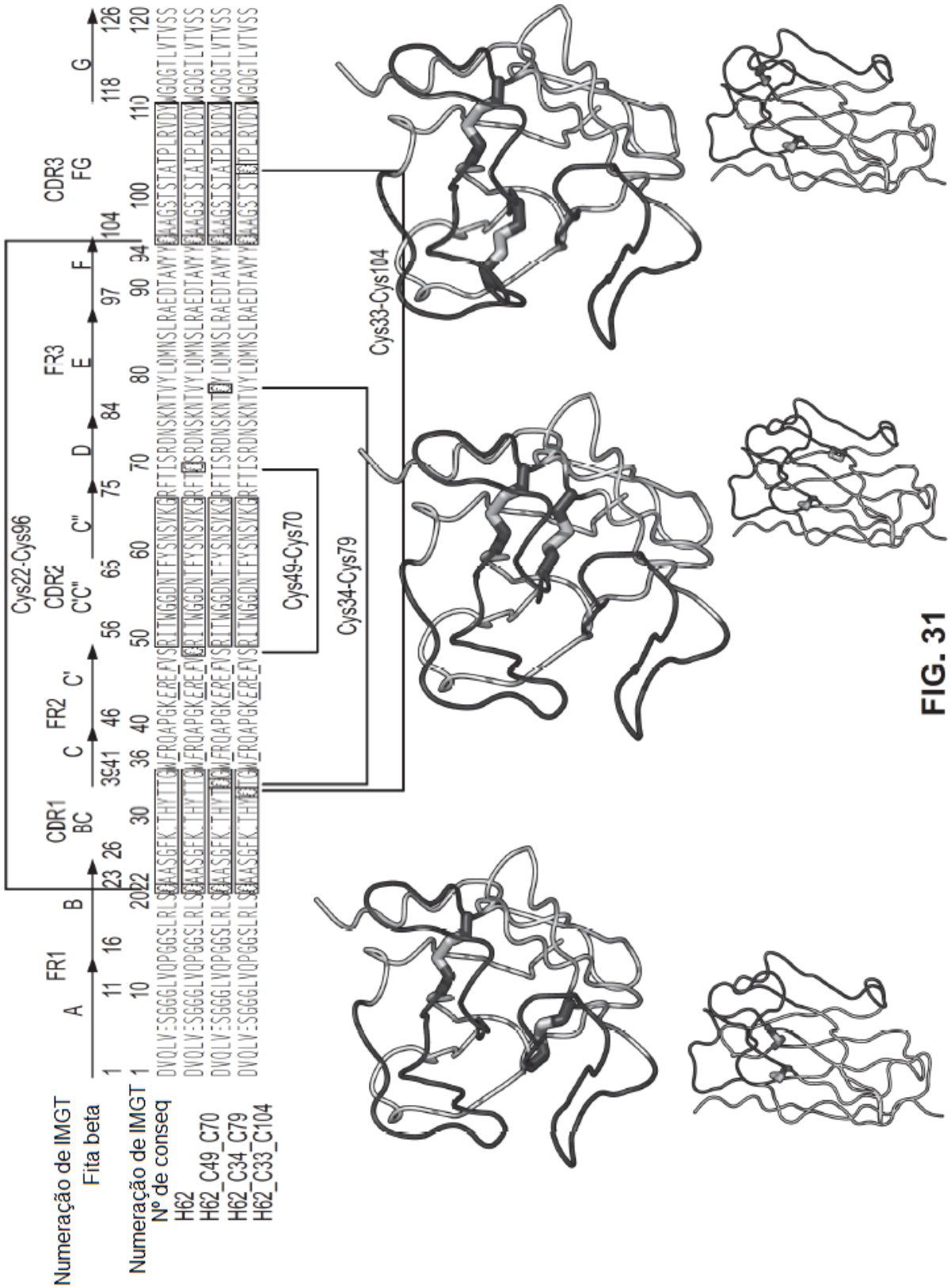

Numeração de IMGT
Fita beta
Numeração de IMGT
Nº de conseq
H62
H62_C49_C70
H62_C34_C79
H62_C33_C104
FR1
CDR1
FR2
CDR2
FR3
CDR3
Cys22-Cys96
Cys49-Cys70
Cys34-Cys79
Cys33-Cys104

FIG. 31

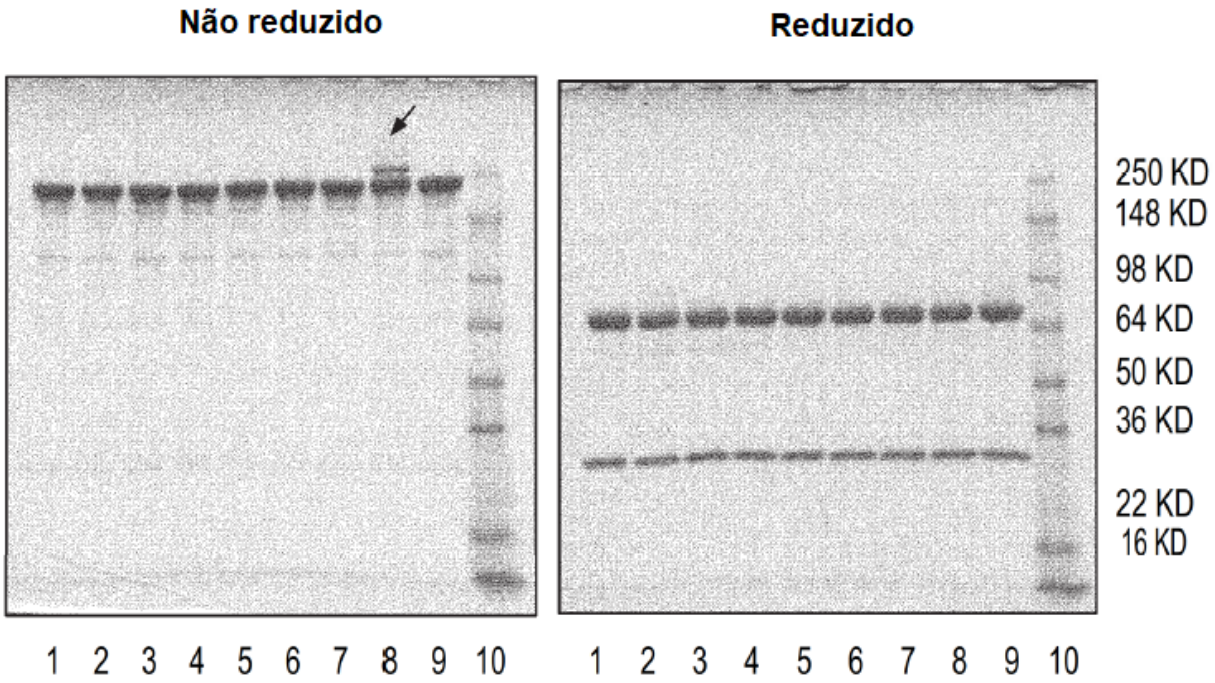

Não reduzido
Reduzido
250 KD
148 KD
98 KD
64 KD
50 KD
36 KD
22 KD
16 KD
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FIG. 32

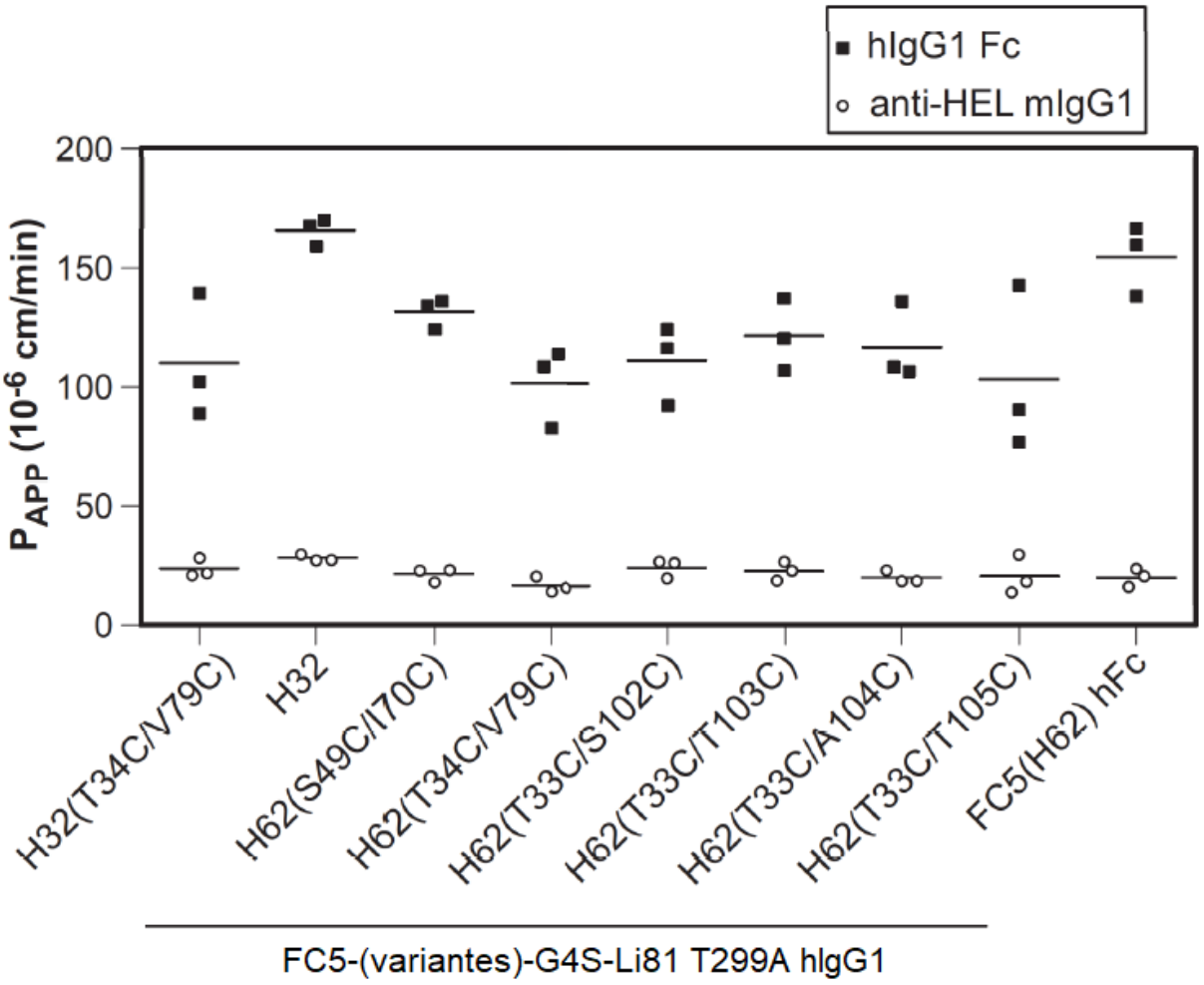

hIgG1 Fc
anti-HEL mIgG1
200
150
100
50
0
P_{APP} (10^{-6} cm/min)
H32(T34C/V79C)
H32
H62(S49C/I70C)
H62(T34C/V79C)
H62(T33C/S102C)
H62(T33C/T103C)
H62(T33C/A104C)
H62(T33C/T105C)
FC5(H62) hFc
FC5-(variantes)-G4S-Li81 T299A hIgG1

