



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

(21) BR 112019012950-2 A2



(22) Data do Depósito: 21/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 26/11/2019

(54) **Título:** MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9 E MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO ASSOCIADA OU CARACTERIZADA PELA EXPRESSÃO DE ADAM9 EM UM INDIVÍDUO

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/395; A61P 35/04; C07K 16/18; C07K 16/40.

(30) **Prioridade Unionista:** 23/12/2016 US 62/438,516.

(71) **Depositante(es):** MACROGENICS, INC..

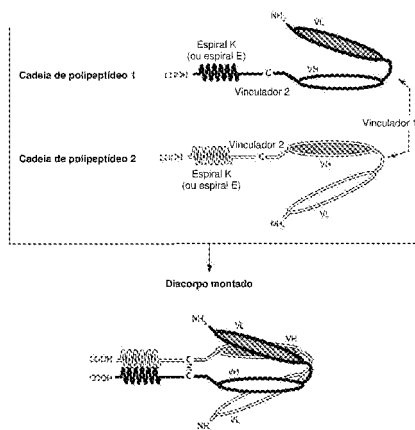
(72) **Inventor(es):** DERYK T. LOO; JUNIPER A. SCRIBNER; BHASWATI BARAT; GUNDO DIEDRICH; LESLIE S. JOHNSON; EZIO BONVINI.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2017067770 de 21/12/2017

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/119166 de 28/06/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 21/06/2019

(57) **Resumo:** MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9 E MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO ASSOCIADA OU CARACTERIZADA PELA EXPRESSÃO DE ADAM9 EM UM INDIVÍDUO A presente invenção é direcionada a moléculas, como anticorpos monoespecíficos e moléculas de ligação bi, tri ou multiespecíficas, incluindo diacopos, BÍTEs, e anticorpos que sejam capazes de ligação de maneira específica a Proteína contendo Domínio de Desintegrina e Metaloproteinase 9 (ADAM9). A invenção particularmente se refere a essas moléculas de ligação que são capazes de apresentar ligação de alta afinidade a ADAM9 humano e não humano. A invenção ainda se refere particularmente a essas moléculas que são, portanto, reativas de maneira cruzada a ADAM9 humano e a ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco cynomolgus). A invenção adicionalmente pertence a todas essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimmunizado, de modo a apresentar imunogenicidade reduzida mediante a administração dessa molécula de ligação a ADAM9 a um indivíduo receptor. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer dessas moléculas de ligação a (...).



MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9 E MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO ASSOCIADA OU CARACTERIZADA PELA EXPRESSÃO DE ADAM9 EM UM INDIVÍDUO

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Norte-Americana de Número de Série 62/438.516 (depositado em 23 de dezembro de 2016; pendente), esse pedido é aqui incorporado por referência em sua integridade.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] Este pedido inclui uma ou mais Listagens de Sequências de acordo com 37 C.F.R. 1.821 *et seq.*, que são reveladas em mídia legível por computador (nome do arquivo: 1301.0147PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt, criado em 29 de novembro de 2017, e tendo um tamanho de 175.962 bytes), esse arquivo é aqui incorporado por referência em sua integridade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção é direcionada a moléculas, como anticorpos monoespecíficos e moléculas de ligação bi, tri ou multiespecíficas, incluindo diacorpos, BiTEs, e anticorpos que são capazes de ligação de maneira específica à "Proteína contendo Domínio de Desintegrina e Metaloproteinase 9" ("ADAM9"). A invenção particularmente se refere a essas moléculas de ligação que são capazes de apresentar ligação de alta afinidade um ADAM9 humano e não humano. A invenção ainda se refere, particularmente, a essas moléculas que são, com isso, reativas de maneira cruzada a ADAM9 humano e a ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco *cynomolgus*). A invenção adicionalmente pertence a todas essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem um

Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foram humanizadas e/ou desimunizadas, de modo a apresentar imunogenicidade reduzida mediante a administração dessa molécula de ligação a ADAM9 a um indivíduo receptor. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9, e a métodos envolvendo o uso de quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9 no tratamento de câncer e outras doenças e condições.

#### HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[004] ADAM é uma família de proteínas envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos (Amendola, R.S. et al. (2015) "*ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2*," J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Edwards, D.R. et al. (2008) "*The ADAM Metalloproteases*," Molec. Aspects Med. 29:258-289). Pelo menos 40 membros genéticos da família foram identificados, e se acredita que pelo menos 21 desses membros sejam funcionais em humanos (Li, J. et al. (2016) "*Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion*," J. Invest. Surg. 26(3):127-133; Duffy, M.J. et al. (2011) "*The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?*," Clin. Proteomics 8:9:1-13 vide também Publicação de Patente Norte-Americana Nº 2013/0045244).

[005] Os membros da família ADAM têm uma estrutura bem conservada com 8 domínios, dentre eles está um domínio de metaloprotease e um domínio de ligação à integrina (desintegrina) (Duffy, M.J. et al. (2009) "*The Role Of ADAMs In Disease Pathophysiology*," Clin. Chim. Acta 403:31-36) O

domínio de metaloprotease de ADAM age como uma sheddase e foi relatado por modular uma série de processos biológicos ao clivar proteínas de transmembrana, que, então, podem agir como ligantes solúveis e regular a sinalização celular (Amendola, R.S. et al. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Ito, N. et al. (2004) "ADAMs, A Disintegrin And Metalloproteinases, Mediate Shedding Of Oxytocinase," Biochem. Biophys. Res. Commun. 314 (2004) 1008-1013).

[006] ADAM9 é um membro da família ADAM de molécula. É sintetizado como uma forma inativa que é clivado proteoliticamente para gerar uma enzima ativa. O processamento no sítio a montante é particularmente importante para a ativação da proenzima. ADAM9 é expresso em fibroblastos (Zigrino, P. et al. (2011) "The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts," J. Biol. Chem. 286:6801-6807), células vasculares de músculo liso ativadas (Sun, C. et al. (2010) "ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling," Cardiovasc. Res. 87:348-355), monócitos (Namba, K. et al. (2001) "Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes," Cell. Immunol. 213:104-113), macrófagos ativados (Oksala, N. et al. (2009) "ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries - Tampere Vascular Study," Ann. Med. 41:279-290).

[007] A atividade de metaloprotease de ADAM9 participa na degradação dos componentes de matriz para, com



isso, permitir a migração de células tumorais (Amendola, R.S. et al. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962). Seu domínio de desintegrina, que é altamente homólogo a muitas desintegrinas de veneno de cobra, permite a interação entre ADAM9 e integrinas, e permite que ADAM9 module, positiva ou negativamente, eventos de adesão celular (Zigrino, P. et al. (2011) "The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts," J. Biol. Chem. 286:6801-6807; Karadag, A. et al. (2006) "ADAM-9 (MDC-9/Meltringamma), A Member Of The A Disintegrin And Metalloproteinase Family, Regulates Myeloma-Cell-Induced Interleukin-6 Production In Osteoblasts By Direct Interaction With The Alpha(v)Beta5 Integrin," Blood 107:3271-3278; Cominetti, M.R. et al. (2009) "Inhibition Of Platelets And Tumor Cell Adhesion By The Disintegrin Domain Of Human ADAM9 To Collagen I Under Dynamic Flow Conditions," Biochimie 91:1045-1052). O domínio de desintegrina de ADAM9 foi apresentado por interagir com as integrinas  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha v\beta 5$  e  $\alpha 9\beta 1$ .

[008] A expressão de ADAM9 foi descoberta por ser relevante a doença, especialmente, câncer. ADAM9 foi descoberto por clivar e liberar diversas moléculas com funções importantes em tumorigênese e angiogênese, como TEK, KDR, EPHB4, CD40, VCAM1 e CDH5. ADAM9 é expresso por muito tipos de células tumorais, incluindo células tumorais de neoplasias de mama, neoplasias de cólon, neoplasias gástricas, gliomas, neoplasias hepáticas, neoplasias de pulmão de células não pequenas, melanomas, mielomas, neoplasias pancreáticas e

neoplasias de próstata (Yoshimasu, T. et al. (2004) "Overexpression Of ADAM9 In Non-Small Cell Lung Cancer Correlates With Brain Metastasis," *Cancer Res.* 64:4190-4196; Peduto, L. et al. (2005) "Critical Function For ADAM9 In Mouse Prostate Cancer," *Cancer Res.* 65:9312-9319; Zigrino, P. et al. (2005) "ADAM-9 Expression And Regulation In Human Skin Melanoma And Melanoma Cell Lines," *Int. J. Cancer* 116:853-859; Fritzsche, F.R. et al. (2008) "ADAM9 Is Highly Expressed In Renal Cell Cancer And Is Associated With Tumour Progression," *BMC Cancer* 8:179:1-9; Fry, J.L. et al. (2010) "Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration," *Cancer Res.* 70, 8187-8198; Chang, L. et al. (2016) "Combined Rnai Targeting Human Stat3 And ADAM9 As Gene Therapy For Non-Small Cell Lung Cancer," *Oncology Letters* 11:1242-1250; Fan, X. et al. (2016) "ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type, and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas," *Int. J. Mol. Sci.* 17:1276:1-11).

[009] Significativamente, expressão aumentada de ADAM9 foi descoberta por se correlacionar positivamente à malignidade do tumor e potencial metastático (Amendola, R.S. et al. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," *J. Leukocyte Biol.* 97(5):951-962; Fan, X. et al. (2016) "ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type, and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas," *Int. J. Mol. Sci.* 17:1276:1-11; Li, J. et al. (2016) "Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion," *J. Invest. Surg.* 26(3):127-133). Adicionalmente, ADAM9 e sua isoforma solúvel secretada parece

ser crucial para as células neoplásicas se disseminarem (Amendola, R.S. et al. (2015) *"ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2,"* J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Fry, J.L. et al. (2010) *"Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration,"* Cancer Res. 70, 8187-8198; Mazzocca, A. (2005) *"A Secreted Form Of ADAM9 Promotes Carcinoma Invasion Through Tumor-Stromal Interactions,"* Cancer Res. 65:4728-4738; vide também Patentes Norte-Americanas Nºs 9.150.656; 7.585.634; 7.829.277; 8.101.361; e 8.445.198 e Publicação de Patente Norte-Americana Nº 2009/0023149).

[010] Diversos estudos, portanto, identificaram ADAM9 como um possível alvo para terapia anticâncer (Peduto, L. (2009) *"ADAM9 As A Potential Target Molecule In Cancer,"* Curr. Pharm. Des. 15:2282-2287; Duffy, M.J. et al. (2009) *"Role Of ADAMs In Cancer Formation And Progression,"* Clin. Cancer Res. 15:1140-1144; Duffy, M.J. et al. (2011) *"The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?"* Clin. Proteomics 8:9:1-13; Josson, S. et al. (2011) *"Inhibition of ADAM9 Expression Induces Epithelial Phenotypic Alterations and Sensitizes Human Prostate Cancer Cells to Radiation and Chemotherapy,"* Prostate 71(3):232-240; vide também Publicações de Patente Norte-Americana Nºs 2016/0138113, 2016/0068909, 2016/0024582, 2015/0368352, 2015/0337356, 2015/0337048, 2015/0010575, 2014/0342946, 2012/0077694, 2011/0151536, 2011/0129450, 2010/0291063, 2010/0233079, 2010/0112713, 2009/0285840, 2009/0203051, 2004/0092466, 2003/0091568, e 2002/0068062, e Publicações PCT Nºs WO 2016/077505, WO 2014/205293, WO 2014/186364, WO 2014/124326,

WO 2014/108480, WO 2013/119960, WO 2013/098797, WO 2013/049704, e WO 2011/100362). Adicionalmente, a expressão de ADAM9 também foi descoberta por ser relevante para doença e inflamação pulmonar (vide, por exemplo, Publicações de Patente Norte-Americana N<sup>os</sup> 2016/0068909; 2012/0149595; 2009/0233300; 2006/0270618; e 2009/0142301). Anticorpos que se ligam a ADAM9 são comercialmente disponíveis da Abcam, Thermofisher, Sigma-Aldrich, e outras empresas.

[011] Entretanto, apesar de todos os avanços anteriores, permanece uma necessidade por moléculas de ligação a ADAM9 de alta afinidade que apresentam ligação mínima a tecidos normais e sejam capazes de ligação a ADAM9 humano e não humano com alta afinidade semelhante. A presente invenção se direciona a essa necessidade e à necessidade por agentes terapêuticos aprimorados para câncer.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção é direcionada a moléculas, como anticorpos monoespecíficos e moléculas de ligação bi, tri ou multiespecíficas, incluindo diacorpos, BiTEs, e anticorpos que sejam capazes de ligação de maneira específica a "Proteína contendo Domínio de Desintegrina e Metaloproteinase 9" ("ADAM9"). A invenção particularmente se refere a essas moléculas de ligação que são capazes de apresentarem ligação de alta afinidade a ADAM9 humano e não humano. A invenção, ainda, particularmente se refere a essas moléculas que são, com isso, reativas de maneira cruzada com ADAM9 humano e ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco *cynomolgus*). A invenção adicionalmente pertence a todas essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia

Pesada (VH) que foram humanizadas e/ou desimunizadas de modo a apresentarem imunogenicidade reduzida mediante a administração dessa molécula de ligação a ADAM9 a um indivíduo receptor. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9, e a métodos envolvendo o uso de quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9 no tratamento de câncer e outras doenças e condições

[013] Em detalhe, a invenção provê uma molécula de ligação a ADAM9 que compreende um domínio de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH), em que esse Domínio Variável de Cadeia Pesada compreende um Domínio CDR<sub>H1</sub>, um Domínio CDR<sub>H2</sub> e um Domínio CDR<sub>H3</sub>, e esse Domínio Variável de Cadeia Leve compreende um Domínio CDR<sub>L1</sub>, um Domínio CDR<sub>L2</sub>, e um Domínio CDR<sub>L3</sub>, em que:

(A) esses Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de MAB-A; e esses Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de MAB-A; ou

(B) esses Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de MAB-A; e esses Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de

uma variante otimizada de MAB-A; ou

(C) esses Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de MAB-A; e esses Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de MAB-A.

[014] A invenção particularmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 possui:

[015] (1) os Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de MAB-A; e

[016] (2) as FR1, FR2, FR3 e FR4 de um Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[017] (B) (1) os Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub> e Domínio CDR<sub>L3</sub> do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) MAB-A; e

[018] (2) as FR1, FR2, FR3 e FR4 de um Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[019] (C) (1) os Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de MAB-A; e

[020] (2) as FR1, FR2, FR3 e FR4 do Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[021] (D) (1) os Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub> e Domínio CDR<sub>L3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de MAB-A; e

[022] (2) as FR1, FR2, FR3 e FR4 do Domínio VL

de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[023] (E) (1) os Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A; e

[024] (2) o Domínio VL Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A.