FIG. 33

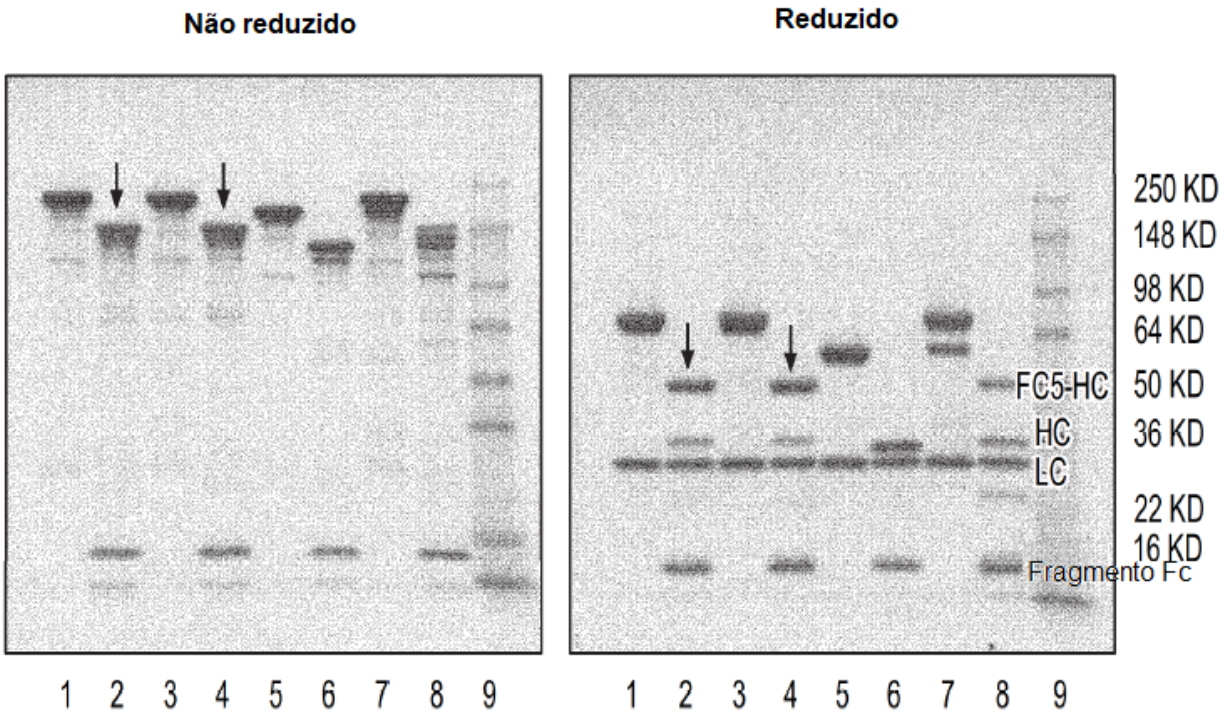

Não reduzido
Reduzido
250 KD
148 KD
98 KD
64 KD
50 KD
36 KD
22 KD
16 KD
FC5-HC
HC
LC
Fragmento Fc
1 2 3 4 5 6 7 8 9
1 2 3 4 5 6 7 8 9

FIG. 34

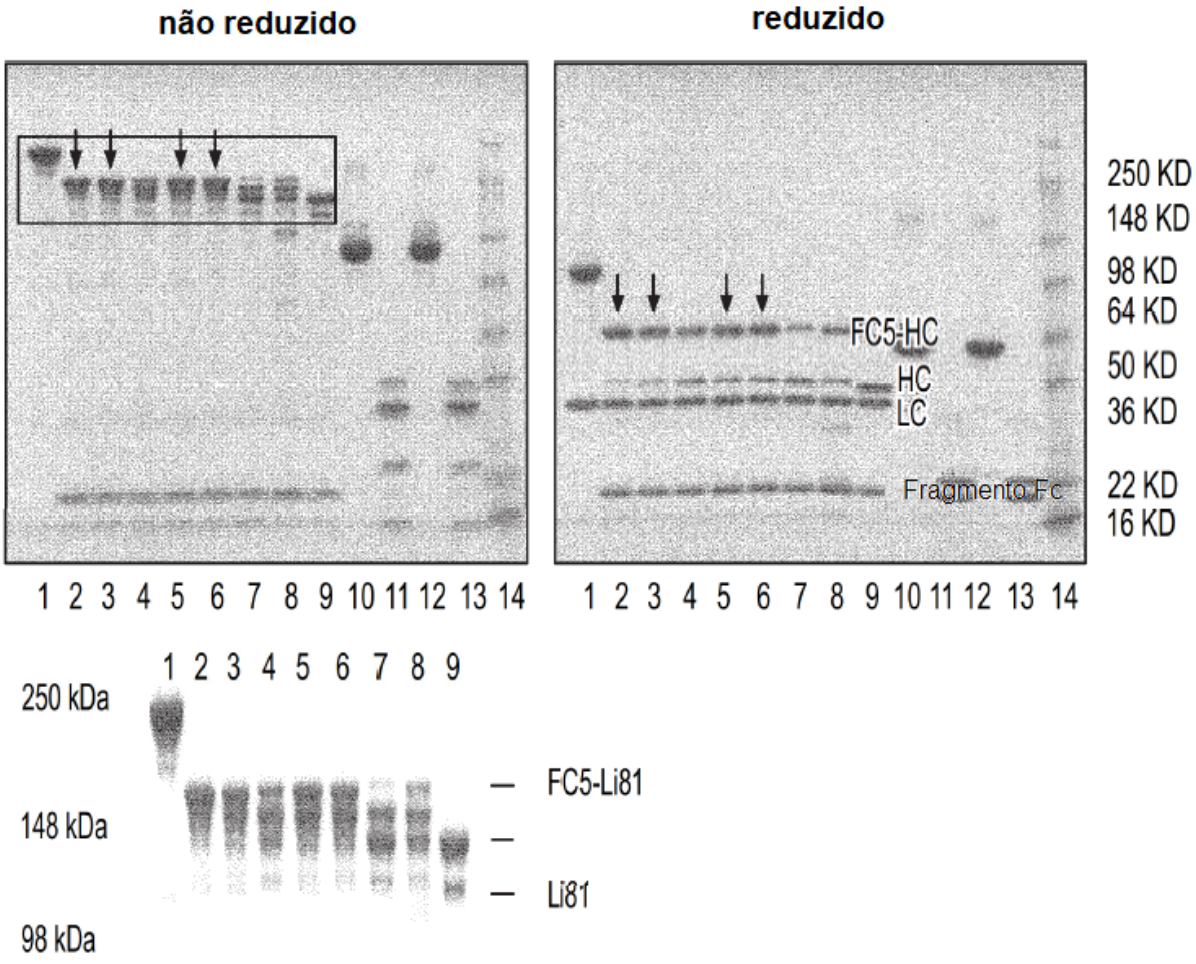

não reduzido
reduzido
250 KD
148 KD
98 KD
64 KD
50 KD
36 KD
22 KD
16 KD
FC5-HC
HC
LC
Fragmento Fc
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
1 2 3 4 5 6 7 8 9
250 kDa
148 kDa
98 kDa
FC5-Li81
Li81