[025] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) dessa variante otimizada de MAB-A compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15:

[026] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWX<sub>1</sub>HWVRQA

[027] PGKGLEWVGE IIPIX<sub>2</sub>GHTNY  
NEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RFTI SLDNSKNTLY

[028] LQMGSRLRAED TAVYYCARGG  
YYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>

[029] DYWGQGTTVT VSS em que: X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, e X<sub>6</sub> são selecionados de maneira independente,

[030] em que: X<sub>1</sub> é M ou I; X<sub>2</sub> é N ou F;

[031] X<sub>3</sub> é K ou R; X<sub>4</sub> é K ou Q;

[032] X<sub>5</sub> é S ou G, e X<sub>6</sub> é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D;

[033] em que: X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, e X<sub>11</sub> são selecionados de modo que:

[034] quando X<sub>6</sub> for P; X<sub>7</sub> é K ou R; X<sub>8</sub> é F ou M; X<sub>9</sub> é G; X<sub>10</sub> é W ou F; e X<sub>11</sub> é M, L ou K;

[035] quando X<sub>6</sub> for F, Y ou W; X<sub>7</sub> é N ou H; X<sub>8</sub> é S ou K; X<sub>9</sub> é G ou A; X<sub>10</sub> é T ou V; e X<sub>11</sub> é M, L ou K;

[036] quando X<sub>6</sub> for I, L ou V; X<sub>7</sub> é G; X<sub>8</sub> é K; X<sub>9</sub> é G ou A; X<sub>10</sub> é V; e X<sub>11</sub> é M, L ou K;

[037] quando X<sub>6</sub> for T; X<sub>7</sub> é G; X<sub>8</sub> é K, M ou N; X<sub>9</sub> é G; X<sub>10</sub> é V ou T; e X<sub>11</sub> é L ou M;

[038] quando X<sub>6</sub> for G; X<sub>7</sub> é G; X<sub>8</sub> é S; X<sub>9</sub> é G; X<sub>10</sub> é V; e X<sub>11</sub> é L;

[039] quando X<sub>6</sub> for D; X<sub>7</sub> é S; X<sub>8</sub> é N; X<sub>9</sub> é A; X<sub>10</sub> é V; e X<sub>11</sub> é L.

[040] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que esses Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> desse Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) dessa variante otimizada de MAB-A respectivamente têm as sequências de aminoácidos de:

[041] (1) SEQ ID NO:47 (SYWX<sub>1</sub>H)

[042] em que: X<sub>1</sub> é M ou I;

[043] (2) SEQ ID NO:48 (EIIPIX<sub>2</sub>GHTNYNEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>)

[044] em que: X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, e X<sub>5</sub> são selecionados de maneira independente, e

[045] em que: X<sub>2</sub> é N ou F; X<sub>3</sub> é K ou R; X<sub>4</sub> é K ou Q; e X<sub>5</sub> é S ou G; e

[046] (3) SEQ ID NO:49 (GGYYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DY)

[047] em que: X<sub>6</sub>, é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D, e X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, e X<sub>11</sub> são selecionados de modo que:

[048] (A) quando X<sub>6</sub> for P:

[049] X<sub>7</sub> é K ou R; X<sub>8</sub> é F ou M; X<sub>9</sub> é G;

[050] X<sub>10</sub> é W ou F; e X<sub>11</sub> é M, L ou K;

[051] (B) quando X<sub>6</sub> for F, Y ou W:

[052] X<sub>7</sub> é N ou H; X<sub>8</sub> é S ou K; X<sub>9</sub> é G ou A;

[053] X<sub>10</sub> é T ou V; e X<sub>11</sub> é M, L ou K;

[054] (C) quando X<sub>6</sub> for I, L ou V:

[055] X<sub>7</sub> é G; X<sub>8</sub> é K; X<sub>9</sub> é G ou A;

[056] X<sub>10</sub> é V; e X<sub>11</sub> é M, L ou K;



- [057] (D) quando  $X_6$  for T:  
 [058]  $X_7$  é G;  $X_8$  é K, M ou N;  $X_9$  é G;  
 [059]  $X_{10}$  é V ou T; e  $X_{11}$  é L ou M;  
 [060] (E) quando  $X_6$  for G:  
 [061]  $X_7$  é G;  $X_8$  é S;  $X_9$  é G;  
 [062]  $X_{10}$  é V; e  $X_{11}$  é L; e  
 [063] (F) quando  $X_6$  for D:  
 [064]  $X_7$  é S;  $X_8$  é N;  $X_9$  é A;  
 [065]  $X_{10}$  é V; e  $X_{11}$  é L.

[066] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) dessa variante otimizada de MAB-A é selecionado do grupo consistindo em:

- [067] (1) VH de hMAB-A(1) (SEQ ID NO:16);  
 [068] (2) VH de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:17);  
 [069] (3) VH de hMAB-A(3) (SEQ ID NO:18);  
 [070] (4) VH de hMAB-A(4) (SEQ ID NO:19);  
 [071] (5) VH de hMAB-A(2A) (SEQ ID NO:20);  
 [072] (6) VH de hMAB-A(2B) (SEQ ID NO:21);  
 [073] (7) VH de hMAB-A(2C) (SEQ ID NO:22);  
 [074] (8) VH de hMAB-A(2D) (SEQ ID NO:23);  
 [075] (9) VH de hMAB-A(2E) (SEQ ID NO:24);  
 [076] (10) VH de hMAB-A(2F) (SEQ ID NO:25);  
 [077] (11) VH de hMAB-A(2G) (SEQ ID NO:26);  
 [078] (12) VH de hMAB-A(2H) (SEQ ID NO:27);  
 [079] (13) VH de hMAB-A(2I) (SEQ ID NO:28); e  
 [080] (14) VH de hMAB-A(2J) (SEQ ID NO:29).

[081] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) compreende a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:53:

[082] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT

ISCX<sub>12</sub>ASQSVD

[083] YX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>NWY QQKPGQPPKL LIYAASDLES

[084] GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY

[085] YCQQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PF TFGQGTKLEI K

[086] em que: X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub>, e X<sub>17</sub>, são selecionados de maneira independente, e

[087] em que: X<sub>12</sub> é K ou R; X<sub>13</sub> é D ou S;

[088] X<sub>14</sub> é M ou L; X<sub>15</sub> é H ou Y;

[089] X<sub>16</sub> é E ou S; e X<sub>17</sub> é D ou T.

[090] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que esses Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub> e Domínio CDR<sub>L3</sub> desse Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) dessa variante otimizada de MAB-A respectivamente têm as sequências de aminoácidos de:

[091] (1) SEQ ID NO:66 (X<sub>12</sub>ASQSVDYX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>N)

[092] em que: X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, são selecionados de maneira independente, e

[093] em que: X<sub>12</sub> é K ou R; X<sub>13</sub> é D ou S; e X<sub>14</sub> é M ou L;

[094] (2) SEQ ID NO:13 (AASDLES); e

[095] (3) SEQ ID NO:67 (QQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PFT)

[096] em que: X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub>, e X<sub>17</sub>, são selecionados de maneira independente, e

[097] em que: X<sub>15</sub> é H ou Y; X<sub>16</sub> é E ou S; e X<sub>17</sub> é D ou T.

[098] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) dessa variante otimizada

de MAB-A é selecionado do grupo consistindo em:

- [099] (1) VL de hMAB-A(1) (SEQ ID NO:54);
- [100] (2) VL de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:55);
- [101] (3) VL de hMAB-A(3) (SEQ ID NO:56);
- [102] (4) VL de hMAB-A(4) (SEQ ID NO:57);
- [103] (5) VL de hMAB-A(2A) (SEQ ID NO:20).

[104] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que o domínio de ligação a ADAM9 compreende:

[105] (A) (1) um Domínio CDR<sub>H</sub>1 que compreende uma sequência de aminoácidos SYWMH (SEQ ID NO:8);

[106] (2) um Domínio CDR<sub>H</sub>2 que compreende uma sequência de aminoácidos EIIPIFGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO:35); ou

[107] (3) um Domínio CDR<sub>H</sub>3 que compreende uma sequência de aminoácidos GGYYYYPRQGFLDY (SEQ ID NO:45);

[108] ou

[109] (B) (1) um Domínio CDR<sub>L</sub>1 que compreende uma sequência de aminoácidos KASQSVDYSGDSYMN (SEQ ID NO:62);

[110] (2) um Domínio CDR<sub>L</sub>2 que compreende uma sequência de aminoácidos AASDLES (SEQ ID NO:13); ou

[111] (3) um Domínio CDR<sub>L</sub>3 que compreende uma sequência de aminoácidos QQSHEDPFT (SEQ ID NO:14);

[112] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que o domínio de ligação a ADAM9 compreende o Domínio CDR<sub>H</sub>1 que compreende uma sequência de aminoácidos SYWMH (SEQ ID NO:8), o Domínio CDR<sub>H</sub>2 que compreende uma sequência de aminoácidos EIIPIFGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO:35), e o Domínio CDR<sub>H</sub>3 que compreende uma sequência de aminoácidos GGYYYYPRQGFLDY (SEQ ID NO:45).

[113] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que o domínio de ligação a ADAM9 compreende o Domínio CDR<sub>L1</sub> que compreende uma sequência de aminoácidos KASQSVDYSGDSYMN (SEQ ID NO:62), o Domínio CDR<sub>L2</sub> que compreende uma sequência de aminoácidos AASDLES (SEQ ID NO:13), e o Domínio CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de aminoácidos QQSHEDPFT (SEQ ID NO:14).

[114] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende:

[115] (A) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28); ou

[116] (B) o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55); ou

[117] (C) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28) e o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55).

[118] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende um Domínio CDR<sub>H1</sub>, um Domínio CDR<sub>H2</sub>, e um Domínio CDR<sub>H3</sub> e um Domínio CDR<sub>L1</sub>, um Domínio CDR<sub>L2</sub>, e um Domínio CDR<sub>L3</sub> tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

[119] (a) SEQ ID NOS:8, 35 e 10 e SEQ ID NOS:62, 13 e 14, respectivamente

[120] (b) SEQ ID NOS:8, 35 e 10 e SEQ ID NOS:63, 13 e 14, respectivamente;

[121] (c) SEQ ID NOS:8, 36 e 10 e SEQ ID NOS:63, 13 e 14, respectivamente; e

[122] (d) SEQ ID NOS:34, 36 e 10 e SEQ ID NO:64,

13 e 65, respectivamente.

[123] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas às sequências selecionadas do grupo consistindo em:

[124] (a) SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[125] (b) SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

[126] (c) SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:56, respectivamente; e

[127] (d) SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

[128] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

[129] (a) SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[130] (b) SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

[131] (c) SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:56, respectivamente; e

[132] (d) SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

[133] A invenção adicionalmente se refere à

realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 tem pelo menos uma intensificação de 150 vezes na afinidade de ligação a ADAM9 cino e retém a ligação de alta afinidade a ADAM9 humano conforme comparado a MAB-A.

[134] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende um Domínio CDR<sub>H1</sub>, um Domínio CDR<sub>H2</sub>, e um Domínio CDR<sub>H3</sub> e um Domínio CDR<sub>L1</sub>, um Domínio CDR<sub>L2</sub>, e um Domínio CDR<sub>L3</sub> tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

[135] (a) SEQ ID NOs:8, 35 e 37 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[136] (b) SEQ ID NOs:8, 35 e 38 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[137] (c) SEQ ID NOs:8, 35 e 39 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[138] (d) SEQ ID NOs:8, 35 e 40 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[139] (e) SEQ ID NOs:8, 35 e 41 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[140] (e) SEQ ID NOs:8, 35 e 42 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[141] (f) SEQ ID NOs:8, 35 e 43 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[142] (g) SEQ ID NOs:8, 35 e 44 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

[143] (h) SEQ ID NOs:8, 35 e 45 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente; e

[144] (i) SEQ ID NOs:8, 35 e 46 e SEQ ID NOs:62,

13 e 14, respectivamente.

[145] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse domínio de ligação a ADAM9 compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas às sequências selecionadas do grupo consistindo em:

[146] (a) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[147] (b) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[148] (c) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[149] (d) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[150] (e) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[151] (f) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[152] (g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[153] (h) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[154] (i) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e

[155] (j) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[156] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que esse

domínio de ligação a ADAM9 compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

[157] (a) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[158] (b) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[159] (c) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[160] (d) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[161] (e) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[162] (f) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[163] (g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[164] (h) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[165] (i) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e

[166] (j) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[167] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula é um anticorpo de ligação a ADAM9 monoespecífico ou um fragmento de ligação a ADAM9 deste, ou em que essa molécula é um anticorpo biespecífico.

[168] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que



essa molécula é um diacorpo, esse diacorpo sendo um complexo ligado de maneira covalente que compreende duas, três, quatro ou cinco cadeias de polipeptídeos.

[169] A invenção adicionalmente se refere à realização de todas essas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula é uma molécula de ligação trivalente, essa molécula de ligação trivalente sendo um complexo ligado de maneira covalente que compreende três, quatro, cinco ou mais cadeias de polipeptídeos.

[170] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula compreende um Domínio de Ligação a Albumina (ABD).

[171] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula compreende uma Região Fc, e particularmente a realização em que essa Região Fc é uma Região Fc variante que compreende:

[172] (a) uma ou mais modificações de aminoácidos que reduzem a afinidade da Região Fc variante para uma FcγR; e/ou

[173] (b) uma ou mais modificações de aminoácidos que intensifiquem a meia-vida sérica dessa molécula de ligação a ADAM9.

[174] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa uma ou mais modificações de aminoácidos que reduzem a afinidade da Região Fc variante para uma FcγR compreendem:

[175] L234A;

[176] L235A; ou

[177] L234A e L235A;

[178] em que essa numeração é a do índice EU, como em Kabat.

[179] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa uma ou mais modificações de aminoácidos que intensificam a meia-vida sérica dessa molécula de ligação a ADAM9 compreendem:

[180] (A) M252Y;

[181] (B) M252Y e S254T;

[182] (C) M252Y e T256E;

[183] (D) M252Y, S254T e T256E; ou

[184] (E) K288D e H435K;

[185] em que essa numeração é a do índice EU, como em Kabat.

[186] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula é biespecífica e compreende um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de ADAM9 e um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de uma molécula presente na superfície de uma célula efetora.

[187] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula compreende dois sítios de ligação a epítopo capazes de ligação imunoesspecífica a epítopo(s) de ADAM9 e dois sítios de ligação a epítopo capazes de ligação imunoesspecífica a epítopo(s) de uma molécula presente na superfície de uma célula efetora.

[188] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula é triespecífica e compreende:

[189] (a) um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de ADAM9;

[190] (b) um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de uma primeira molécula presente na superfície de uma célula efetora; e

[191] (c) um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de uma segunda molécula presente na superfície de uma célula efetora.

[192] invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula é capaz de se ligar simultaneamente a ADAM9 e essa molécula está presente na superfície de uma célula efetora.

[193] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula presente na superfície de uma célula efetora é CD2, CD3, CD8, TCR, ou NKG2D.

[194] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa célula efetora é uma célula T citotóxica ou uma célula *Natural Killer* (NK).

[195] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa primeira molécula presente na superfície de uma célula efetora é CD3 e essa segunda molécula presente na superfície de uma célula efetora é CD8.

[196] A invenção adicionalmente se refere à realização dessas moléculas de ligação a ADAM9, em que essa molécula de ligação a ADAM9 media a ligação coordenada de uma célula que expressa ADAM9 e uma célula T citotóxica.

[197] A invenção adicionalmente se refere a uma

composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de qualquer uma das moléculas de ligação a ADAM9 descritas acima e um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

[198] A invenção adicionalmente se refere ao uso de qualquer uma das moléculas de ligação a ADAM9 descritas acima, ou ao uso da composição farmacêutica descrita acima no tratamento de uma doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9.

[199] A invenção particularmente se refere a esse uso, em que essa doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9 é câncer, e especialmente em que esse câncer é selecionado do grupo consistindo em: câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal (especialmente um adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma, melanoma, ou carcinoma de células escamosas), câncer esofágico, câncer gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer de fígado, câncer de pulmão de células não pequenas (especialmente, um carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, ou carcinoma indiferenciado de células grandes), câncer mieloide, câncer de ovário, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, câncer de tireoide, câncer testicular, e câncer do útero.

[200] A invenção adicionalmente se refere a método para tratar uma doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9 em um indivíduo compreendendo administração a esse indivíduo de uma quantidade eficaz de qualquer uma das moléculas de ligação a ADAM9

descritas acima, ou qualquer uma das composições farmacêuticas descritas acima.

[201] A invenção particularmente se refere a esse método em que essa doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9 é câncer, e especialmente em que esse câncer é selecionado do grupo consistindo em: câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal (especialmente, um adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma, melanoma, ou carcinoma de células escamosas), câncer esofágico, câncer gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer de fígado, câncer de pulmão de células não pequenas (especialmente, um carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, ou carcinoma indiferenciado de células grandes), câncer mieloide, câncer de ovário, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, câncer de tireoide, câncer testicular, e câncer do útero.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[202] A Figura 1 provê uma representação esquemática de um diacorpo ligado de maneira covalente representativo tendo dois sítios de ligação a epítipo compostos de duas cadeias de polipeptídeos, cada um tendo um Domínio de Promoção de Heterodímero E-coil ou K-coil (Domínios de Promoção de Heterodímero alternativos são providos abaixo). Um resíduo de cisteína pode estar presente em um ligante e/ou no Domínio de Promoção de Heterodímero conforme apresentado na Figura 3B. Domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítipo são apresentados utilizando o mesmo padrão de sombreado ou preenchimento.

[203] A Figura 2 provê uma representação esquemática de uma molécula ligada de maneira covalente representativa tendo dois sítios de ligação a epítopo compostos de duas cadeias de polipeptídeos, cada um tendo um Domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas forma toda ou parte de uma Região Fc. Domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são apresentados utilizando o mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[204] As Figuras 3A-3C proveem representações esquemáticas que apresentam diacorpos tetravalentes ligados de maneira covalente representativos tendo quatro sítios de ligação a epítopo compostos de dois pares de cadeias de polipeptídeos (ou seja, quatro cadeias de polipeptídeos no todo). Um polipeptídeo de cada par possui um Domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas forma toda ou parte de uma Região Fc. Domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são apresentados utilizando o mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento. Os dois pares de cadeias de polipeptídeos podem ser os mesmos. Nessas realizações em que os dois pares de cadeias de polipeptídeos são os mesmos e os Domínios VL e VH reconhecem diferentes epítopos (conforme apresentado nas Figuras 3A-3B), a molécula resultante possui quatro sítios de ligação a epítopo e é biespecífica e bivalente em relação a cada epítopo ligado. Nessas realizações em que os Domínios VL e VH reconhecem o mesmo epítopo (por exemplo, as mesmas CDRs de Domínio VL e as mesmas CDRs de Domínio VH são utilizadas em ambas as cadeias), uma molécula resultante possui quatro sítios de ligação a epítopo e é monoespecífica e tetravalente em relação a um único epítopo. Alternativamente, os dois pares de polipeptídeos podem ser diferentes. Nessas realizações em que

os dois pares de cadeias de polipeptídeos são diferentes e os Domínios VL e VH de cada par de polipeptídeos reconhecem diferentes epítomos (conforme apresentado pelos diferentes sombreamentos e padrões na Figura 3C), uma molécula resultante possui quatro sítios de ligação a epítomo e é tetraespecífica e monovalente em relação a cada epítomo ligado. A Figura 3A apresenta um diacopo contendo Região Fc que contém um Domínio de Promoção de Heterodímero de peptídeo compreendendo um resíduo de cisteína. A Figura 3B apresenta um diacopo contendo Região Fc, que contém Domínios de Promoção de Heterodímero E-coil e K-coil compreendendo um resíduo de cisteína e um ligante (com um resíduo de cisteína opcional). A Figura 3C apresenta um diacopo contendo Região Fc, que contém domínios CH1 e CL de anticopo.

[205] As Figuras 4A-4B proveem representações esquemáticas de uma molécula de diacopo ligada de maneira covalente representativa tendo dois sítios de ligação a epítomo composto de três cadeias de polipeptídeos. Duas das cadeias de polipeptídeos possuem um Domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas formem toda ou parte de uma Região Fc. As cadeias de polipeptídeos compreendendo os Domínios VL e VH ainda compreendem um Domínio de Promoção de Heterodímero. Domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítomo são apresentados utilizando o mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[206] A Figura 5 provê a representação esquemática de uma molécula de diacopo ligada de maneira covalente representativa tendo quatro sítios de ligação a epítomo compostos de cinco cadeias de polipeptídeos. Duas das cadeias de polipeptídeos possuem um Domínio CH2 e CH3, de modo

que as cadeias associadas formem uma Região Fc que compreende toda ou parte de Região Fc. As cadeias de polipeptídeos compreendendo os Domínios VL e VH ligados ainda compreendem um Domínio de Promoção de Heterodímero. Domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítipo são apresentados utilizando o mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[207] As Figuras 6A-6F proveem representações esquemáticas de moléculas de ligação trivalentes contendo Região Fc representativas tendo três sítios de ligação a epítipo. Figuras 6A e 6B, respectivamente, ilustram esquematicamente os domínios de moléculas de ligação trivalentes compreendendo dois domínios de ligação do tipo diacorpo e um domínio de ligação do tipo Fab tendo diferentes orientações de domínio em que os domínios de ligação do tipo diacorpo são N-terminal ou C-terminal a uma Região Fc. As moléculas nas Figuras 6A e 6B compreendem quatro cadeias. As Figuras 6C e 6D, respectivamente, ilustram esquematicamente os domínios de moléculas de ligação trivalentes compreendendo dois domínios de ligação do tipo diacorpo N-terminal a uma Região Fc, e um domínio de ligação do tipo Fab em que a cadeia leve e cadeia pesada são ligadas por um polipeptídeo espaçador, ou um domínio de ligação do tipo scFv. As moléculas de ligação trivalentes nas Figuras 6E e 6F, respectivamente, ilustram esquematicamente os domínios de moléculas de ligação trivalentes compreendendo dois domínios de ligação do tipo diacorpo C-terminal a uma Região Fc, e um domínio de ligação do tipo Fab em que a cadeia leve e cadeia pesada são ligadas por meio de um polipeptídeo espaçador, ou um domínio de ligação do tipo scFv. As moléculas de ligação trivalentes nas Figuras 6C-6F compreendem três cadeias. Domínios VL e VH que reconhecem



o mesmo epítopo são apresentados utilizando o mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[208] As Figuras 7A-7C apresentam os resultados de um estudo de imuno-histoquímica (IHC) e apresentam a capacidade de MAB-A marcar especificamente uma variedade de tipos de câncer de pulmão de células não pequenas (Figura 7A, Quadros 1 a 8), células de câncer de mama, células de câncer de próstata, células de câncer gástrico (Figura 7B, Quadros 1 a 6), e células de câncer de cólon (Figura 7C, Quadros 1 a 8), enquanto o controle de isotipo falhou em marcar especificamente quaisquer destes tipos de célula neoplásica (Figuras 7A-7C).

[209] As Figuras 8A-8B apresentam os resultados de estudos de coloração celular e apresentam que MAB-A se liga a ADAM9 humano, e em uma extensão menor, ADAM9 de macaco *cynomolgus*, expressos de maneira temporária na superfície de células 293-FT e CHO-K (Figura 8A e Figura 8B, respectivamente).

[210] As Figuras 9A-9B retratam as sequências de aminoácidos do Domínio VH anti-ADAM9 murino alinhado a diversas variantes humanizadas/otimizadas de MAB-A (Figura 9A, SEQ ID NOs:7, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 e 28) e o Domínio VL anti-ADAM9 murino alinhado a diversas variantes humanizadas/otimizadas de MAB-A (Figura 9B, SEQ ID NOs:11, 51, 52, 53 e 54). Posições substituídas dentro das CDRs durante a otimização inicial são sublinhadas como segue: possíveis sítios de desamidação e isomeração são indicados com um sublinhado único, resíduos de lisina são indicados com sublinhado duplo, resíduos lábeis adicionais são indicados com um sublinhado pontilhado duplo.

[211] As Figuras 10A-10B apresentam as curvas de

ligação de ELISA dos dez clones de hMAB-A otimizados, selecionados compreendendo variantes de CDR<sub>H</sub>3, hMAB-A de origem (2.2), e um anticorpo controle de isotipo. Figura 10A apresenta as curvas de ligação para cynoADAM9 e Figura 10B apresenta as curvas de ligação para huADAM9.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[212] A presente invenção é direcionada a moléculas, como anticorpos monoespecíficos e moléculas de ligação bi, tri ou multiespecíficas, incluindo diacorpos, BiTEs, e anticorpos que sejam capazes de ligação de maneira específica a "Proteína contendo Domínio de Desintegrina e Metaloproteinase 9" ("ADAM9"). A invenção particularmente se refere a essas moléculas de ligação que são capazes de apresentar ligação de alta afinidade a ADAM9 humano e não humano. A invenção ainda particularmente se refere a essas moléculas que são, com isso, reativas de maneira cruzada com ADAM9 humano e ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco *cynomolgus*). A invenção adicionalmente pertence a todas essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado, de modo a apresentar imunogenicidade reduzida mediante a administração dessa molécula de ligação a ADAM9 a um indivíduo receptor. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9, e a métodos envolvendo o uso de quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9 no tratamento de câncer e outras doenças e condições.

#### I. Anticorpos e seus Domínios de Ligação

[213] Os anticorpos da presente invenção são moléculas de imunoglobulina capazes de ligação específica a um alvo, como um carboidrato, polinucleotídeo, lipídeo, polipeptídeo etc., por meio de pelo menos um sítio de reconhecimento de antígeno, localizado no Domínio Variável da molécula de imunoglobulina. Conforme aqui utilizados, os termos "anticorpo" e "anticorpos" se referem a anticorpos monoclonais, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos sintéticos, anticorpos quiméricos, anticorpos policlonais, anticorpos camelizados, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), Fvs biespecíficos, ligados a dissulfeto (sdFv), intracorpos, e fragmentos de ligação a epítipo de qualquer um dos mencionados acima. Em particular, o termo "anticorpo" inclui moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina, ou seja, moléculas que contêm um sítio de ligação a epítipo. Moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) ou subclasse. As últimas décadas viram o ressurgimento de interesse no potencial terapêutico de anticorpos, e anticorpos têm se tornado uma das classes principais de drogas derivadas por biotecnologia (Chan, C.E. et al. (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*," Singapore Med. J. 50(7):663-666). Além de seu uso em diagnóstico, anticorpos se apresentaram serem úteis como agentes terapêuticos. Mais de 200 drogas com base em anticorpo foram aprovadas para uso ou estão em desenvolvimento.

[214] Anticorpos são capazes de "ligação de

maneira imuno-específica" a um polipeptídeo ou proteína ou uma molécula não protéica, devido à presença, nessa molécula, de um domínio ou parcela ou conformação particular (um "epítopo"). Uma molécula contendo epítopo pode ter atividade imunogênica, de modo que obtenha uma resposta de produção de anticorpo em um animal; essas moléculas são denominadas "antígenos". Conforme aqui utilizados, um anticorpo, diacorpo ou outra molécula de ligação à epítopo é dita por se ligar "imuno-especificamente" a uma região de outra molécula (ou seja, um epítopo) se reagir ou se associar mais frequentemente, mais rapidamente, com maior duração e/ou com maior afinidade com esse epítopo em relação a epítopos alternativos. Por exemplo, um anticorpo que se liga imuno-especificamente a um epítopo viral é um anticorpo que se liga a esse epítopo viral com maior afinidade, avidéz, mais prontamente e/ou com maior duração do que se liga imuno-especificamente a outros epítopos virais ou a epítopos não virais. Também é entendido pela leitura dessa definição que, por exemplo, um anticorpo (ou parcela ou epítopo) que se liga imuno-especificamente a um primeiro alvo pode ou não se ligar de maneira específica ou preferencial a um segundo alvo. Como tal, "ligação imuno-específica" a um epítopo particular não precisa necessariamente (embora possa incluir) de ligação exclusiva a esse epítopo. De modo geral, mas não necessariamente, referência à ligação significa ligação "imuno-específica". Duas moléculas são ditas por serem capazes de ligação entre si de maneira "fisio-específica", se essa ligação apresentar a especificidade com quais receptores se ligam a seus respectivos ligantes.