FIG. 35

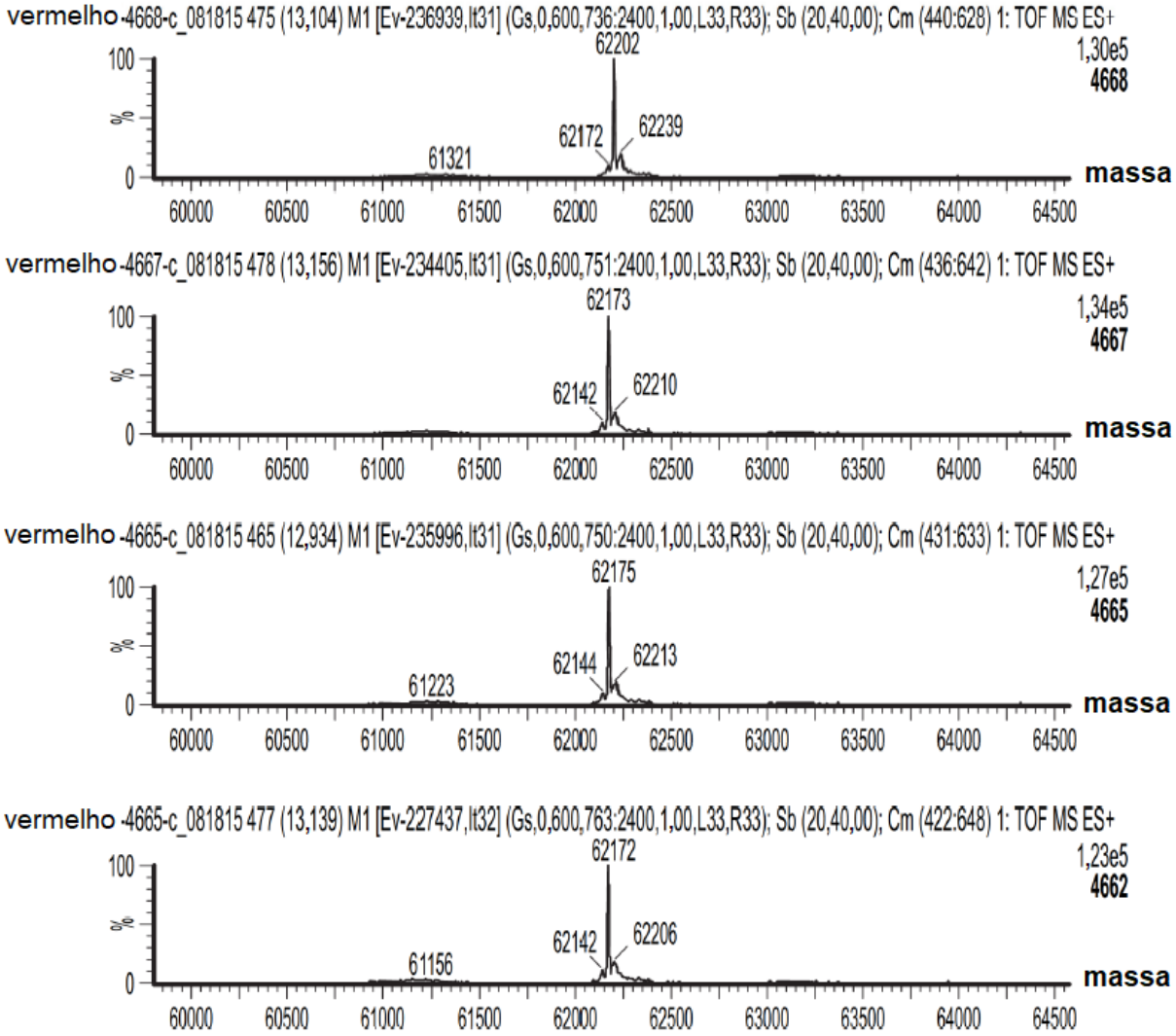

vermelho-4668-c_081815 475 (13,104) M1 [Ev-236939,It31] (Gs,0,600,736:2400,1,00,L33,R33); Sb (20,40,00); Cm (440:628) 1: TOF MS ES+
62202
1,30e5
4668
100
%
0
61321
62172
62239
massa
60000 60500 61000 61500 62000 62500 63000 63500 64000 64500
vermelho-4667-c_081815 478 (13,156) M1 [Ev-234405,It31] (Gs,0,600,751:2400,1,00,L33,R33); Sb (20,40,00); Cm (436:642) 1: TOF MS ES+
62173
1,34e5
4667
100
%
0
62142
62210
massa
60000 60500 61000 61500 62000 62500 63000 63500 64000 64500
vermelho-4665-c_081815 465 (12,934) M1 [Ev-235996,It31] (Gs,0,600,750:2400,1,00,L33,R33); Sb (20,40,00); Cm (431:633) 1: TOF MS ES+
62175
1,27e5
4665
100
%
0
61223
62144
62213
massa
60000 60500 61000 61500 62000 62500 63000 63500 64000 64500
vermelho-4665-c_081815 477 (13,139) M1 [Ev-227437,It32] (Gs,0,600,763:2400,1,00,L33,R33); Sb (20,40,00); Cm (422:648) 1: TOF MS ES+
62172
1,23e5
4662
100
%
0
61156
62142
62206
massa
60000 60500 61000 61500 62000 62500 63000 63500 64000 64500

FIG. 36

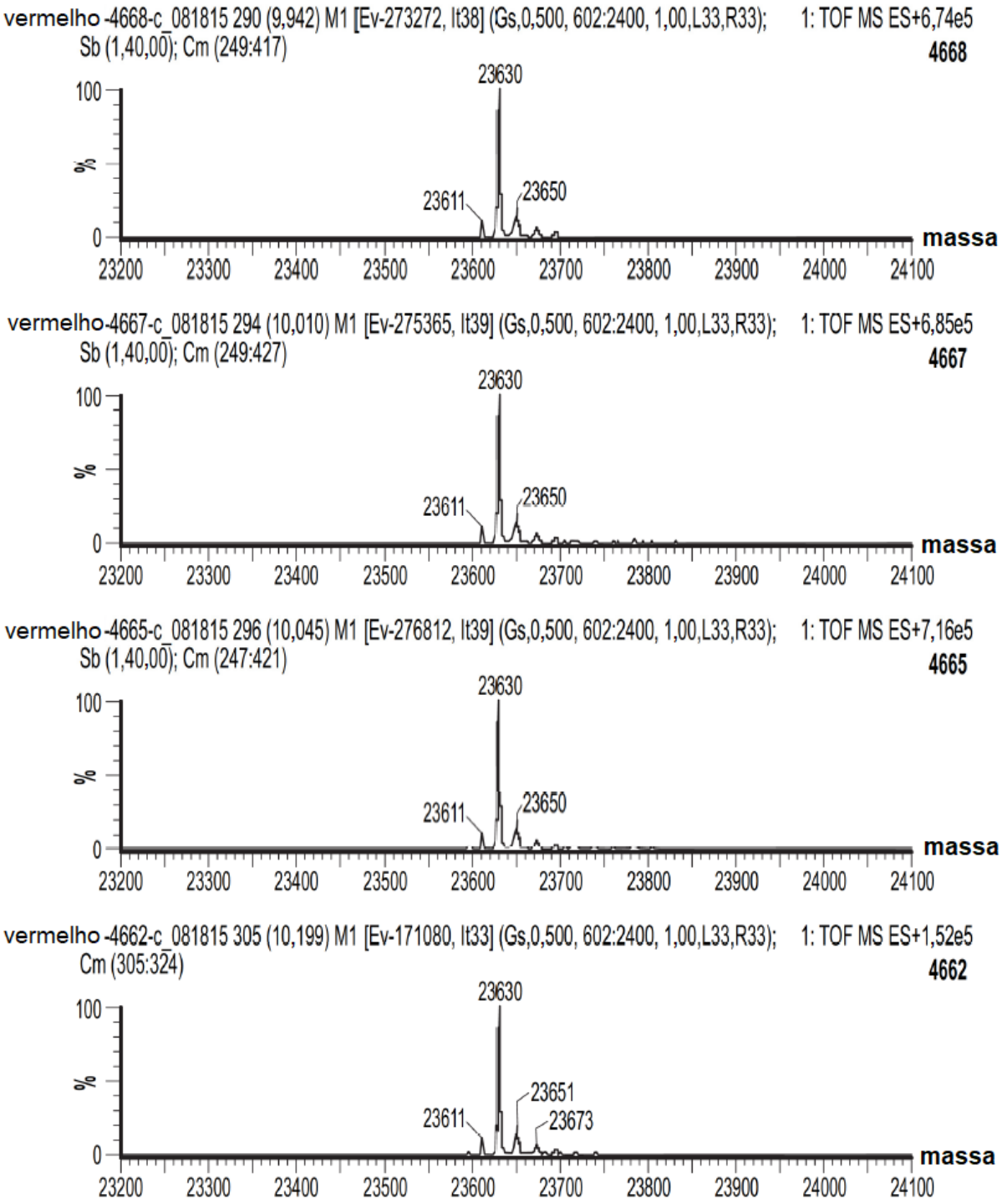
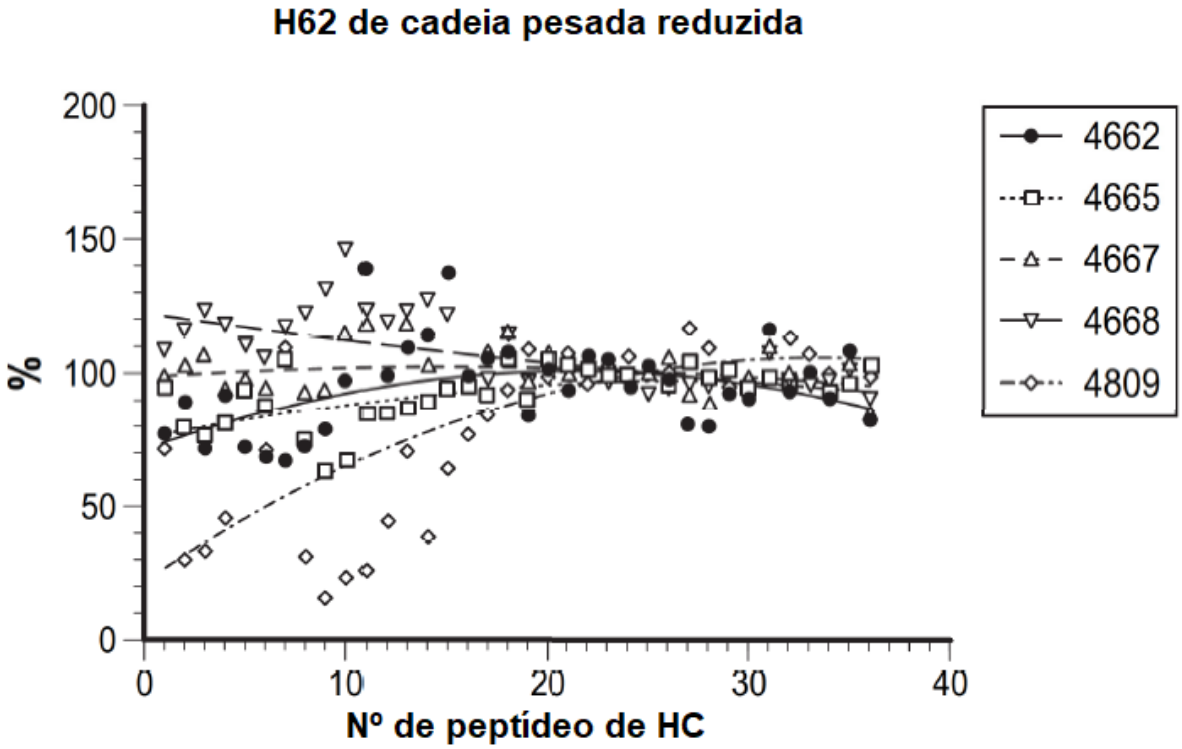

vermelho-4668-c_081815 290 (9,942) M1 [Ev-273272, It38] (Gs,0,500, 602:2400, 1,00,L33,R33); Sb (1,40,00); Cm (249:417)
1: TOF MS ES+6,74e5
4668
23630
23611
23650
100
%
0
massa
23200 23300 23400 23500 23600 23700 23800 23900 24000 24100
vermelho-4667-c_081815 294 (10,010) M1 [Ev-275365, It39] (Gs,0,500, 602:2400, 1,00,L33,R33); Sb (1,40,00); Cm (249:427)
1: TOF MS ES+6,85e5
4667
23630
23611
23650
100
%
0
massa
23200 23300 23400 23500 23600 23700 23800 23900 24000 24100
vermelho-4665-c_081815 296 (10,045) M1 [Ev-276812, It39] (Gs,0,500, 602:2400, 1,00,L33,R33); Sb (1,40,00); Cm (247:421)
1: TOF MS ES+7,16e5
4665
23630
23611
23650
100
%
0
massa
23200 23300 23400 23500 23600 23700 23800 23900 24000 24100
vermelho-4662-c_081815 305 (10,199) M1 [Ev-171080, It33] (Gs,0,500, 602:2400, 1,00,L33,R33); Cm (305:324)
1: TOF MS ES+1,52e5
4662
23630
23651
23611
23673
100
%
0
massa
23200 23300 23400 23500 23600 23700 23800 23900 24000 24100

FIG. 37


H62 de cadeia pesada reduzida
200
150
100
50
0
%
0
10
20
30
40
Nº de peptídeo de HC
4662
4665
4667
4668
4809