[215] O termo "anticorpo monoclonal" se refere a uma população de anticorpo homogênea em que o anticorpo

monoclonal é compreendido de aminoácidos (que ocorrem naturalmente ou ocorrem não naturalmente) que são envolvidos na ligação seletiva de um antígeno. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único epítopo (ou sítio antigênico). O termo "anticorpo monoclonal" engloba não somente anticorpos monoclonais intactos e anticorpos monoclonais de extensão completa, mas também seus fragmentos (como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), (scFv) de única cadeia, seus mutantes, proteínas de fusão compreendendo uma parte de anticorpo, anticorpos monoclonais humanizados, anticorpos monoclonais quiméricos, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento de antígeno da especificidade necessária e a capacidade de se ligar a um antígeno. O termo não é destinado a ser limitado em relação à origem do anticorpo ou à maneira na qual é feito (por exemplo, por hibridoma, seleção de fago, expressão de recombinante, animais transgênicos etc.). O termo inclui imunoglobulinas completas assim como fragmentos etc. descritos acima, sob a definição de "anticorpo". Métodos de composição de anticorpos monoclonais são conhecidos na técnica. Um método que pode ser empregado é o método de Kohler, G. et al. (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*," Nature 256:495-497, ou uma modificação dele. Tipicamente, anticorpos monoclonais são desenvolvidos em camundongos, ratos ou coelhos. Os anticorpos são produzidos ao imunizar um animal com uma quantidade imunogênica de células, extratos celulares, ou preparações de proteína que contêm o epítopo desejado. O imunogênio pode ser, entre outros, células primárias, linhagens celulares de cultura, células

neoplásicas, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, ou tecido. As células utilizadas para a imunização podem ser cultivadas por um período de tempo (por exemplo, pelo menos 24 horas) antes de seu uso como um imunogênio. As células podem ser utilizadas como imunogênios por si só ou em combinação com um adjuvante não desnaturante, como Ribi (vide, por exemplo, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production," ILAR J. 37(3):119-125). Em geral, as células devem ser mantidas intactas e, preferencialmente, viáveis quando utilizadas como imunogênios. Células intactas podem permitir que antígenos sejam mais bem detectados que células rompidas pelo animal imunizado. O uso de adjuvantes desnaturantes ou crus, por exemplo, adjuvante de Freund, pode romper as células e, portanto, é desaconselhado. O imunogênio pode ser administrado diversas vezes em intervalos periódicos, como, a cada quinze dias ou semanalmente ou pode ser administrado de modo a manter a viabilidade no animal (por exemplo, em um recombinante de tecido). Alternativamente, anticorpos monoclonais existentes e quaisquer outros anticorpos equivalentes que são imuno-específicos para um epítipo patogênico desejado podem ser sequenciados e produzidos de maneira recombinante por quaisquer meios conhecidos na técnica. Em uma realização, esse anticorpo é sequenciado e a sequência de polinucleotídeo é, então, clonada em um vetor para expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida em um vetor em uma célula hospedeira e a célula hospedeira pode ser, então, expandida e congelada para uso futuro. A sequência de polinucleotídeo desses anticorpos pode ser utilizada para manipulação genética para gerar as moléculas mono ou

multiespecíficas (por exemplo, biespecíficas, triespecíficas e tetraespecíficas) da invenção assim com o uma afinidade otimizada, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, e/ou um anticorpo caninizado, para melhorar a afinidade, ou outras características do anticorpo. O princípio geral na humanização de um anticorpo envolve a retenção da sequência básica da parte de ligação ao antígeno do anticorpo, enquanto troca o restante não humano do anticorpo com sequências de anticorpo humano.

[216] Anticorpos naturais (como anticorpos de IgG) são compostos de duas "Cadeias leves" complexadas com duas "Cadeias pesadas". Cada Cadeia leve contém um Domínio Variável ("VL") e um Domínio Constante ("CL"). Cada Cadeia pesada contém um Domínio Variável ("VH"), três Domínios Constantes ("CH1", "CH2" e "CH3"), e uma Região de "Dobradiça" ("H") localizada entre os Domínios CH1 e CH2. A unidade estrutural básica de imunoglobulinas que ocorrem naturalmente (por exemplo, IgG) é, portanto, um tetrâmero tendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, comumente expressas como uma glicoproteína de cerca de 150.000 Da. A parte amino-terminal ("N-terminal") de cada cadeia inclui um Domínio Variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis para reconhecimento de antígeno. A parte carboxi-terminal ("C-terminal") de cada cadeia define uma região constante, com cadeias leves tendo um único Domínio Constante e cadeias pesadas comumente tendo três Domínios Constantes e uma Região de Dobradiça. Assim, a estrutura das cadeias leves de uma molécula de IgG é n-VL-CL-c e a estrutura das cadeias pesadas de IgG é n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (onde H é a Região de Dobradiça, e n e c representam, respectivamente, o N-terminal

e o C-terminal do polipeptídeo). Os Domínios Variáveis de uma molécula de IgG consistem em 1, 2 e, mais comumente, 3 regiões determinantes de complementariedade ("CDR", ou seja, CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente), que contêm os resíduos em contato com o epítipo, e segmentos não CDR, mencionados como regiões estruturais ("FR"), que, em geral, mantêm a estrutura e determinam o posicionamento dos loops de CDR, de modo a permitir esse contato (embora determinados resíduos estruturais também possam contatar o epítipo). Assim, os Domínios VL e VH têm tipicamente a estrutura: n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c (onde "n" denota o N-terminal e "c" denota o C-terminal). Polipeptídeos que são (ou podem servir como) a primeira, segunda, terceira, e quarta FR da Cadeia leve de um anticorpo são aqui, respectivamente, designados como: Domínio FR<sub>L</sub>1, Domínio FR<sub>L</sub>2, Domínio FR<sub>L</sub>3, e Domínio FR<sub>L</sub>4. De maneira semelhante, os polipeptídeos que são (ou podem servir como) a primeira, segunda, terceira e quarta FR da Cadeia pesada de um anticorpo são aqui, respectivamente, designados como: Domínio FR<sub>H</sub>1, Domínio FR<sub>H</sub>2, Domínio FR<sub>H</sub>3 e Domínio FR<sub>H</sub>4. Polipeptídeos que são (ou podem servir como) a primeira, segunda e terceira CDR de uma Cadeia Leve de um anticorpo são aqui, respectivamente, designados como: Domínio CDR<sub>L</sub>1, Domínio CDR<sub>L</sub>2, e Domínio CDR<sub>L</sub>3. De maneira semelhante, os polipeptídeos que são (ou podem servir como) a primeira, segunda e terceira CDR de uma cadeia pesada de anticorpo são aqui, respectivamente, designados como: Domínio CDR<sub>H</sub>1, Domínio CDR<sub>H</sub>2, e Domínio CDR<sub>H</sub>3. Assim, os termos Domínio CDR<sub>L</sub>1, Domínio CDR<sub>L</sub>2, Domínio CDR<sub>L</sub>3, Domínio CDR<sub>H</sub>1, Domínio CDR<sub>H</sub>2, e Domínio CDR<sub>H</sub>3 são direcionados a polipeptídeos que, quando incorporados a uma proteína, fazem com que a proteína seja capaz de se ligar a um epítipo



independentemente de se essa proteína é um anticorpo tendo cadeias leves ou pesadas ou um diacorpo ou uma molécula de ligação de única cadeia (por exemplo, uma scFv, uma BiTe etc.), ou é outro tipo de proteína.

[217] Da mesma forma, conforme aqui utilizado, o termo "fragmento de ligação à epítipo" significa um fragmento de um anticorpo capaz de se ligar imunoespecificamente a um epítipo, e o termo "sítio de ligação a epítipo" se refere a uma parte de uma molécula compreendendo um fragmento de ligação a epítipo. Um fragmento de ligação a epítipo pode conter qualquer 1, 2, 3, 4, ou 5 dos Domínios de CDR de um anticorpo, ou pode conter todos os 6 dos Domínios de CDR de um anticorpo e, apesar de ser capaz de se ligar imunoespecificamente a esse epítipo, pode apresentar uma imunoespecificidade, afinidade ou seletividade a esse epítipo que difere da desse anticorpo. Preferencialmente, entretanto, um fragmento de ligação a epítipo conterá todos os 6 dos Domínios de CDR desse anticorpo. Um fragmento de ligação a epítipo de um anticorpo pode ser uma única cadeia de polipeptídeos (por exemplo, um scFv), ou pode compreender duas ou mais cadeias de polipeptídeos, cada uma tendo um amino terminal e um carboxi terminal (por exemplo, um diacorpo, um fragmento Fab, um fragmento Fab<sub>2</sub> etc.). A menos que observado especificamente, a ordem dos domínios das moléculas de proteína aqui descritas é na direção "N-terminal para C-terminal".

[218] A invenção particularmente engloba fragmentos de Domínio Variável de cadeia única ("scFv") compreendendo um Domínio VL e/ou VH anti-ADAM9 da invenção assim como moléculas de ligação multiespecíficas compreendendo esses Domínios VL e/ou VH anti-ADAM9. Fragmentos de Domínio

Variável de única cadeia compreendem Domínios VL e VH que são ligados juntamente utilizando um peptídeo "Ligante" curto. Esses Ligantes podem ser modificados para prover funções adicionais, de modo a permitir a afixação de uma droga ou a permitir a afixação a um suporte sólido. As variantes de única cadeia podem ser produzidas de maneira recombinante ou sintética. Para a produção sintética de scFv, um sintetizador automático pode ser utilizado. Para a produção recombinante de scFv, um plasmídeo adequado contendo polinucleotídeo que codifica scFv pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada, seja eucariótica, como células de levedura, vegetal, de inseto ou mamífero, ou procarióticas, como *E. coli*. Polinucleotídeos que codificam scFv de interesse podem ser feitos por manipulações de rotina, como a ligação de polinucleotídeos. O scFv resultante pode ser isolado utilizando técnicas de purificação de proteína padrão, conhecidas na técnica.

[219] A invenção também particularmente engloba a CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub>, CDR<sub>H3</sub>, CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3s</sub> de variantes humanizadas dos anticorpos anti-ADAM9 da invenção, assim como os Domínios VL que contêm qualquer 1, 2, ou 3 dessas CDR<sub>LS</sub> e Domínios VH que contêm qualquer 1, 2, ou 3 dessas CDR<sub>HS</sub>, assim como moléculas de ligação multiespecíficas compreendendo-as. O termo anticorpo "humanizado" se refere a uma molécula quimérica tendo um sítio de ligação a epítipo de uma imunoglobulina de uma espécie não humana e uma estrutura de imunoglobulina restante da molécula que tem base na estrutura e/ou sequência de uma imunoglobulina humana. Anticorpos humanizados são geralmente preparados utilizando técnicas recombinantes. Os anticorpos anti-ADAM9 da presente

invenção incluem variantes humanizadas, quiméricas ou caninizadas de um anticorpo que é aqui designado como "MAB-A". As sequências de polinucleotídeo que codificam os Domínios Variáveis de MAB-A podem ser utilizadas para manipulação genética para gerar derivados de MAB-A possuindo características aprimoradas ou alteradas (por exemplo, afinidade, reatividade cruzada, especificidade *etc.*). O princípio geral na humanização de um anticorpo envolve a retenção da sequência básica da parte de ligação a epítipo do anticorpo, enquanto troca o restante não humano do anticorpo por sequências de anticorpo humano. Há quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. Elas são: (1) determinação do nucleotídeo e sequência de aminoácidos prevista dos domínios variáveis leve e pesado de anticorpo inicial; (2) designação do anticorpo humanizado ou anticorpo caninizado, ou seja, decidindo qual região estrutural de anticorpo utilizar durante o processo de humanização ou caninização; (3) emprego das metodologias/técnicas de humanização ou caninização reais; e (4) transfecção e expressão do anticorpo humanizado. Vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas N<sup>os</sup> 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; e 6.331.415. O termo anticorpo "otimizado" se refere a um anticorpo tendo pelo menos um aminoácido que é diferente do anticorpo original em pelo menos uma região determinante de complementariedade (CDR) na região variável de cadeia leve e pesada, que confere uma afinidade de ligação maior, (por exemplo, de duas ou mais vezes maior) a ADAM9 humano e/ou ADAM9 de macaco *cynomolgus*, conforme comparado ao anticorpo original. Será entendido a partir do ensinamento aqui provido que os anticorpos da invenção podem ser humanizados, otimizados ou tanto humanizado

quanto otimizados.

[220] O sítio de ligação a epítopo pode compreender um Domínio Variável completo fundido a um ou mais Domínios Constantes ou somente as CDRs desse Domínio Variável inserido a regiões estruturais adequadas. Sítios de ligação a epítopo podem ser do tipo selvagem ou podem ser modificados por uma ou mais substituições, inserções ou exclusões de aminoácido. Essa ação elimina parcial ou completamente a capacidade da Região Constante para servir como um imunogênio em receptores (por exemplo, indivíduos humanos); entretanto, a possibilidade de uma resposta imune ao Domínio Variável alheio permanece (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Outra abordagem foca não somente na provisão de regiões constantes derivadas de humano, mas modificando os Domínios Variáveis assim como para reformá-las o mais próximo possível da forma encontrada em imunoglobulinas humanas. É conhecido que os Domínios Variáveis das Cadeias Pesadas e Leves de anticorpos contêm três CDRs que variam em resposta aos antígenos em questão e determinam a capacidade de ligação, flanqueada por quatro regiões estruturais, que são relativamente conservadas em uma determinada espécie e que proveem de maneira putativa um suporte para as CDRs. Quando anticorpos não humanos são preparados em relação a um antígeno particular, os Domínios Variáveis podem ser "reformados" ou "humanizados" ao enxertar CDRs derivadas de anticorpo não humanos em FRs presentes no anticorpo humano a ser modificado. A aplicação desta abordagem para diversos anticorpos foi relatada por Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856.

Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; and Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," *J. Immunol.* 148:1149-1154

Em algumas realizações, anticorpos humanizados preservam todas as sequências de CDR (por exemplo, um anticorpo murino humanizado que contém todas as seis CDRs presentes no anticorpo murino). Em outras realizações, anticorpos humanizados têm uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) que diferem em sequência em relação ao anticorpo original.

[221] Diversas moléculas de anticorpo humanizado compreendendo um sítio de ligação a epítipo derivado de uma imunoglobulina não humana foram descritas, incluindo anticorpos quiméricos tendo Domínio Variável de roedor ou

roedor modificado e suas regiões determinantes de complementariedade (CDRs) associadas fundidas a Domínios Constantes de humano (vide, por exemplo, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies," *Nature* 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224; Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," *J. Immunol.* 138:4534-4538; and Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody," *Cancer Res.* 47:3577-3583). Outras referências descrevem CDRs de roedores enxertadas em uma região estrutural (FR) de suporte humana antes da fusão a um Domínio Constante de anticorpo humano (vide, por exemplo, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536; and Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With From A Mouse," *Nature* 321:522-525). Outra referência descreve CDRs de roedores suportadas por regiões estruturais de roedores folheadas de maneira recombinante (vide, por exemplo, Publicação de Patente Europeia Nº 519.596). Estas moléculas "humanizadas" são projetadas para minimizar resposta imunológica indesejada a moléculas de anticorpo anti-humano de roedores, o que limita a duração e eficácia de aplicações terapêuticas dessas partes em recipientes humanos. Outros métodos de anticorpos de humanização que também podem ser utilizados são revelados por Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates

*The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 e nas Patentes Norte-Americanas Nos 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; e 5.866.692.*

[222] II. Receptores de Fcγ (FcγRs)

[223] Os Domínios CH2 e CH3 das duas Cadeias pesadas de um anticorpo interagem para formar uma "Região Fc" que é um domínio que é reconhecido por "Receptores de Fc" celulares, incluindo, entre outros, Receptores de Fc gama ("FcγRs"). Conforme aqui utilizado, o termo "Região Fc" é utilizado para definir a região C-terminal de uma Cadeia pesada de IgG que compreende os Domínios CH2 e CH3 dessa cadeia. Uma Região Fc é dita por ser de um isotipo, classe ou subclasse de IgG particular se sua sequência de aminoácidos for mais homóloga do que a do isotipo, em relação a outros isotipos de IgG.

[224] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG1 humana exemplar é (SEQ ID NO:1):

[225]        231            240            250            260            270  
280

[226]        APELLGGPSV            FLFPPKPKDT            LMISRTPEVT  
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

[227]        290                    300                    310                    320  
330

[228]        GVEVHNAKTK            PREEQYNSTY            RVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

[229]        340                    350                    360                    370  
380

[230]        PIEKTISKAK            GQPREPQVYT            LPPSREEMTK

NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

[231] 390 400 410 420

430

[232] WESNGQPENN YKTPPVLDs DGSFFLYSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

[233] 440 447

[234] ALHNHYTQKS LSLSPGX

[235] conforme numerado pelo índice EU, conforme estabelecido em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[236] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG2 humana exemplar é (SEQ ID NO:2):

[237] 231 240 250 260 270

280

[238] APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

[239] 290 300 310 320

330

[240] GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH

QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

[241] 340 350 360 370

380

[242] PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK

NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

[243] 390 400 410 420

430

[244] WESNGQPENN YKTPPMLDS DGSFFLYSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

[245] 440 447

[246] ALHNHYTQKS LSLSPGX



[247] conforme numerado pelo índice EU, conforme estabelecido em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[248] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG3 humana exemplar é (SEQ ID NO:3):

[249] 231 240 250 260 270  
280

[250] APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT  
CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

[251] 290 300 310 320  
330

[252] GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

[253] 340 350 360 370  
380

[254] PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK  
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

[255] 390 400 410 420  
430

[256] WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL  
TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

[257] 440 447

[258] ALHNRFTQKS LSLSPGX

[259] conforme numerado pelo índice EU, conforme estabelecido em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[260] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG4 humana exemplar é (SEQ ID NO:4):

[261] 231 240 250 260 270  
280

[262] APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT  
CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

[263] 290 300 310 320  
330

[264] GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

[265] 340 350 360 370  
380

[266] SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK  
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

[267] 390 400 410 420  
430

[268] WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL  
TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

[269] 440 447

[270] ALHNHYTQKS LSLSLGX

[271] conforme numerado pelo índice EU, conforme estabelecido em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[272] Ao longo de toda a presente especificação, a numeração dos resíduos na região constante de uma cadeia pesada de IgG é a do índice EU, como em Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), expressamente incorporada aqui por referência. O termo "o índice EU, conforme estabelecido em Kabat" se refere à numeração dos domínios constantes do anticorpo EU de IgG1 humana provida em Kabat. Aminoácidos dos Domínios Variáveis das cadeias pesada e leve maduras de imunoglobulinas são designados pela posição de um aminoácido na cadeia. Kabat descreveu diversas sequências de aminoácidos

para anticorpos, identificou uma sequência de consenso de aminoácido para cada subgrupo, e atribuiu um número de resíduo a cada aminoácido, e as CDRs são identificadas conforme definido por Kabat (será entendido que a CDR<sub>H1</sub>, conforme definido por Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*," J. Mol. Biol. 196:901-917) inicia cinco resíduos antes). O esquema de numeração de Kabat é extensível a anticorpos não incluídos em seu compêndio ao alinhar o anticorpo em questão com uma das sequências de consenso em Kabat por referência a aminoácidos conservados. Este método para atribuir números de resíduo se tornou padrão no campo e identifica prontamente aminoácidos em posições equivalentes em diferentes anticorpos, incluindo variantes quiméricas ou humanizadas. Por exemplo, um aminoácido na posição 50 de uma cadeia leve de anticorpo humano ocupa a posição equivalente a um aminoácido na posição 50 de uma cadeia leve de anticorpo de camundongo.

[273] Polimorfismos foram observados em diversas posições diferentes dentro das regiões constantes de anticorpo (por exemplo, posições de Fc, incluindo, entre outras, posições 270, 272, 312, 315, 356, e 358, conforme numerado pelo índice EU, conforme estabelecido em Kabat) e, assim, leves diferenças entre a sequência apresentada e as sequências na técnicas anterior podem existir. Formas polimórficas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas. Atualmente, 18 Gm alotipos são conhecidos: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis of Structure, Function And Regulation*." Pergamon,

Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). É especificamente contemplado que os anticorpos da presente invenção podem incorporar qualquer alotipo, isoalotipo, ou haplotipo de qualquer gene de imunoglobulina, e não são limitados ao alotipo, isoalotipo ou haplotipo das sequências providas aqui. Além disso, em alguns sistemas de expressão do resíduo de aminoácido C-terminal (em negrito acima) do Domínio CH3 pode ser removido de maneira pós-translacional. Da mesma forma, o resíduo C-terminal do Domínio CH3 é um resíduo de aminoácido opcional nas moléculas de ligação a ADAM9 da invenção. Especificamente englobadas pela invenção atual são moléculas de ligação a ADAM9 que não possuem o resíduo C-terminal do Domínio CH3. Também especificamente englobadas pela invenção atual são essas construções compreendendo o resíduo de lisina C-terminal do Domínio CH3.

[274] Conforme declarado acima, a Região Fc de anticorpos de IgG naturais é capaz de ligação a Receptores de Fc gama celulares (FcγRs). Essa ligação resulta na transdução de sinais de ativação ou inibidores ao sistema imune. A capacidade dessa ligação para resultar em funções diametricamente opostas reflete diferenças estruturais entre os diferentes FcγRs e, em particular, reflete se o FcγR ligado possui um motivo de ativação com base em tirosina de imunorreceptor ("ITAM") ou um motivo inibidor com base em tirosina de imunorreceptor ("ITIM"). O recrutamento de diferentes enzimas citoplásmicas a estas estruturas dita o resultado das respostas celulares mediadas por FcγR. FcγRs contendo ITAM incluem FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, e ativam o sistema imune quando ligados a Domínios Fc (por exemplo,

Domínios Fc agregados presentes em um complexo imune). FcγRIIB é o único FcγR contendo ITIM natural atualmente conhecido; age para atenuar ou inibir o sistema imune quando ligado a Regiões Fc agregadas. Neutrófilos humanos expressam o gene FcγRIIA. O agrupamento de FcγRIIA por meio de complexos imunes ou ligação cruzada de anticorpo específico serve para agregar ITAMs com quinases associadas a receptor que facilita fosforilação de ITAM. A fosforilação de ITAM serve como um sítio de encaixe para quinase Syk, a ativação disso resulta na ativação de substratos a jusante (por exemplo, PI<sub>3</sub>K). A ativação celular leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios. O gene FcγRIIB é expresso em linfócitos B; seu domínio extracelular é 96% idêntico a FcγRIIA e liga complexos IgG de maneira indistinguível. A presença de um ITIM no domínio citoplasmático de FcγRIIB define esta subclasse inibidora de FcγR. Recentemente, a base molecular desta inibição foi estabelecida. Quando coligado junto a uma FcγR de ativação, o ITIM em FcγRIIB se torna fosforilado e atrai o domínio SH2 da inositol polifosfato 5'-fosfatase (SHIP), que hidrolisa fosfoinositol mensageiros liberados como uma consequência de ativação de tirosina quinase mediada por FcγR contendo ITAM, consequentemente, prevenindo o influxo de Ca<sup>++</sup> intracelular. Assim, a ligação cruzada de FcγRIIB atenua a resposta de ativação à ligação de FcγR e inibe a capacidade de resposta celular. A ativação de célula B, proliferação de célula B e secreção de anticorpo, assim, é cancelada.

[275]        III. Anticorpos biespecíficos, Diacorpos Multiespecíficos e Diacorpos DART®

[276]        A capacidade de um anticorpo se ligar a um epítopo de um antígeno depende da presença e sequência de

aminoácidos dos Domínios VL e VH do anticorpo. A interação de Cadeia leve e Cadeia pesada de um anticorpo e, em particular, a interação de seus Domínios VL e VH forma um dos dois sítios de ligação a epítipo de um anticorpo natural, como uma IgG. Anticorpos naturais são capazes de ligação a somente uma espécie de epítipo (ou seja, são monoespecíficos), embora possam ligar múltiplas cópias daquela espécie de epítipo (isto é, apresentando bivalência ou multivalência).

[277] A funcionalidade de anticorpos pode ser intensificada ao gerar moléculas com base em anticorpo multiespecíficas que podem ligar simultaneamente dois antígenos separados e distintos (ou diferentes epítopos do mesmo antígeno) e/ou ao gerar molécula com base em anticorpo tendo valência maior (ou seja, mais que dois sítios de ligação) para o mesmo epítipo e/ou antígeno.

[278] A fim de prover moléculas tendo maior capacidade que anticorpos naturais, uma ampla variedade de formatos de anticorpo biespecífico recombinante foram desenvolvidos (vide, por exemplo, Publicações PCT Nos WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), a maioria deles usam peptídeos ligantes para fundir um fragmento de ligação a epítipo adicional (por exemplo, um scFv, VL, VH, etc.) a, ou dentro do núcleo de anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM), ou para fundir múltiplos fragmentos de ligação a epítipo (por exemplo, dois fragmentos Fab ou scFvs). Formatos alternativos usam peptídeos ligantes para fundir um fragmento de ligação a epítipo (por exemplo, um scFv, VL, VH etc.) a um domínio de dimerização, como o Domínio CH2-CH3 ou polipeptídeos alternativos (vide, por exemplo, Publicações PCT Nos WO

2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). As Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2013/174873, WO 2011/133886 e WO 2010/136172 revelam um anticorpo triespecífico no qual os Domínios CL e CH1 são trocados de suas respectivas posições naturais e os Domínios VL e VH foram diversificados (vide, por exemplo, Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitir que se liguem a mais de um antígeno. Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2013/163427 e WO 2013/119903 revelam a modificação do Domínio CH2 para conter um aduto de proteína de fusão compreendendo um domínio de ligação. As Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2010/028797, WO 2010/028796 e WO 2010/028795 revelam anticorpos recombinantes cujas Regiões Fc foram substituídos por Domínios VL e VH adicionais, de modo a formar moléculas de ligação trivalentes. As Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2003/025018 e WO 2003/012069 revelam diacorpos recombinantes cujas cadeias individuais contêm Domínios scFv. As Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2013/006544 revelam moléculas Fab multivalentes que são sintetizadas como uma única cadeia de polipeptídeo e, então, sujeitas a proteólise para produzir estruturas heterodiméricas. As Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 e WO 1991/003493 revelam a adição de domínios de ligação adicionais ou grupos funcionais a um anticorpo ou uma parte de anticorpo (por exemplo, adição de um diacorpo à cadeia leve do anticorpo, ou adição de Domínios VL e VH adicionais às cadeias leve e pesada do anticorpo, ou adição de uma proteína de fusão heteróloga ou cadeamento de múltiplos Domínios Fab entre si).

[279] O projeto de um diacorpo tem base no

derivado de anticorpo conhecido como um fragmento de Domínio Variável de única cadeia (scFv). Essas moléculas são feitas ao ligar Domínio Variável de Cadeias Leves e/ou Pesadas ao utilizar um peptídeo de ligação curto. Bird, R.E. et al. (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science 242:423-426) descreve o exemplo de peptídeos de ligação que fazem ponte de aproximadamente 3,5 nm entre o terminal carboxi de um Domínio Variável e o terminal amino do outro Domínio Variável. Ligantes de outras sequências foram projetados e utilizados (Bird et al. (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Protein*," Science 242:423-426). Ligantes podem, por sua vez, ser modificados para funções adicionais, como afixação de drogas ou afixação a suportes sólidos. As variantes de cadeia única podem ser produzidas de maneira recombinante ou sintética. Para a produção sintética de scFv, um sintetizador automático pode ser utilizado. Para a produção recombinante de scFv, um plasmídeo adequado contendo polinucleotídeo que codifica o scFv pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada, eucariota, como levedura, vegetal, células de inseto ou mamífero, ou procariota, como *E. coli*. Polinucleotídeos que codificam um scFv de interesse podem ser feitos por manipulações de rotina, como ligação de polinucleotídeos. Os scFv resultantes podem ser isolados utilizando técnicas de purificação de proteína padrão conhecidas na técnica.

[280] A técnica observou a capacidade de produzir diacorpos que diferem desses anticorpos naturais por serem capazes de ligação de duas ou mais espécies de epítipo diferentes (ou seja, apresentando biespecificidade ou multiespecificidade além de bivalência ou multivalência) (vide, por exemplo, Holliger, P. et al. (1993) "'*Diabodies*'":



*Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388/WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[281] A provisão de moléculas de ligação biespecíficas (por exemplo, diacórpis não monoespecíficos) provê uma vantagem significativa sobre os anticórpis, incluindo, entre outros, uma capacidade de ligação "trans" suficiente para coligar e/ou colocalizar diferentes células que expressam diferentes epítópis e/ou uma capacidade de ligação "cis" suficiente para coligar e/ou colocalizar diferentes moléculas expressas pela mesma célula. Moléculas de

ligação biespecíficas (por exemplo, diacorpos não monoespecíficos) assim, têm aplicações de ampla variedade incluindo terapia e imunodiagnóstico. A biespecificidade permite maior flexibilidade no projeto e engenharia do diacorpo em diversas aplicações, provendo avidéz aprimorada a antígenos multiméricos, a ligação cruzada de antígenos diferentes, e focalização direcionada a tipos celulares específicos que contam com a presença de ambos os antígenos alvo. Devido à sua valência aumentada, baixas taxas de dissociação e rápida liberação da circulação (para diacorpos de tamanho pequeno, em ou abaixo de ~50 kDa), moléculas de diacorpo conhecidas na técnica também apresentaram uso particular no campo de formação de imagem de tumor (Fitzgerald et al. (1997) "*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*," Protein Eng. 10:1221-1225).