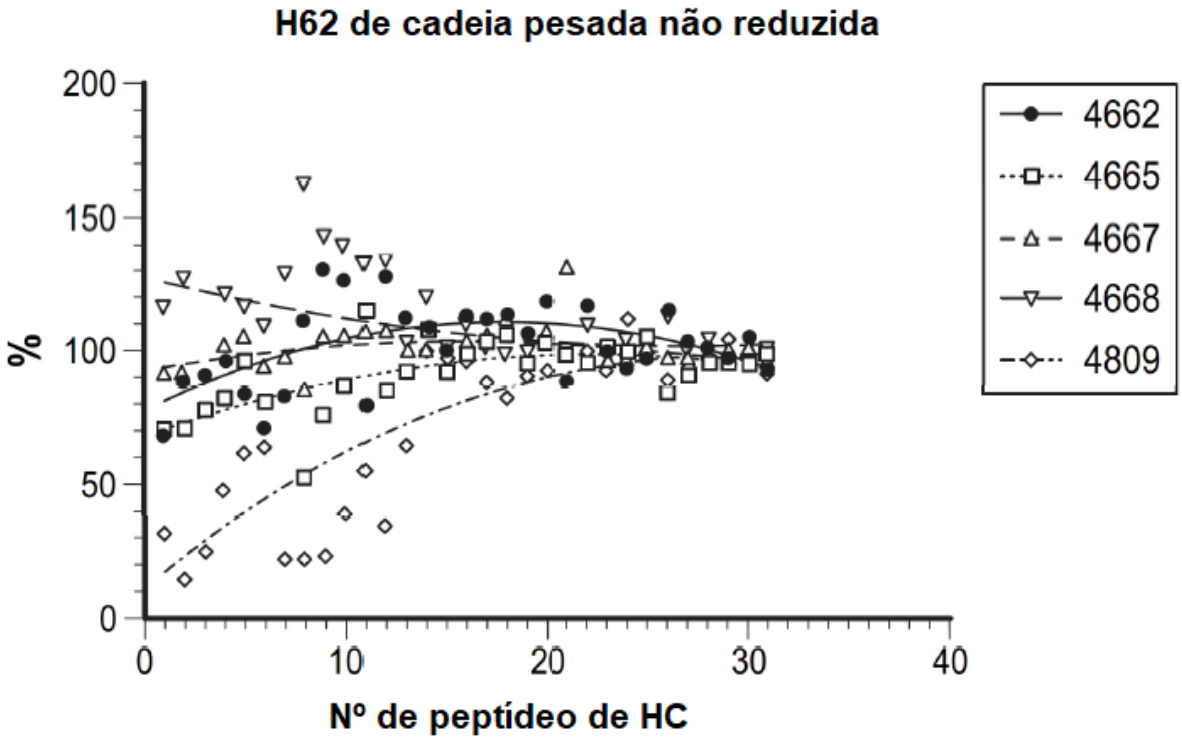

H62 de cadeia pesada não reduzida
200
150
100
50
0
%
0
10
20
30
40
Nº de peptídeo de HC
4662
4665
4667
4668
4809

FIG. 38

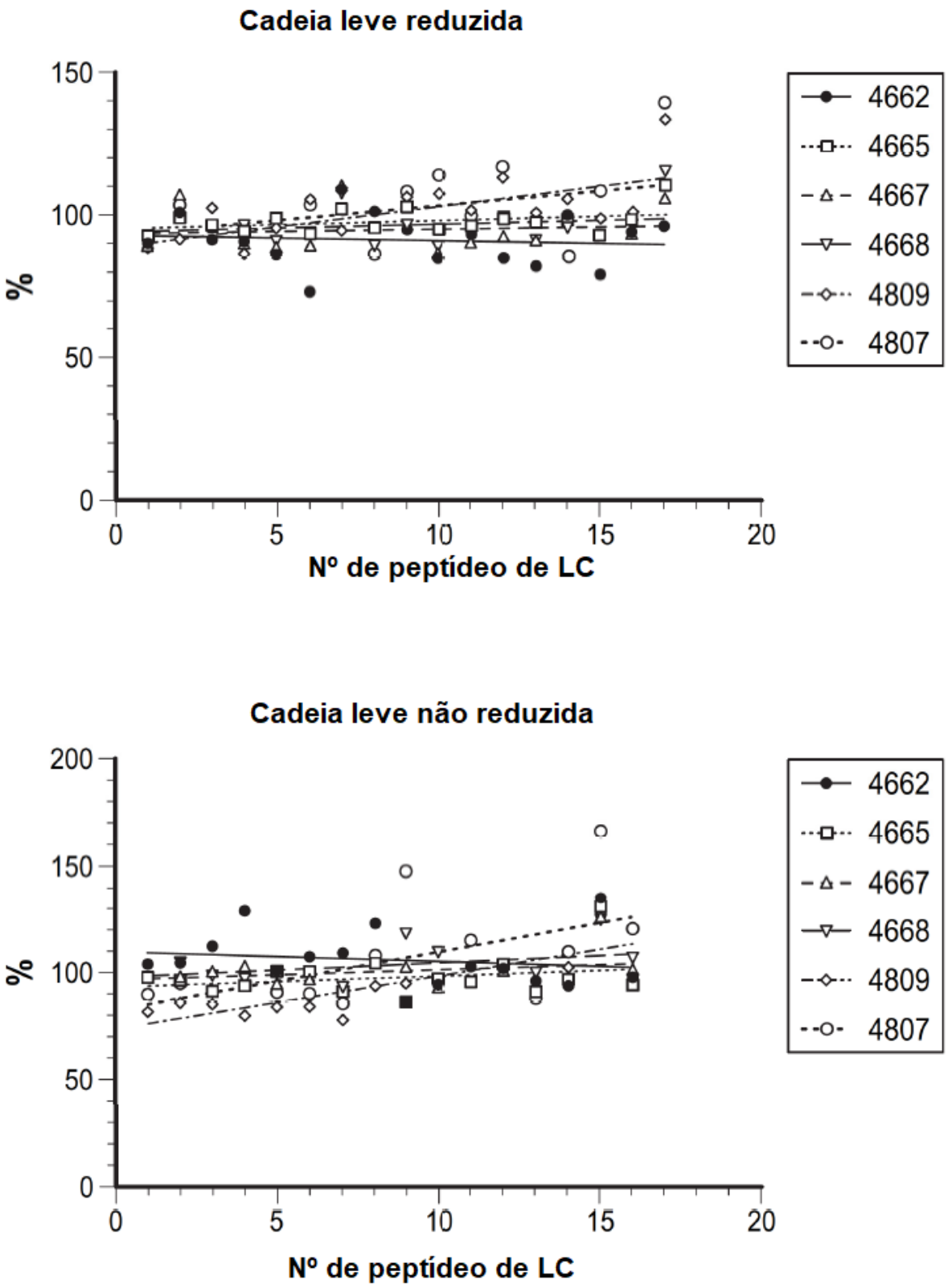

Cadeia leve reduzida
150
100
50
0
%
0
5
10
15
20
Nº de peptídeo de LC
4662
4665
4667
4668
4809
4807
Cadeia leve não reduzida
200
150
100
50
0
%
0
5
10
15
20
Nº de peptídeo de LC
4662
4665
4667
4668
4809
4807

FIG. 39

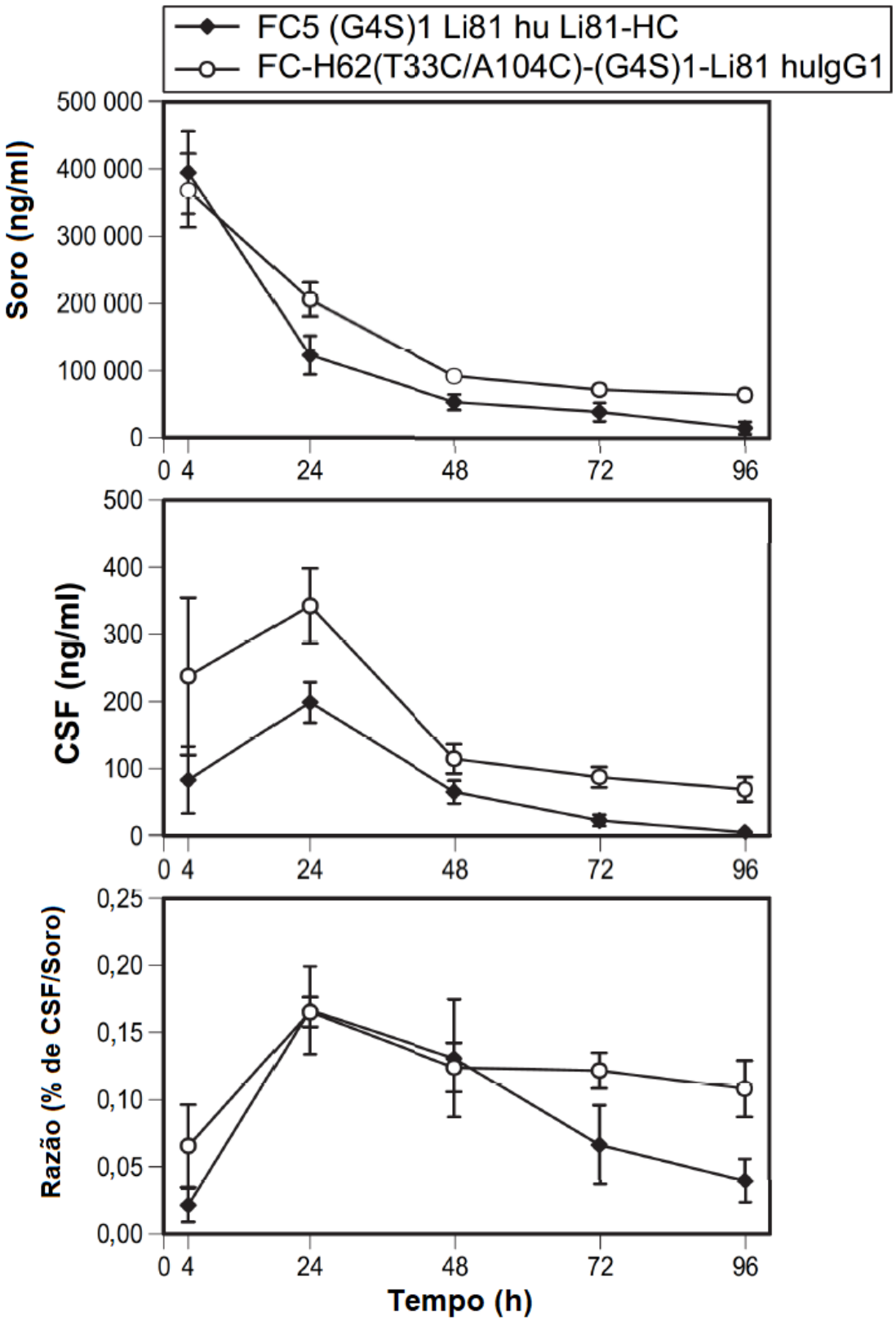

FC5 (G4S)1 Li81 hu Li81-HC
FC-H62(T33C/A104C)-(G4S)1-Li81 hulgG1
Soro (ng/ml)
500 000
400 000
300 000
200 000
100 000
0
CSF (ng/ml)
500
400
300
200
100
0
Razão (% de CSF/Soro)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0 4 24 48 72 96
Tempo (h)