[282] A capacidade de produzir diacorpos biespecíficos levou a seu uso (em "trans") para coligar duas células juntamente, por exemplo, ao coligar receptores que estão presentes na superfície de diferentes células (por exemplo, ligação cruzada de células T citotóxicas a células tumorais) (Staerz et al. (1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*," Nature 314:628-631; Holliger et al. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*," Protein Eng. 9:299-305; and Marvin et al. (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). De maneira alternativa (ou adicionalmente), diacorpos biespecíficos (ou tri- ou multiespecíficos) podem ser utilizados (em "cis") para coligar moléculas, como receptores etc., que estão presentes na superfície da mesma célula. C A

coligação de diferentes células e/ou receptores é útil para modular funções efetoras e/ou sinalização de célula imune. Moléculas multiespecíficas (por exemplo, diacorpos biespecíficos) compreendendo sítios de ligação a epítopo podem ser direcionadas a uma superfície determinante de qualquer célula imune, como CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D *etc.*, que são expressos em linfócitos T, células Natural Killer (NK), Células de Apresentação de Antígeno ou outras células mononucleares. Em particular, sítios de ligação a epítopo direcionados a um receptor de superfície celular que está presente nas células efetoras imunes, são úteis na geração de moléculas de ligação multiespecíficas capazes de mediar morte celular redirecionada.

[283] Entretanto, as vantagens acima vêm com custo saliente. A formação destes diacorpos não monoespecíficos requer a montagem de sucesso de dois ou mais polipeptídeos distintos e diferentes (isto é, essa formação requer que os diacorpos sejam formados por meio da heterodimerização de diferentes espécies de cadeia de polipeptídeo). Este fato é o contrário dos diacorpos monoespecíficos, que são formados por meio da homodimerização de cadeias idênticas de polipeptídeo. Devido a pelo menos dois polipeptídeos diferentes (isto é, duas espécies de polipeptídeo) deverem ser providos a fim de formar um diacorpo não monoespecífico, e devido à homodimerização desses polipeptídeos levar a moléculas inativas (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588) a produção desses polipeptídeos deve ser realizada de modo que a impedir a ligação covalente entre

polipeptídeos da mesma espécie (isto é, de modo a impedir a homodimerização) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588). A técnica, portanto, ensinou a associação não covalente desses polipeptídeos (vide, por exemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; and Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)

[284] Entretanto, a técnica reconheceu que diacorpos biespecíficos compostos de polipeptídeos associados de maneira não covalente são instáveis e prontamente se dissociam em monômeros não funcionais (vide, por exemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

[285] Frente a este desafio, a técnica teve sucesso em desenvolver diacorpos não monoespecíficos, heterodiméricos, ligados de maneira covalente, estáveis denominados diacorpos DART®; vide, por exemplo, Patentes

Norte-Americanas N<sup>os</sup> 9.296.816 e 9.284.375 e Publicações de Patente Norte-Americana N<sup>os</sup> 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; WO 2012/018687; WO 2012/162068; 2010/0174053; WO 2010/080538; 2009/0060910; 2007-0004909; Publicações de Patente Europeia N<sup>os</sup> EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221; EP 1868650; e Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665; e Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells," PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform," Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; and Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Esses diacorpos compreendem dois ou mais polipeptídeos complexados de maneira covalente e envolvem a engenharia de um ou mais resíduos de cisteína em

cada uma das espécies de polipeptídeo empregadas que permitem ligações de dissulfeto para formar e, com isso, ligar de maneira covalente um ou mais pares dessas cadeias de polipeptídeos entre si. Por exemplo, a adição de um resíduo de cisteína ao C-terminal dessas construções foi apresentada para permitir a ligação do dissulfeto entre as cadeias de polipeptídeos envolvidas, estabilizando o diacorpo resultante sem interferir nas características de ligação de diacorpo. Essas moléculas podem ser feitas para serem biespecíficas (ou multiespecíficas) e, assim, podem ser feitas para coligarem duas ou mais moléculas. Essa coligação permite que se proveja uma imunoterapia aprimorada. Adicionalmente, devido às cadeias de polipeptídeos individuais dessas moléculas formarem um complexo ligado de maneira covalente, as moléculas apresentam estabilidade bem maior do que diacorpos envolvendo cadeias de polipeptídeos ligadas de maneira não covalente.

[286] Recentemente, moléculas tri e multivalentes incorporando dois domínios de ligação do tipo diacorpo e um domínio do tipo não diacorpo e uma Região Fc foram descritas (vide, por exemplo, Publicações PCT Nos WO 2015/184207 e WO 2015/184203). Essas moléculas de ligação podem ser utilizadas para gerar moléculas mono, bi ou triespecíficas. A capacidade de ligar três epítomos diferentes provê capacidades aprimoradas.

[287] Construções alternativas são conhecidas na técnica para aplicações nas quais uma molécula tetravalente é desejável, mas um Fc não é necessário, incluindo, entre outros, anticorpos tandem tetravalentes, também mencionados como "TandAbs" (vide, por exemplo Publicações de Patente Norte-Americana Nos 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-

020667 2013-0189263; Publicações de Patente Europeia N<sup>os</sup> EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 e EP 1293514; Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 1999/057150, WO 2003/025018, e WO 2013/013700) que são formados pela homodimerização de duas cadeias de polipeptídeos idênticas, cada uma possuindo um Domínio VH1, VL2, VH2, e VL2.

[288] IV. ADAM9

[289] Um polipeptídeo de ADAM9 humano representativo (Sequência NCBI NP\_003807, incluindo uma sequência de sinal de 28 resíduos de aminoácidos, apresentada sublinhada) tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:5):

[290]	<u>MGSGARFSPG</u>	<u>TLRVRWLLLL</u>	<u>GLVGPVLGAA</u>	
RPGFQQTSHL	SSYEIITPWR	LTRERREAPR	PYSKQVSYVI	QAEGKEHIIH
LERNKDLLPE	DFVVYTYNKE	GTLITDHPNI	QNHCHYRGYV	EGVHNSSIAL
SDCFGLRGLL	HLENASYGIE	PLQNSSHFEH	IIYRMDDVYK	EPLKCGVSNK
DIEKETAKDE	EEEPSPMTQL	LRRRRRAVLPQ	TRYVELFIVV	DKERYDMMGR
NQTAVREEMI	LLANYLDSMY	IMLNIRIVLV	GLEIWTNGNL	INIVGGAGDV
LGNFVQWREK	FLITRRRHDS	AQLVLKKGFG	GTAGMAFVGT	VCSRSHAGGI
NVFGQITVET	FASIVAHELG	HNLGMNHDDG	RDCSCGAKSC	IMNSGASGSR
NFSSCSAEDF	EKLTLNKGGN	CLLNIPKPDE	AYSAPSCGNK	LVDAGEECDC
GTPKECELDP	CCEGSTCKLK	SFAECAYGDC	CKDCRFLPGG	TLCRGKTSEC
DVPEYCNSS	QFCQPDVFIQ	NGYPCQNNKA	YCYNGMCQYY	DAQCQVIFGS
KAKAAPKDCF	IEVNSKGDRF	GNCGFSGNEY	KKCATGNALC	GKLQCENVQE
IPVFGIVPAI	IQTPSRGTKC	WGVDFQLGSD	VPDPGMVNEG	TKCGAGKICR
NFQCVDAVL	NYDCDVQKKC	HGHGVCNSNK	NCHCENGWAP	PNCETKGYGG
SVDSGPTYNE	MNTALRDGLL	VFFFLIVPLI	VCAIFIFIKR	DQLWRSYFRK
KRSQTYESDG	KNQANPSRQP	GSVPRHVSPV	TPPREVPIYA	NRFVAVPTYAA
KQPQQFSPRP	PPPQPKVSSQ	GNLIPARPAP	APPLYSSLT	

[291] Dos 819 resíduos de aminoácido de ADAM9 (SEQ ID NO:5), resíduos 1-28 são uma sequência de sinal, resíduos 29-697 são o Domínio Extracelular, resíduos 698-718

são o Domínio de Transmembrana, e resíduos 719-819 são o Domínio Intracelular. Três domínios estruturais são localizados dentro do Domínio Extracelular: um Domínio de metaloprotease de Zinco da Família Reprolisina (M12B) (em aproximadamente resíduos 212-406); um Domínio de Desintegrina (em aproximadamente resíduos 423-497); e um Domínio semelhante a EGF (em aproximadamente resíduos 644-697). Diversas modificações e isoformas pós-translacionais foram identificadas e a proteína é clivada proteoliticamente na rede trans-Golgi antes de atingir a membrana plasmática para gerar uma proteína madura. A remoção do pro-domínio ocorre por meio de clivagem em dois sítios diferentes. Processados mais provavelmente por uma convertase pro-proteína, como furina, no limite entre o pro-domínio e o domínio catalítico (Arg-205/Ala-206). Um sítio de convertase pro-proteína de clivagem a montante adicional (Arg-56/Glu-57) tem uma função importante na ativação de ADAM9.

[292] Um polipeptídeo de ADAM9 de macaco *cynomolgus* representativo (Sequência NCBI XM\_005563126.2, incluindo uma possível sequência de sinal de 28 resíduos de aminoácidos, apresentada sublinhada) tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:6):

[293]	<u>MGSGVGSPSG</u>	<u>TLRVRWLLLL</u>	<u>CLVGPVLGAA</u>	
RPGFQQTSHL	SSYEIITPWR	LTRERREAPR	PYSKQVSYLI	QAEGKEHIIH
LERNKDLLPE	DFVVYTYNKE	GTVITDHPNI	QNHCHFRGYV	EGVYNSSVAL
SNCFGLRGLL	HLENASYGIE	PLQNSSHFEH	IIYRMDDVHK	EPLKCGVSNK
DIEKETTKDE	EEPPSMTQL	LRRRAVLPO	TRYVELFIVV	DKERYDMMGR
NQTAVREEMI	LLANYLDSMY	IMLNIRIVLV	GLEIWTNGNL	INIAGGAGDV
LGNFVQWREK	FLITRRRHDS	AQLVLKKGFG	GTAGMAFVGT	VCSRSHAGGI
NVFGHITVET	FASIVAHEL	HNLMNHHDDG	RDCSCGAKSC	IMNSGASGSR



NFSSCSAEDF	EKLTLNKGGN	CLLNIPKPDE	AYSAPSCGNK	LVDAGEECD
GTPKECELD	CCEGSTCKLK	SFAECAYGDC	CKDCRFLPGG	TLCRGKTSEC
DVPEYCNSS	QFCQPDVFIQ	NGYPCQNNKA	YCYNGMCQYY	DAQCQVIFGS
KAKAAPKDCF	IEVNSKGDRF	GNCGFSGNEY	KKCATGNALC	GKLQCENVQE
IPVFGIVPAI	IQTSPSRGTKC	WGVDFQLGSD	VPDPGMVNEG	TKCGADKICR
NFQCVDAVL	NYDCDIQKKC	HGHGVCNSNK	NHCENGWAP	PNCETKGYGG
SVDSGPTYNE	MNTALRDGLL	VFFFLIVPLI	VCAIFIFIKR	DQLWRRYFRK
KRSQTYESDG	KNQANPSRQP	VSVPRHVSPV	TPPREVPIYA	NRFPVPTYAA
KQPQQFPSRP	PPPQPKVSSQ	GNLIPARPAP	APPLYSSLT	

[294] O Domínio de metaloprotease de Zinco da Família Reprolisina (M12B) da proteína está aproximadamente nos resíduos 212-406); o Domínio de Desintegrina da proteína está aproximadamente nos resíduos 423-497.

[295] Em determinadas realizações, moléculas de ligação a ADAM9 da invenção (por exemplo, scFvs, anticorpos, diacorpos biespecíficos etc.) são caracterizadas por um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete ou oito dos seguintes critérios:

(1) a capacidade de ligar imunoespecificamente ADAM9 humano conforme expresso de maneira endógena na superfície de uma célula neoplásica;

(2) ligar especificamente ADAM9 humano e de primata não humano (por exemplo, ADAM9 de macaco *cynomolgus*) com uma afinidade de ligação semelhante;

(3) ligar especificamente ADAM9 humano com uma constante de ligação de equilíbrio ( $K_D$ ) de 4 nM ou menos;

(4) ligar especificamente ADAM9 de primata não humano com uma constante de ligação de equilíbrio ( $K_D$ ) de 4 nM ou menos

(5) ligar especificamente ADAM9 humano com uma

constante de associação ( $k_a$ ) de  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  ou mais;

(6) ligar especificamente ADAM9 de primata não humano com uma constante de associação ( $k_a$ ) de  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  ou mais;

(7) ligar especificamente ADAM9 humano com uma constante de dissociação ( $k_d$ ) de  $1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  ou menos;

(8) ligar especificamente ADAM9 de primata não humano com uma constante de dissociação ( $k_d$ ) de  $9 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  ou menos;

(9) otimizado para ter intensificação de pelo menos 100 vezes (por exemplo, pelo menos 100 vezes, pelo menos 150 vezes, pelo menos 200 vezes, pelo menos 250 vezes, pelo menos 300 vezes, pelo menos 350 vezes, pelo menos 400 vezes, pelo menos 450 vezes, pelo menos 500 vezes, pelo menos 550 vezes, ou pelo menos 600 vezes de intensificação) na afinidade de ligação (por exemplo, conforme medida por análise BIACORE®) a ADAM9 cino e retém ligação de alta afinidade a ADAM9 humano (por exemplo, conforme medida por análise BIACORE®) conforme comparado ao anticorpo original quimérico ou murino.

[296] Conforme aqui descrito, as constantes de ligação de uma molécula de ligação a ADAM9 podem ser determinadas utilizando ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, por meio de uma análise BIACORE®. Os dados de ressonância de plasmon de superfície podem ser ajustados a um modelo de ligação de Langmuir de 1:1 ( $k_a$   $k_d$  simultâneos) e uma constantes de ligação de equilíbrio  $K_D$  calculadas da proporção de constantes de taxa  $k_d/k_a$ . Essas constantes de ligação podem ser determinadas para uma molécula de ligação a ADAM9 monovalente (ou seja, uma molécula compreendendo um único sítio de ligação a epítipo de ADAM9), uma molécula de ligação a ADAM9

bivalente (ou seja, uma molécula compreendendo dois sítios de ligação a epítipo de ADAM9), ou moléculas de ligação a ADAM9 tendo maior valência (por exemplo, uma molécula compreendendo três, quatro, ou mais sítios de ligação a epítipo de ADAM9).

[297] A presente invenção particularmente engloba moléculas de ligação a ADAM9 (por exemplo, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes *etc.*) compreendendo Domínio(s) Variável(s) de Cadeia Leve (VL) anti-ADAM9 e Domínio(s) Variável(s) de Cadeia Pesada (VH) anti-ADAM9 que se liga imuno especificamente a um epítipo de um polipeptídeo de ADAM9 humano. A menos que declarado de outra forma, todas essas moléculas de ligação a ADAM9 são capazes de se ligarem imuno especificamente a ADAM9 humano. Conforme aqui utilizados, esses Domínios Variáveis de ADAM9 são mencionados como "VL anti-ADAM9" e "VH anti-ADAM9," respectivamente.

[298] V. Anticorpos Murinos Anti-ADAM9 humano

[299] Um anticorpo murino anti-ADAM9 que bloqueia a atividade de processamento de proteína alvo de ADAM9, é internalizado e tendo atividade anti-tumoral identificada (vide, por exemplo, Patente Norte-Americana Nº 8.361.475). Esse anticorpo, designado nas Patentes Norte-Americanas Nºs 7.674.619 e 8.361.475 como um anticorpo "anti-KID24", produzido por clone hibridoma ATCC PTA-5174, é designado aqui como "MAB-A". MAB-A apresenta forte ligação preferencial a tumores sobre tecidos normais (vide, Figuras 7A-7C). MAB-A apresentou pouca ou nenhuma coloração por um amplo quadro de tipos celulares normais (Tabela 1).

Tabela 1	
Tecido	MAB-A (1,25 µg/mL)
Adrenal	Negativo
Bexiga	Negativo
Medula óssea	Negativo
Mama	Negativo
Cerebelo	Negativo
Cérebro	ND
Cérvix	Negativo
Cólon	Negativo
Esôfago	Músculo Liso +/- para 1+ (gr c) <5%
Duto Ovariano	Negativo
Coração	Negativo
Rins	Negativo
Fígado	Negativo
Pulmão	Negativo
Linfonodo	Negativo
Ovário	Negative
Pâncreas	Muito raro (possível acinar) 1+ (c)
Paratireoide	Células Parênquimas de Epitélio 1+ (gr c), 1% Células (células principais favorecidas) 2+ (m,c) 5% 1+ (m,c) 10% principalmente apical
Glândula Pituitária	Células de Lobo posterior (possivelmente, células neurais e/ou pituicitos 1+ (c>m) <5%
Placenta	Células de alinhamento vascular dentro de placa coriônica 1+ (gr c>m) Células Mesenquimais de placa coriônica 1-2+ (gr c), 5%

Tabela 1	
Tecido	MAB-A (1,25 µg/mL)
Próstata	Epitélio glandular 2+ (gr c) 5% e 1+ (gr c) 5%
Retina + Corpo Ciliar	Negativo a favor (camada epi pigmentada 3-4+ (gr c) devido a pigmento não colorido)
Glândula Submandibular	Ductal epi +/- (c) 10%
Musculoesquelético	Negativo
Pele	Negativo
Intestino Delgado	Negativo
Medula Espinhal	Neuropil 1+ (gr c) <1%
Baço	Negativo
Estômago	Negativo
Testículos	Tubo seminífero 1+ (gr c) <5% Células intersticiais (possivelmente, células Leydig) 2-3+ (gr c) <5% e 1+ (gr c) 10%
Tireoide	Negativo
Amígdala	Endo células 2-3+ (c,m) <5% e 1+ (m,c) 15%
Ureter	Epitélio Transicional 1+ (m,c) <5% e 1+ (m,c) 5%; Endo células 1+ (c) <5%
Útero	Negativo
Pellet de Célula A498	2-3+ (m,c), 50%, 1+ (m,c) 45%

[300] Conforme apresentado nas Figuras 8A-8B, MAB-A se liga a ADAM9 humano com alta afinidade, mas se liga a ADAM9 de primata não humano (por exemplo, macaco *cynomolgus*) em uma extensão menor.

[301] As sequências de aminoácidos dos Domínios VL e VH de MAB-A são providas abaixo. Os Domínios VH e VL de MAB-A foram humanizados e as CDRs otimizadas para melhorar a afinidade e/ou remover possíveis desvantagens de aminoácidos. A CDR<sub>H3</sub> foi adicionalmente otimizada para intensificar a ligação a ADAM9 de primata não humano, enquanto mantém sua alta afinidade para ADAM9 humano.

[302] As moléculas de ligação a ADAM9 anti-humano preferidas da presente invenção possuem 1, 2 ou todas as 3 das CDR<sub>Hs</sub> de um Domínio VH e/ou 1, 2 ou todas as 3 das CDR<sub>Ls</sub> do Domínio VL de uma variante otimizada de MAB-A, e preferencialmente ainda possui as regiões estruturais ("FRs") humanizadas dos Domínios VH e/ou VL de MAB-A humanizado. Outras moléculas de ligação a ADAM9 anti-humano preferidas da presente invenção possuem os Domínios VH e/ou VL completos de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A. Essas moléculas de ligação a ADAM9 anti-humanos preferidas incluem anticorpos, anticorpos biespecíficos (ou multiespecíficos), anticorpos quiméricos ou humanizados, BiTcs, diacorpos etc., assim como essas moléculas de ligação que adicionalmente compreendem uma ou uma Região Fc variante ou que ocorre naturalmente.

[303] A invenção particularmente se refere a moléculas de ligação a ADAM9 compreendendo um domínio de ligação a ADAM9 que possui:

(A) (1) as três CDR<sub>Hs</sub> do Domínio VH de MAB-A; e

[304] (2) as quatro FRs do Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[305] (B) (1) as três CDR<sub>Ls</sub> do Domínio VL de MAB-A; e

[306] (2) as quatro FRs do Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[307] (C) as três CDR<sub>HS</sub> do Domínio VH de uma variante otimizada de MAB-A; e as três CDR<sub>LS</sub> do Domínio VL de MAB-A; ou

[308] (D) as três CDR<sub>HS</sub> do Domínio VH de MAB-A; e as três CDR<sub>LS</sub> do Domínio VL de uma variante otimizada de MAB-A; ou

[309] (E) as três CDR<sub>HS</sub> do Domínio VH de uma variante otimizada de MAB-A; e as três CDR<sub>LS</sub> do Domínio VL de um MAB-A otimizado; ou

[310] (F) (1) as três CDR<sub>HS</sub> do Domínio VH de uma variante otimizada de MAB-A; e

[311] (2) as quatro FRs do Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[312] (G) (1) as três CDR<sub>LS</sub> do Domínio VL de uma variante otimizada de MAB-A; e

[313] (2) as quatro FRs do Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

[314] (H) (1) o Domínio VH de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A; e

[315] (2) o Domínio VL de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A. Anticorpo Murino "MAB-A"

[316] A sequência de aminoácidos do Domínio VH do anticorpo murino anti-ADAM9 MAB-A é SEQ ID NO:7 (os resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[317] QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT  
SYWMHWVKQR PGQGLEWIGE IIPINGHTNY NEKFKSKATL TLDKSSSTAY  
 MQLSSLASED SAVYYCARGG YYYGSRDYF DYWGQGTTLT VSS

[318] A sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>

de MAB-A é (SEQ ID NO:8): SYWMH.

[319] A sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H</sub>2 de MAB-A é (SEQ ID NO:9): EIIPINGHTNYNEKFKS.

[320] A sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H</sub>3 de MAB-A é (SEQ ID NO:10): GGYYYYGSRDYFDY.

[321] A sequência de aminoácidos do Domínio VL do anticorpo murino anti-ADAM9 MAB-A é SEQ ID NO:11 (os resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[322] DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD  
YDGDSYMNWY QQIPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH  
 PVEEEDAATY YCQQSHEDPF TFGGGTKLEI K

[323] A sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L</sub>1 de MAB-A é (SEQ ID NO:12): KASQSVDYDGDSYMN.

[324] A sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L</sub>2 de MAB-A é (SEQ ID NO:13): AASDLES.

[325] A sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L</sub>3 de MAB-A é (SEQ ID NO:14): QQSHEDPFT.

[326] VI. Domínios VL e VH anti-ADAM9 Humanizados/Otimizados Exemplos

#### 1. Domínios VH Variantes de MAB-A

[327] As sequências de aminoácidos de determinados Domínios VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferidos de MAB-A são variantes do Domínio VH de ADAM9 de MAB-A (SEQ ID NO:7) e são representadas por SEQ ID NO:15 (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[328] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWX<sub>1</sub>HWVRQA

[329] PGKGLEWVGE IIPIX<sub>2</sub>GHTNY NEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RFTI  
 SLDNSKNTLY



[330] LQMGSLRAED      TAVYYCARGG      YYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>  
DYWGQGTTVT VSS

[331]      em que: X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, e X<sub>6</sub> são selecionados de maneira independente,

[332]      em que: X<sub>1</sub> é M ou I; X<sub>2</sub> é N ou F;

[333]      X<sub>3</sub> é K ou R; X<sub>4</sub> é K ou Q;

[334]      X<sub>5</sub> é S ou G, e X<sub>6</sub> é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D;

[335]      em que: X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, e X<sub>11</sub> são selecionados de modo que:

(A) quando

[341]      (B)

X<sub>6</sub> for      quando X<sub>6</sub> for F, Y ou W:

P:

[342]      X<sub>7</sub> é N ou

[336]      X<sub>7</sub> é K ou H;

R;

[343]      X<sub>8</sub> é S ou

[337]      X<sub>8</sub> é F ou K;

M;

[344]      X<sub>9</sub> é G ou

[338]      X<sub>9</sub> é G;      A;

[339]      X<sub>10</sub> é W ou

[345]      X<sub>10</sub> é T ou

F; e      V; e

[340]      X<sub>11</sub> é M, L

[346]      X<sub>11</sub> é M, L

ou K;      ou K;

[347]      (C)

[353]      (D)

quando X<sub>6</sub> for I, L ou V:

quando X<sub>6</sub> for T:

[348]      X<sub>7</sub> é G;

[354]      X<sub>7</sub> é G;

[349]      X<sub>8</sub> é K;

[355]      X<sub>8</sub> é K, M

[350]      X<sub>9</sub> é G ou ou N;

A;

[356]      X<sub>9</sub> é G;

[351]      X<sub>10</sub> é V; e

[357]      X<sub>10</sub> é V ou

T; e

[352]  $X_{11}$  é M, L ou K; [358]  $X_{11}$  é L ou M;

[359] (E) quando  $X_6$  for G: e [365] (F) quando  $X_6$  for D:

[360]  $X_7$  é G; [366]  $X_7$  é S;  
 [361]  $X_8$  é S; [367]  $X_8$  é N;  
 [362]  $X_9$  é G; [368]  $X_9$  é A;  
 [363]  $X_{10}$  é V; e [369]  $X_{10}$  é V; e  
 [364]  $X_{11}$  é L; [370]  $X_{11}$  é L.

[371] As sequências de aminoácidos de um Domínio VH Anti-ADAM9 humanizado, preferido de MAB-A: VH de hMAB-A(1) (SEQ ID NO:16) e dos determinados Domínios VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferidos de MAB-A:

[372] VH de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:17) VH de hMAB-A(2D) (SEQ ID NO:23)

[373] VH de hMAB-A(3) (SEQ ID NO:18) VH de hMAB-A(2E) (SEQ ID NO:24)

[374] VH de hMAB-A(4) (SEQ ID NO:19) VH de hMAB-A(2F) (SEQ ID NO:25)

[375] VH de hMAB-A(2A) (SEQ ID NO:20) VH de hMAB-A(2G) (SEQ ID NO:26)

[376] VH de hMAB-A(2B) (SEQ ID NO:21) VH de hMAB-A(2H) (SEQ ID NO:27)

[377] VH de hMAB-A(2C) (SEQ ID NO:22) VH de hMAB-A(2I) (SEQ ID NO:28)

[378] e VH de hMAB-A(2J) (SEQ ID NO:29)

[379] são apresentados abaixo (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados em sublinhado único; diferenças relativas a VH de hMAB-A(1) (SEQ ID NO:7) são apresentadas em sublinhado duplo).

[380] VH de hMAB-A(1) (SEQ ID NO:16):

[381] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPINGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[382] VH de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:17):

[383] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[384] VH de hMAB-A(3) (SEQ ID NO:18):

[385] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NERFQGRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[386] VH de hMAB-A(4) (SEQ ID NO:19):

[387] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWIHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NERFQGRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[388] VH de hMAB-A(2A) (SEQ ID NO:20):

[389] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYFNSGTL DYWGQGTTVT VSS

[390] VH de hMAB-A(2B) (SEQ ID NO:21):

[391] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYIGKGVL DYWGQGTTVT VSS

[392] VH de hMAB-A(2C) (SEQ ID NO:22):

[393] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG YYYYPRFGWL DYWGQGTTVT VSS

[394] VH de hMAB-A(2D) (SEQ ID NO:23):

[395] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYTGKGV DYWGQGT VSS

[396] VH de hMAB-A(2E) (SEQ ID NO:24):

[397] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYDSNAVL DYWGQGT VSS

[398] VH de hMAB-A(2F) (SEQ ID NO:25):

[399] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYFHSGTL DYWGQGT VSS

[400] VH de hMAB-A(2G) (SEQ ID NO:26):

[401] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYFNKAVL DYWGQGT VSS

[402] VH de hMAB-A(2H) (SEQ ID NO:27):

[403] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYGGSGVL DYWGQGT VSS

[404] VH de hMAB-A(2I) (SEQ ID NO:28):

[405] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYPRQGFL DYWGQGT VSS

[406] VH de hMAB-A(2J) (SEQ ID NO:29):

[407] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS

SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY  
LQMGSLRAED TAVYYCARGG YYYYYNSGTL DYWGQGT VSS

[408] Sequências de aminoácidos humanos adequadas para as FRs de um Domínio VH anti-ADAM9 humanizado e/ou otimizado de MAB-A são:

[409] Domínio FR<sub>H1</sub> (SEQ ID NO:30):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS

[410] Domínio FR<sub>H</sub>2 (SEQ ID NO:31):  
WVRQAPGKGLEWVG

[411] Domínio FR<sub>H</sub>3 (SEQ ID NO:32):  
RFTISLDNSKNTLYLQMGSLRAEDTAVYYCAR

[412] Domínio FR<sub>H</sub>4 (SEQ ID NO:33): WGQGTTVTVSS

[413] Sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio CDR<sub>H</sub>1 de um Domínio VH anti-ADAM9 de MAB-A incluem:

[414] SEQ ID NO:8: SYWMH

[415] SEQ ID NO:34: SYWIH

[416] Sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio CDR<sub>H</sub>2 de um Domínio VH anti-ADAM9 de MAB-A incluem:

[417] SEQ ID NO:9: EIIPINGHTNYNEKFKS

[418] SEQ ID NO:35: EIIPIFGHTNYNEKFKS

[419] SEQ ID NO:36: EIIPIFGHTNYNERFQG

[420] Sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio CDR<sub>H</sub>3 de um Domínio VH anti-ADAM9 de MAB-A incluem:

[421] SEQ ID NO:10: GGYYYYGSRDYFDY

[422] SEQ ID NO:37: GGYYYYFNSGTLDY

[423] SEQ ID NO:38: GGYYYYIGKGVLDY

[424] SEQ ID NO:39: GGYYYYPRFGWLDY

[425] SEQ ID NO:40: GGYYYYTGKGVLDY

[426] SEQ ID NO:41: GGYYYYDSNAVL DY

[427] SEQ ID NO:42: GGYYYYFHSGTLDY

[428] SEQ ID NO:43: GGYYYYFNKAVLDY

[429] SEQ ID NO:44: GGYYYYGGSGVLDY

[430] SEQ ID NO:45: GGYYYYPRQGFLDY

[431] SEQ ID NO:46: GGYYYYYNSGTLDY

[432] Da mesma forma, a presente invenção engloba moléculas de ligação a ADAM9 tendo um domínio VH compreendendo:

(1) um Domínio CDR<sub>H1</sub> tendo a sequência de aminoácidos:

[433] SEQ ID NO:47: SYWX<sub>1</sub>H

[434] em que: X<sub>1</sub> é M ou I;

[435] (2) um Domínio CDR<sub>H2</sub> tendo a sequência de aminoácidos:

[436] SEQ ID NO:48: EIIP<sub>2</sub>IX<sub>2</sub>GHTNYNEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>

[437] em que: X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, e X<sub>5</sub> são selecionados de maneira independente, e

[438] em que: X<sub>2</sub> é N ou F; X<sub>3</sub> é K ou R;

[439] X<sub>4</sub> é K ou Q; e X<sub>5</sub> é S ou G.