FIG. 40

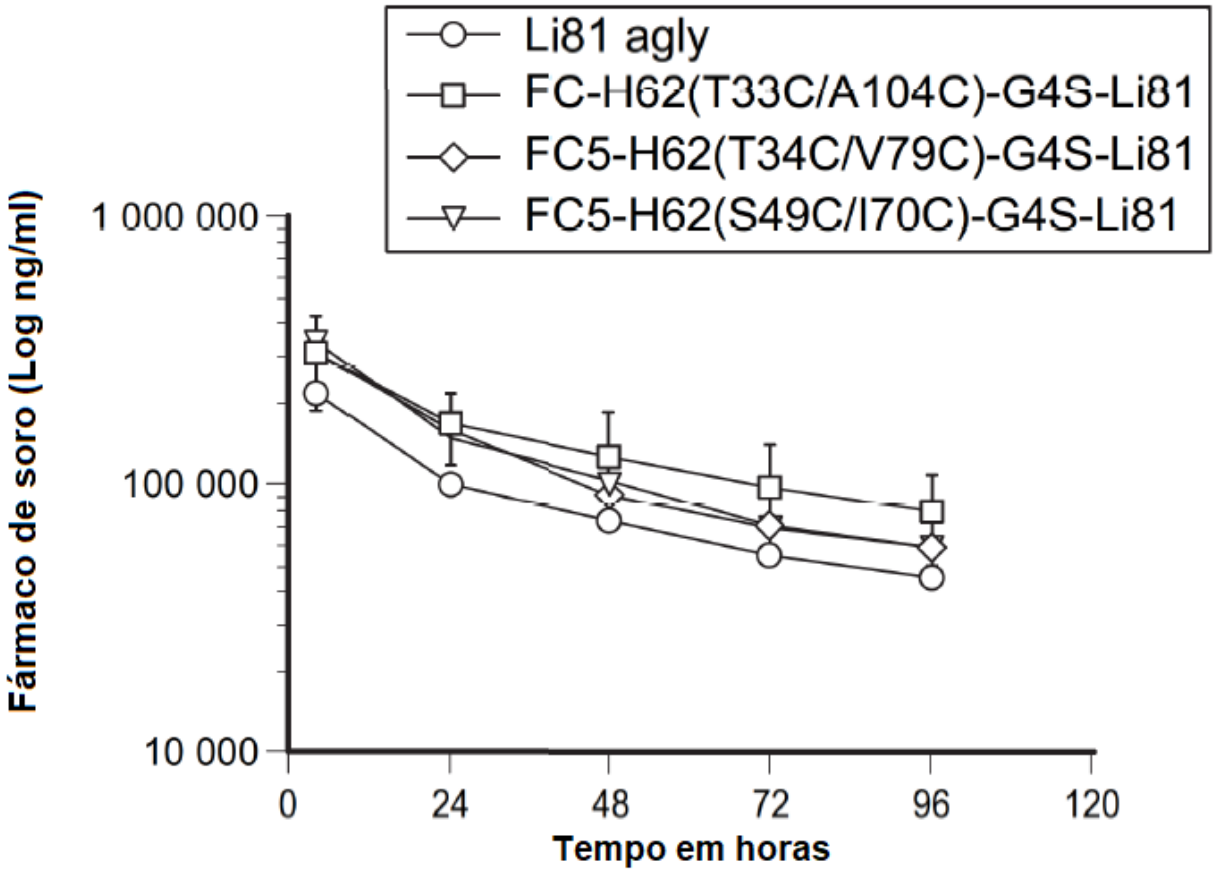

Li81 agly
FC-H62(T33C/A104C)-G4S-Li81
FC5-H62(T34C/V79C)-G4S-Li81
FC5-H62(S49C/I70C)-G4S-Li81
Fármaco de soro (Log ng/ml)
1 000 000
100 000
10 000
0
24
48
72
96
120
Tempo em horas

FIG. 41

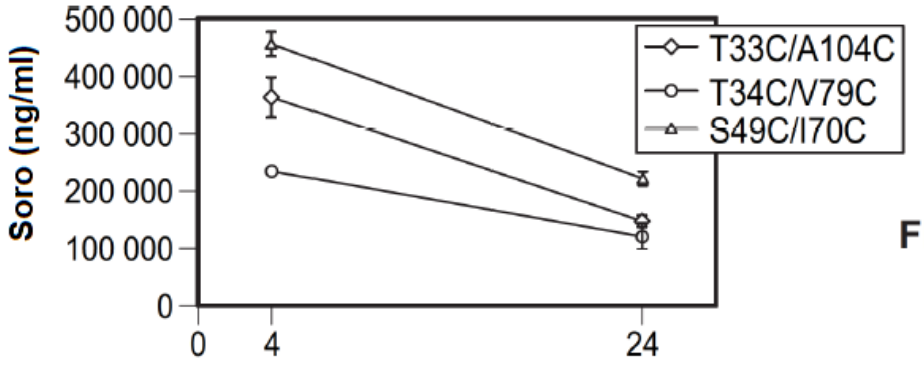


FIG. 42A

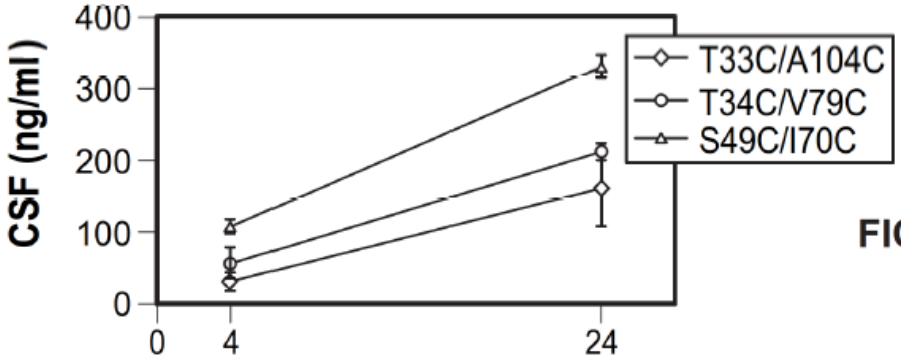


FIG. 42B

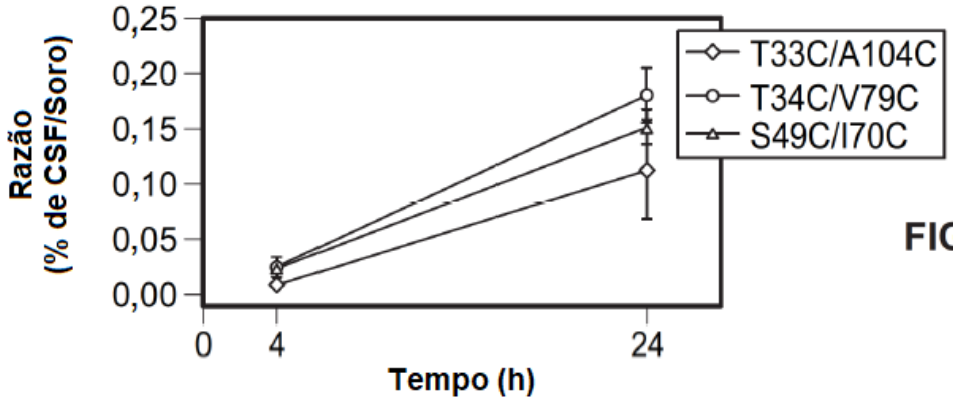


FIG. 42C

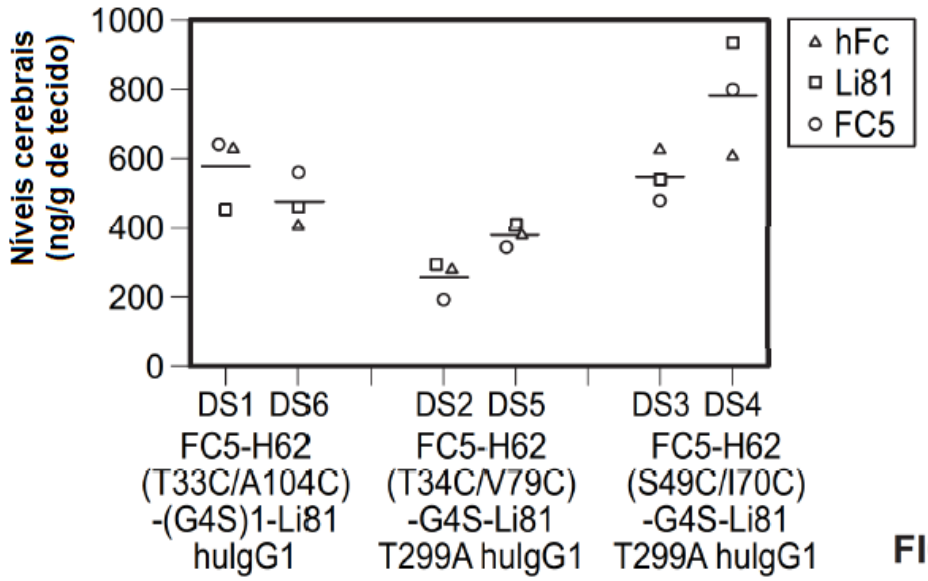


FIG. 42D

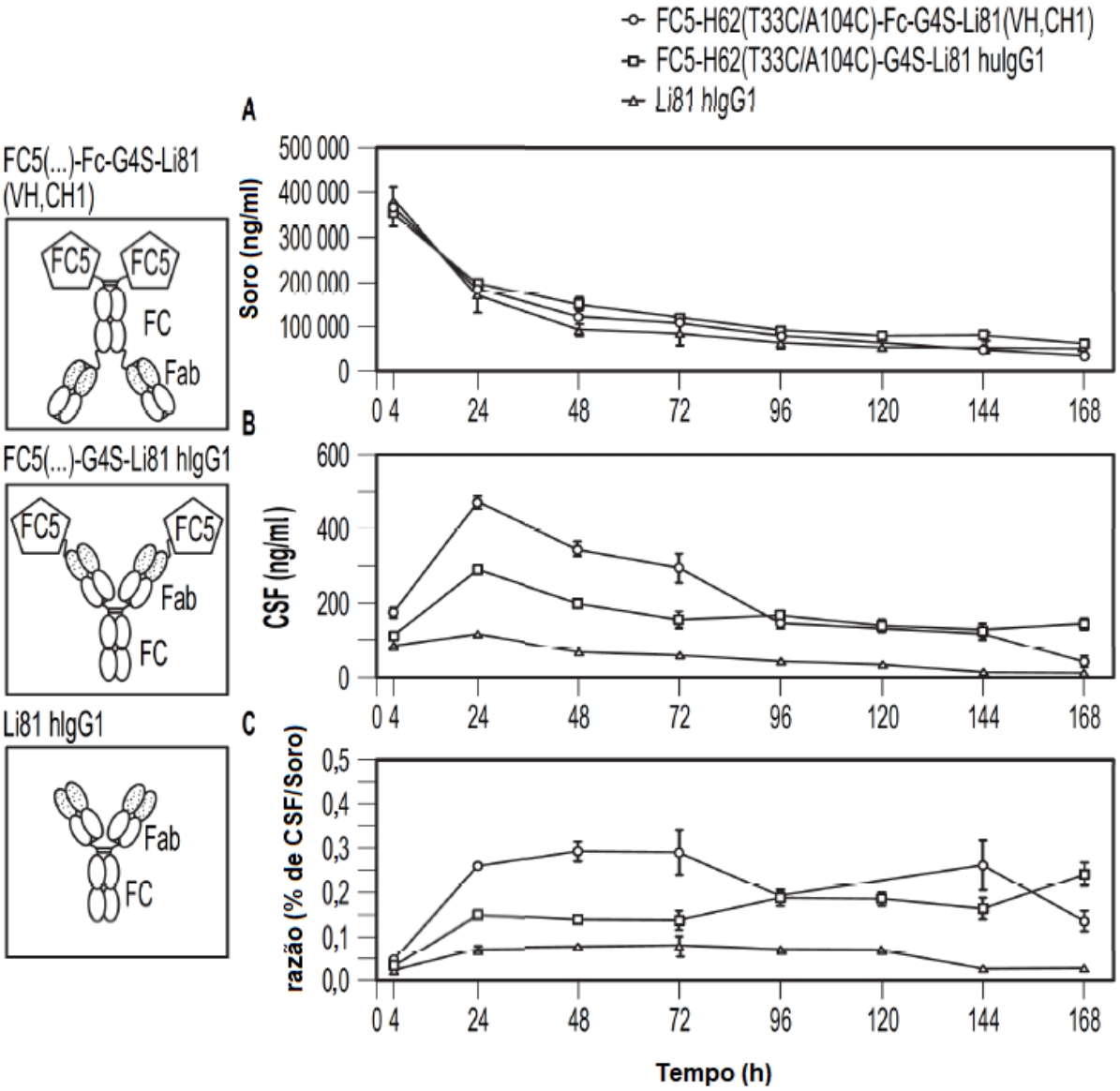

FC5-H62(T33C/A104C)-Fc-G4S-Li81(VH,CH1)
FC5-H62(T33C/A104C)-G4S-Li81 hulgG1
Li81 hlgG1
A
B
C
FC5(...)-Fc-G4S-Li81 (VH,CH1)
FC5
FC5
FC
Fab
FC5(...)-G4S-Li81 hlgG1
FC5
FC5
Fab
FC
Li81 hlgG1
Fab
FC
Soro (ng/ml)
500 000
400 000
300 000
200 000
100 000
0
CSF (ng/ml)
600
400
200
0
razão (% de CSF/Soro)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0 4 24 48 72 96 120 144 168
Tempo (h)

FIG. 43

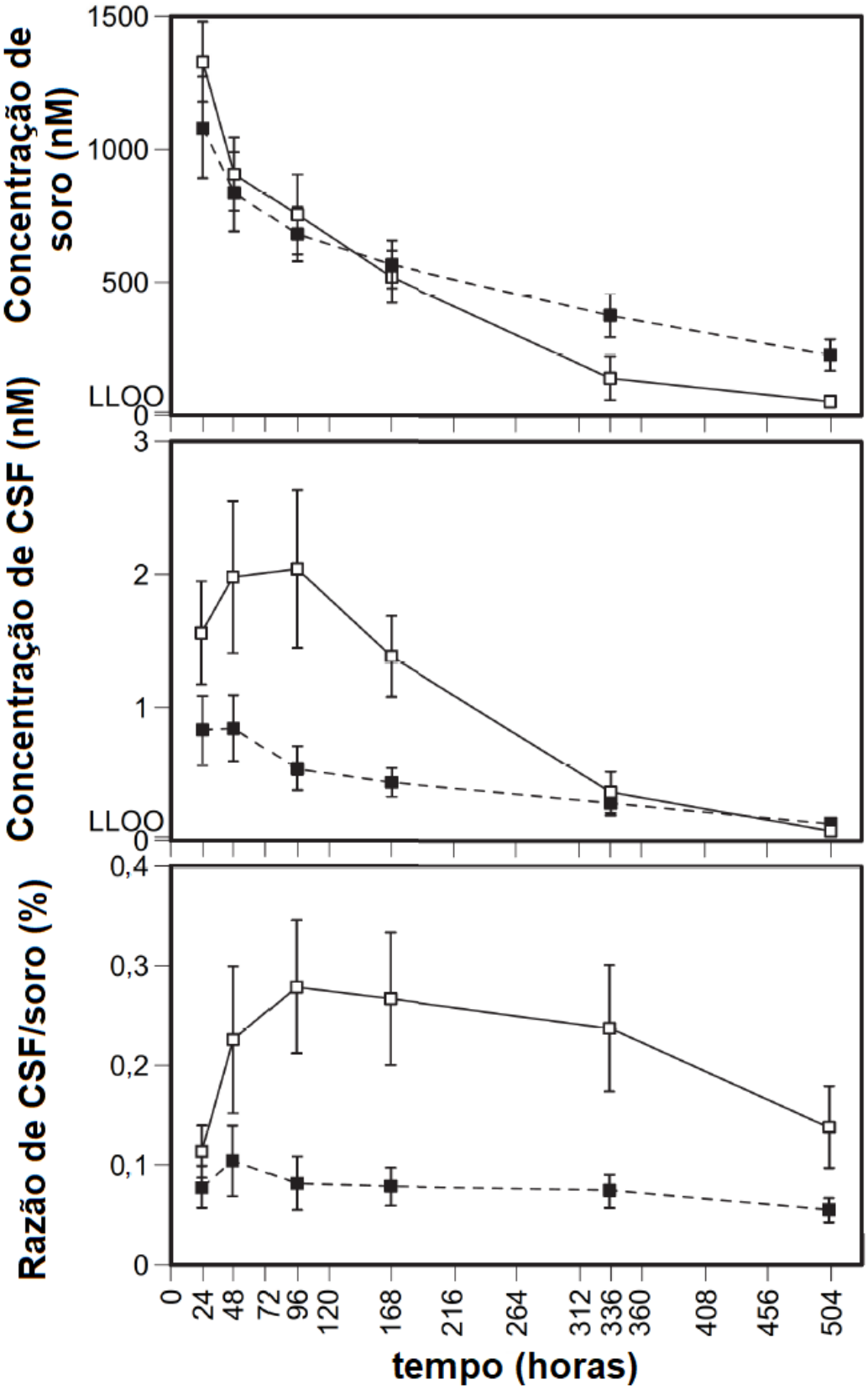

Concentração de soro (nM)
1500
1000
500
LLOQ
0
Concentração de CSF (nM)
3
2
1
LLOQ
0
Razão de CSF/soro (%)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
24
48
72
96
120
168
216
264
312
336
360
408
456
504
tempo (horas)

FIG. 44

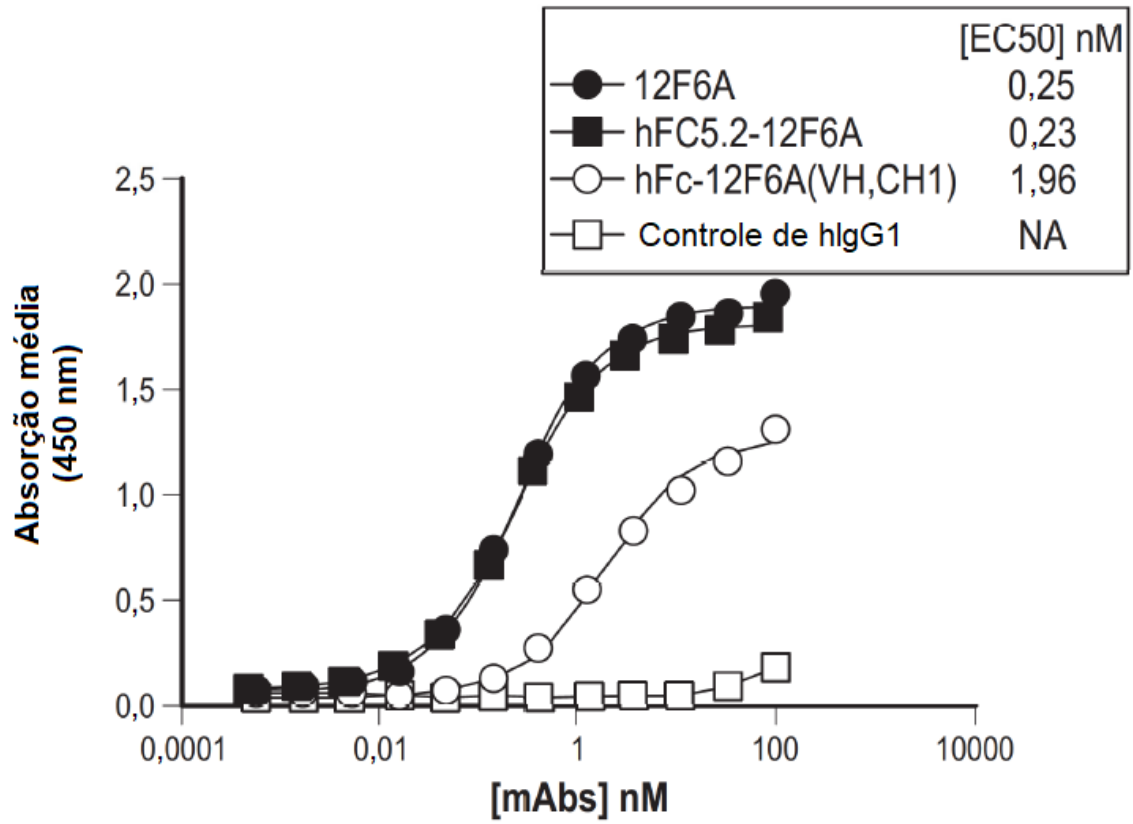


FIG. 45A

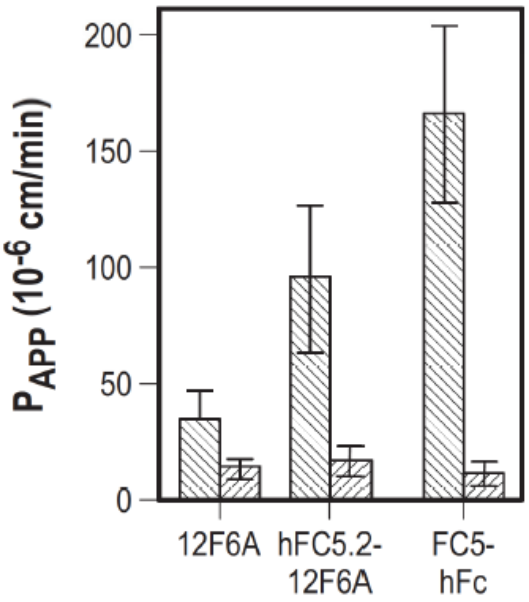


FIG. 45B

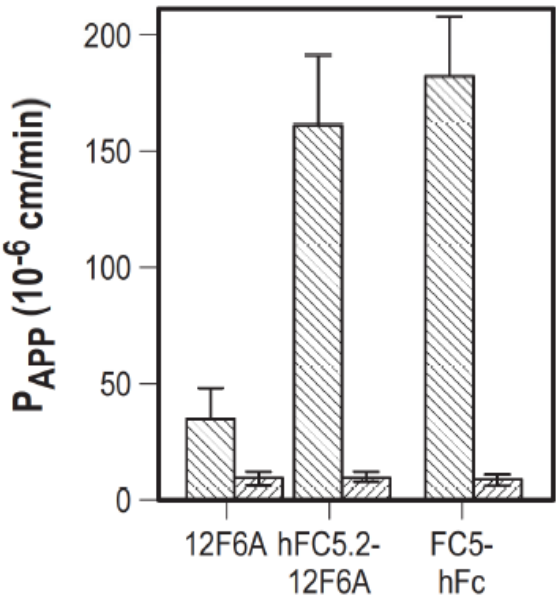


FIG. 45C

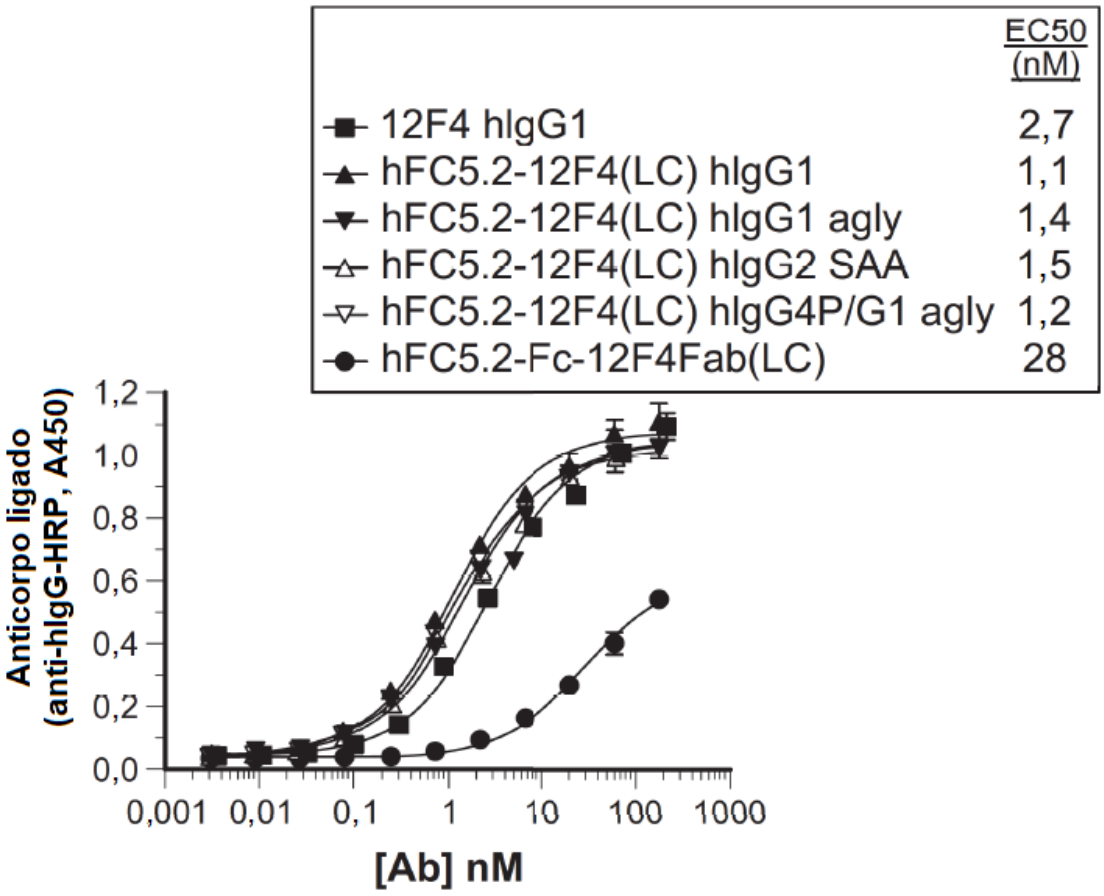


FIG. 46A

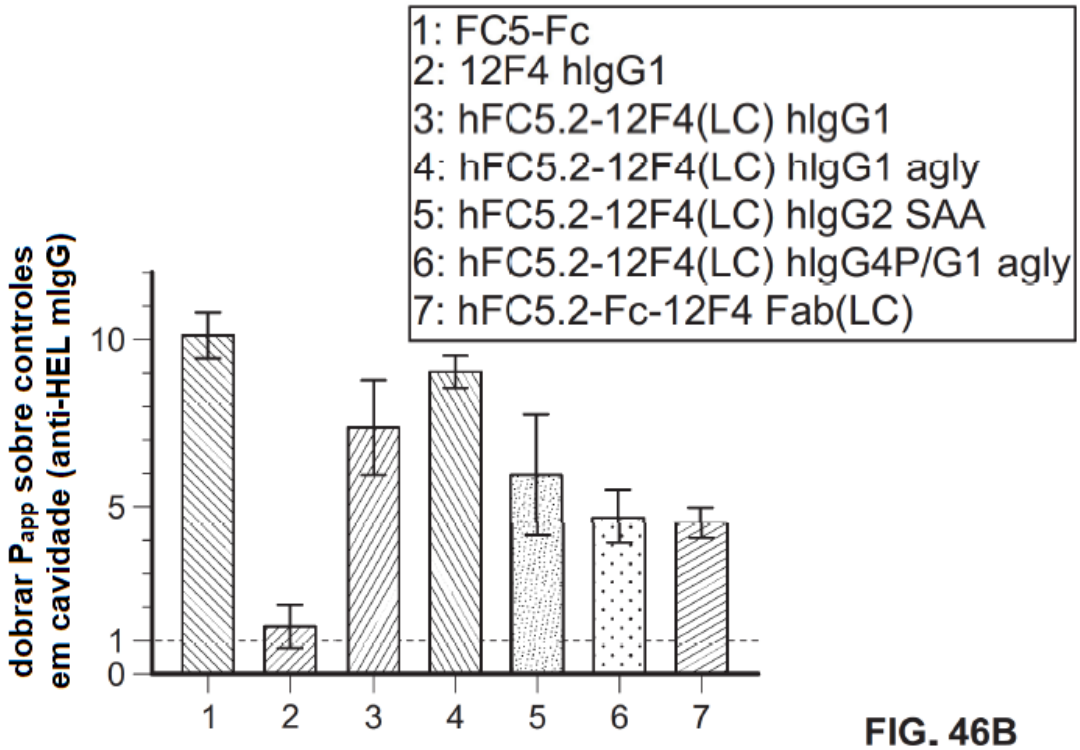


FIG. 46B

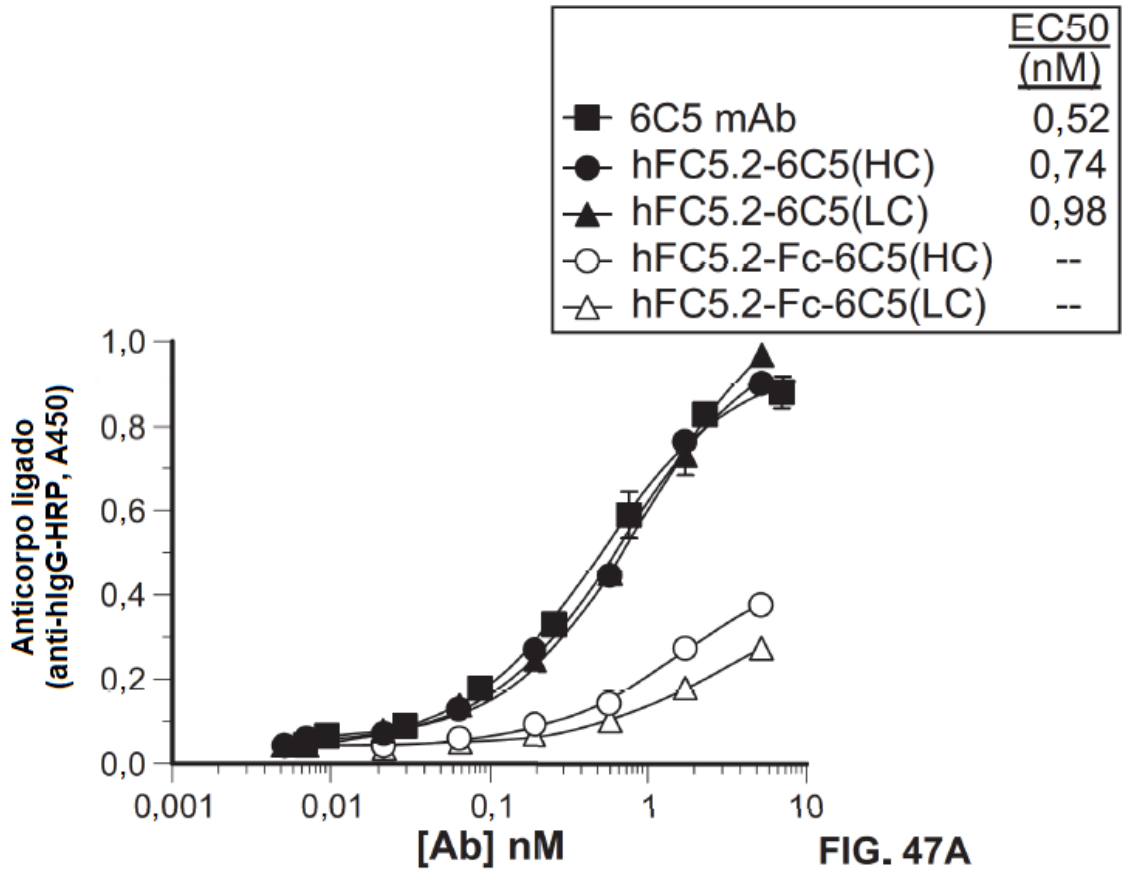


FIG. 47A

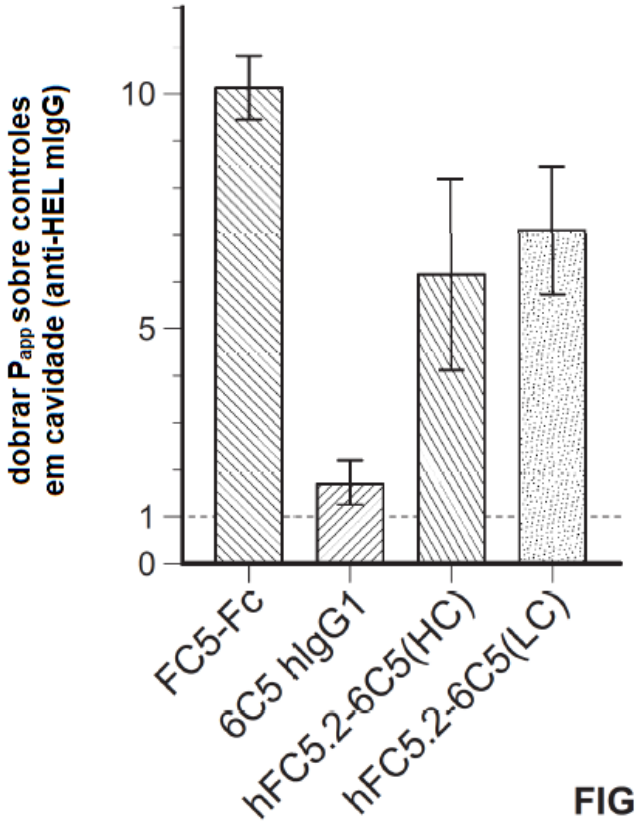
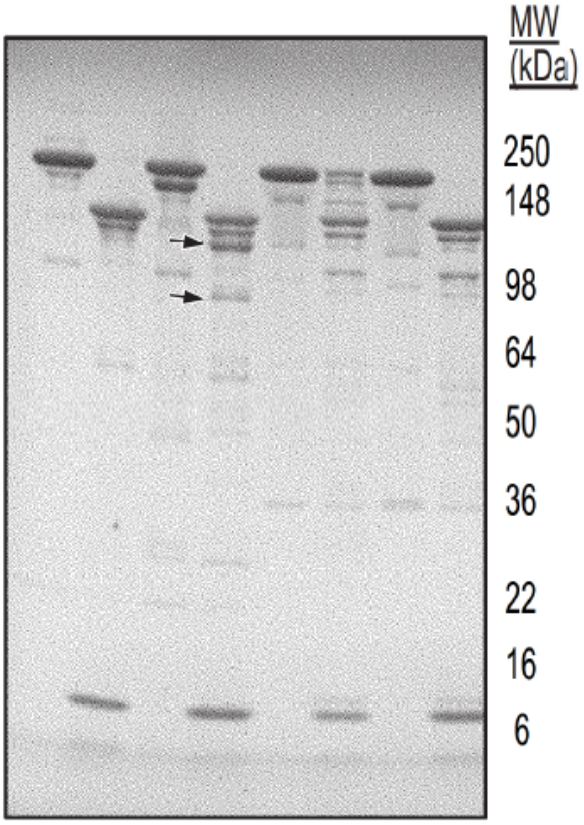
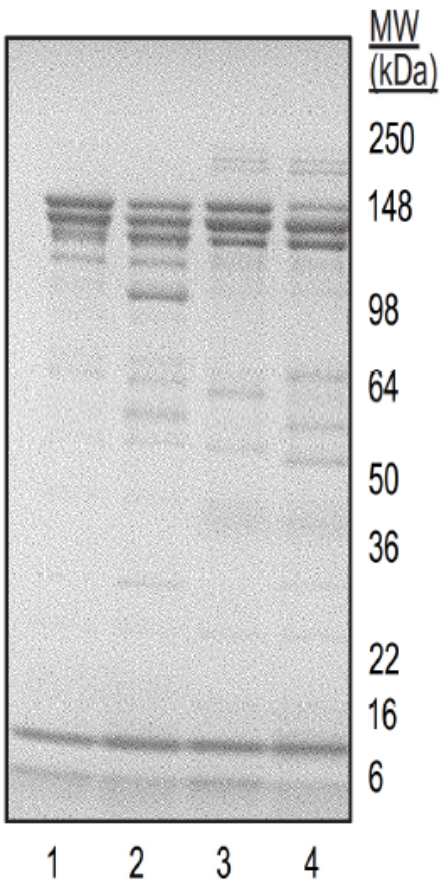


FIG. 47B



1: FC5-H62(T33C/A104C)-Li81 hIgG1 agly
2: +Pepsina
3: FC5-H32-Li81 hIgG1 agly
4: +Pepsina
5: FC5-H62(T33C/A104C)-12F4 (LC) hIgG1
6: +Pepsina
7: FC5-H62(T33C/A104C)-12F4 (LC) hIgG1 agly
8: +Pepsina



1: FC5-H62(T33C/A104C)-Li81 hIgG1 agly
2: FC5-H32-Li81 hIgG1 agly
3: FC5-H62(T33C/A104C)-12F6A hIgG1
4: FC5-H32-12F6A hIgG1

(+Pepsina em todos)

FIG. 48

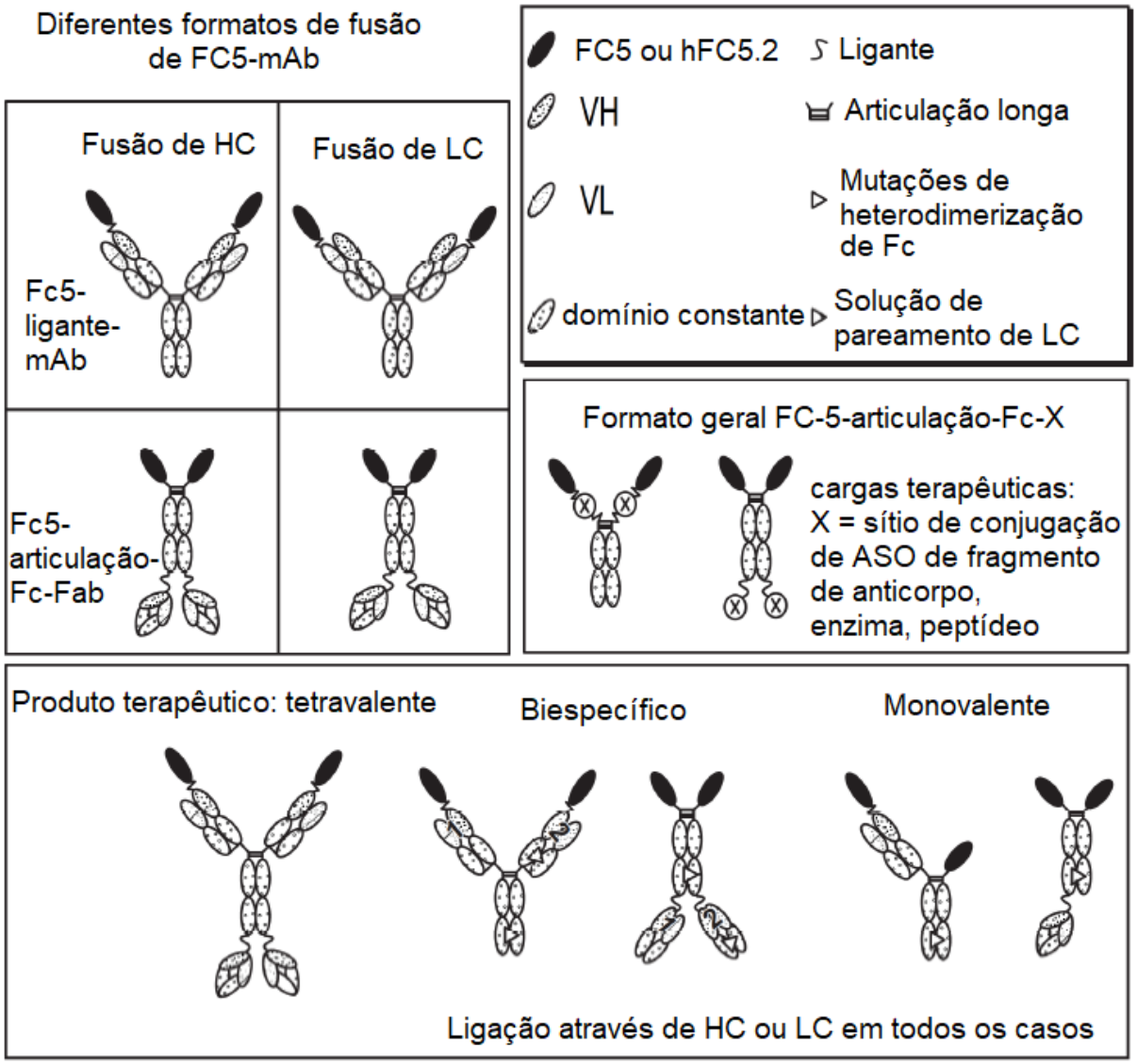

Diferentes formatos de fusão de FC5-mAb
Fusão de HC
Fusão de LC
Fc5-ligante-mAb
Fc5-articulação-Fc-Fab
FC5 ou hFC5.2
Ligante
VH
Articulação longa
VL
Mutações de heterodimerização de Fc
domínio constante
Solução de pareamento de LC
Formato geral FC-5-articulação-Fc-X
cargas terapêuticas:
X = sítio de conjugação de ASO de fragmento de anticorpo, enzima, peptídeo
Produto terapêutico: tetravalente
Biespecífico
Monovalente
Ligação através de HC ou LC em todos os casos

FIG. 49

RESUMO

Patente de Invenção: **"VARIANTES DE FC5 HUMANIZADAS E ESTABILIZADAS PARA INTENSIFICAÇÃO DE TRANSPORTE ATRAVÉS DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA".**

A presente invenção refere-se a composições que compreendem variantes humanizadas e geneticamente modificadas de um domínio variável de anticorpo (por exemplo, FC5), moléculas quiméricas que compreendem as mesmas, composições que compreendem as mesmas e usos das mesmas.

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 JUNTADA DE TRADUÇÃO 30
- Data de Geração do Código: 27/05/2021
- Hora de Geração do Código: 17:03:26
- Código de Controle:
  - Campo 1: CDCB8AF38A41E6C6
  - Campo 2: 15DAB030330AA0D9