[440] e

[441] (3) um Domínio CDR<sub>H3</sub> tendo a sequência de aminoácidos:

[442] SEQ ID NO:49: GGYYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DY

[443] em que: X<sub>6</sub>, é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D, e X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, e X<sub>11</sub> são selecionados de modo que:

(A) quand [449] (B)

o X<sub>6</sub> quando X<sub>6</sub> for F, Y ou W:

for [450] X<sub>7</sub> é N ou

P: H;

[444] X<sub>7</sub> é K ou [451] X<sub>8</sub> é S ou

R; K;

[445] X<sub>8</sub> é F ou [452] X<sub>9</sub> é G ou

M; A;

[446] X<sub>9</sub> é G;

[447]	X <sub>10</sub> é W	[453]	X <sub>10</sub> é T
ou F; e		ou V; e	
[448]	X <sub>11</sub> é M,	[454]	X <sub>11</sub> é M,
L ou K;		L ou K;	
[455]	(C)	[461]	(D)
quando X <sub>6</sub> for I, L ou V:		quando X <sub>6</sub> for T:	
[456]	X <sub>7</sub> é G;	[462]	X <sub>7</sub> é G;
[457]	X <sub>8</sub> é K;	[463]	X <sub>8</sub> é K, M
[458]	X <sub>9</sub> é G ou ou N;		
A;		[464]	X <sub>9</sub> é G;
[459]	X <sub>10</sub> é V;	[465]	X <sub>10</sub> é V
e		ou T; e	
[460]	X <sub>11</sub> é M,	[466]	X <sub>11</sub> é L
L ou K;		ou M;	
[467]	(E)	[473]	(F)
quando X <sub>6</sub> for G: e		quando X <sub>6</sub> for D:	
[468]	X <sub>7</sub> é G;	[474]	X <sub>7</sub> é S;
[469]	X <sub>8</sub> é S;	[475]	X <sub>8</sub> é N;
[470]	X <sub>9</sub> é G;	[476]	X <sub>9</sub> é A;
[471]	X <sub>10</sub> é V;	[477]	X <sub>10</sub> é V;
e		e	
[472]	X <sub>11</sub> é L;	[478]	X <sub>11</sub> é L.

[479] Uma primeira Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplar de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio VH de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:17), e tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:50):

[480]	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS
SYWMHWVRQA	PGKGLEWVGE	IIPIFGHTNY	NEKFKSRFTI
LQMGSRLRAED	TAVYYCARGG	YYYYGSRDYF	DYWGQGTTVT
VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYPPEPV	TVSWNSGALT
			SGVHTFPAVL

QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDKR	VEPKSCDKTH
TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS
NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP
SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS

CSVMHEALHN HYTQKSLSLS

[481] PGX

[482] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[483] Uma segunda Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplar de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio VH de hMAB-A (2C) Domínio (SEQ ID NO:22), e tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:51):

[484]	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS
SYWMHWVRQA	PGKGLEWVGE	IIPIFGHTNY	NEKFKSRFTI
SLDNSKNTLY			
LQMGSRAED	TAVYYCARGG	YYYYPRFGWL	DYWGQGTFTV
VSSASTKGPS			
VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT
SGVHTFPAVL			
QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDKR
VEPKSCDKTH			
TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV
DVSHEDPEVK			
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL
NGKEYKCKVS			
NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS
LTCLVKGFYP			
SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSGGSF	FLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS			

CSVMHEALHN HYTQKSLSLS

[485] PGX

[486] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[487] Uma terceira Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplar de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio VH de hMAB-A (2I) (SEQ ID NO:28), e tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:52):

[488]	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS
SYWMHWVRQA	PGKGLEWVGE	IIPIFGHTNY	NEKFKSRFTI
SLDNSKNTLY			



LQMGSLRAED	TAVYYCARGG	YYYYPRQGFL	DYWGQGTTVT	VSSASTKGPS
VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDKR	VEPKSCDKTH
TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS
NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP
SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS
CSVMHEALHN	HYTQKSLSL			

[489] PGX

[490] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[491] Conforme aqui providos, os Domínios CH2-CH3 da Região Fc podem ser concebidos, por exemplo, para reduzir a função efetora. Em determinadas realizações, os Domínios CH2-CH3 das Cadeias Pesadas de IgG1 humanizada/otimizada exemplares da invenção compreendem uma ou mais substituições selecionadas dentre: L234A e L235A.

[492] Assim, uma quarta Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplar de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio VH de hMAB-A (2I) (SEQ ID NO:28), e ainda compreende as substituições L234A, e L235A nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (SEQ ID NO:106), sublinhadas abaixo) e tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:202):

[493]	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS
SYWMHWVRQA	PGKGLEWVGE	IIPIFGHTNY	NEKFKSRFTI
LQMGSLRAED	TAVYYCARGG	YYYYPRQGFL	DYWGQGTTVT
VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT
QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDKR
TCPPCPAPE <u>A</u>	<u>A</u> GGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL
NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS
			LTCLVKGFYP

SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS  
CSVMHEALHN HYTQKSLSLS

[494] PGX

[495] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[496] 2. Domínios VL Variantes de MAB-A

[497] As sequências de aminoácidos de Domínios VL anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferidos de MAB-A são variantes do Domínio VL de ADAM9 de MAB-A (SEQ ID NO:11) e são representadas pela SEQ ID NO:53 (resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[498] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCX<sub>12</sub>ASQSVD  
YX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>NWY

[499] QQKPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG  
SGTDFTLTIS

[500] SLEPEDFATY YCQQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PF TFGQGTKLEI  
K

[501] em que: X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub>, e X<sub>17</sub>, são selecionados de maneira independente, e

[502] em que: X<sub>12</sub> é K ou R; X<sub>13</sub> é D ou S;

[503] X<sub>14</sub> é M ou L; X<sub>15</sub> é H ou Y;

[504] X<sub>16</sub> é E ou S; e X<sub>17</sub> é D ou T.

[505] As sequências de aminoácidos de um Domínio VL anti-ADAM9 humanizado preferido de MAB-A: VL(1) de hMAB-A (SEQ ID NO:54), e de determinados Domínios VL anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferidos de MAB-A: VL(2) de hMAB-A (SEQ ID NO:55), VL(3) de hMAB-A (SEQ ID NO:56), e VL(4) de hMAB-A (SEQ ID NO:57), são apresentados abaixo (resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados em sublinhado único; diferenças relativas a VL(1) de hMAB-A (SEQ ID NO:54) são apresentadas em sublinhado duplo).

[506] VL(1) de hMAB-A (SEQ ID NO:54):

[507] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD  
YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS  
 SLEPEDFATY YCQQSHEDPF TFGQGTKLEI K

[508] VL(2) de hMAB-A (SEQ ID NO:55):

[509] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD  
YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS  
 SLEPEDFATY YCQQSHEDPF TFGQGTKLEI K

[510] VL(3) de hMAB-A (SEQ ID NO:56):

[511] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSVD  
YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS  
 SLEPEDFATY YCQQSHEDPF TFGQGTKLEI K

[512] VL(4) de hMAB-A (SEQ ID NO:57):

[513] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSVD  
YSGDSYLNWY QQKPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS  
 SLEPEDFATY YCQQSYSTPF TFGQGTKLEI K

[514] Da mesma forma, sequências de aminoácidos humanos adequados para as FRs de um Domínio VL anti-ADAM9 humanizado e/ou otimizado de MAB-A são:

[515] Domínio FR<sub>L1</sub> (SEQ ID NO:58):  
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC

[516] Domínio FR<sub>L2</sub> (SEQ ID NO:59):

[517] Domínio FR<sub>L3</sub> (SEQ ID NO:60):  
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFATYYC

[518] FR<sub>L4</sub> Domínio (SEQ ID NO:61): FGQGTKLEIK

[519] Sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio CDR<sub>L1</sub> de um Domínio VL anti-ADAM9 incluem:

[520] SEQ ID NO:12: KASQSVDYDGDSYMN

[521] SEQ ID NO:62: KASQSVDYSGDSYMN

[522] SEQ ID NO:63: RASQSVDYSGDSYMN

[523] SEQ ID NO:64: RASQSVDYSGDSYLN

[524] Sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio CDR<sub>L</sub>3 de um Domínio VL anti-ADAM9 incluem:

[525] SEQ ID NO:14: QQSHEDPFT

[526] SEQ ID NO:65: QQSYSTPFT

[527] Da mesma forma, a presente invenção engloba Domínio VL de anticorpo anti-ADAM9 compreendendo:

(1) um Domínio CDR<sub>L</sub>1 tendo a sequência de aminoácidos:

[528] SEQ ID NO:66: X<sub>12</sub>ASQSVDYX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>N

[529] em que: X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, são selecionados de maneira independente, e

[530] em que: X<sub>12</sub> é K ou R; X<sub>13</sub> é D ou S; e X<sub>14</sub> é M ou L;

[531] (2) um Domínio CDR<sub>L</sub>2 tendo a sequência de aminoácidos:

[532] SEQ ID NO:13: AASDLES

[533] e

[534] (3) um Domínio CDR<sub>L</sub>3 tendo a sequência de aminoácidos:

[535] SEQ ID NO:67: QQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PFT

[536] em que: X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub>, e X<sub>17</sub>, são selecionados de maneira independente, e

[537] em que: X<sub>15</sub> é H ou Y; X<sub>16</sub> é E ou S; e X<sub>17</sub> é D ou T.

[538] Uma Cadeia Leve de IgG1 humanizada/otimizada exemplar de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio VL de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:55), e tem a

sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:68):

```

[539]      DIVMTQSPDS      LAVSLGERAT      ISCKASQSVD
YSGDSYMNWY  QOKPGQPPKL  LIYAASDLES  GIPARFSGSG  SGTDFTLTIS
SLEPEDFATY  YCQQSHEDPF  TFGQGTKLEI  KRTVAAPSVF  IFPPSDEQLK
SGTASVVCLL  NNFYPREAKV  QWKVDNALQS  GNSQESVTEQ  DSKDSTYSLS
STLTLSKADY  EKHKVYACEV  THQGLSSPVT  KSFNRGEC

```

[540] Assim, a presente invenção contempla de maneira adicionalmente expressa as moléculas de ligação a ADAM9 (por exemplo, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes etc.) que se ligam imunoespecificamente a um epítipo de um polipeptídeo de ADAM9 humano, e que compreende quaisquer das CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub>, CDR<sub>H3</sub>, CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub>, ou CDR<sub>L3</sub> de MAB-A providas acima e, particularmente, contempla essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem uma dentre a CDR<sub>H1</sub> de MAB-A provida acima, uma dentre a CDR<sub>H2</sub> de MAB-A provida acima, uma dentre a CDR<sub>H3</sub> de MAB-A provida acima, uma dentre a CDR<sub>L1</sub> de MAB-A provida acima, uma dentre a CDR<sub>L2</sub> de MAB-A provida acima, e uma dentre a CDR<sub>L3</sub> de MAB-A provida acima.

[541] A invenção ainda contempla essas moléculas de ligação a ADAM9 que ainda compreendem quaisquer das FR<sub>H1</sub>, FR<sub>H2</sub>, FR<sub>H3</sub>, ou FR<sub>H4</sub>, FR<sub>L1</sub>, FR<sub>L2</sub>, FR<sub>L3</sub>, ou FR<sub>L4</sub> de MAB-A humanizado descritas acima e, particularmente, contempla essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem FR<sub>H1</sub>, FR<sub>H2</sub>, FR<sub>H3</sub>, e FR<sub>H4</sub>, e/ou que compreendem FR<sub>L1</sub>, FR<sub>L2</sub>, FR<sub>L3</sub>, FR<sub>L4</sub> e FR<sub>H1</sub>.

[542] Em algumas realizações, as moléculas de ligação a ADAM9 incluem um Domínio CDR<sub>H1</sub>, um Domínio CDR<sub>H2</sub>, e um Domínio CDR<sub>H3</sub> e um Domínio CDR<sub>L1</sub>, um Domínio CDR<sub>L2</sub>, e um Domínio CDR<sub>L3</sub> tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

(a) SEQ ID NOs:8, 35 e 10 e SEQ ID NOs:62, 13, e

14, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs:8, 35 e 10 e SEQ ID NOs:63, 13, e 14, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs:8, 36 e 10 e SEQ ID NOs:63, 13 e 14, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs:34, 36 e 10 e SEQ ID NO:64, 13 e 65, respectivamente

(e) SEQ ID NOs:8, 35 e 37 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(f) SEQ ID NOs:8, 35 e 38 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs:8, 35 e 39 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(h) SEQ ID NOs:8, 35 e 40 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(i) SEQ ID NOs:8, 35 e 41 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(j) SEQ ID NOs:8, 35 e 42 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(k) SEQ ID NOs:8, 35 e 43 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(l) SEQ ID NOs:8, 35 e 44 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente;

(m) SEQ ID NOs:8, 35 e 45 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente; e

(n) SEQ ID NOs:8, 35 e 46 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente.

[543] Em realizações particulares, as moléculas de ligação a ADAM9 incluem um Domínio CDR<sub>H1</sub>, um Domínio CDR<sub>H2</sub>, e um Domínio CDR<sub>H3</sub> e um Domínio CDR<sub>L1</sub>, um Domínio CDR<sub>L2</sub>, e um

Domínio CDR<sub>L3</sub> tendo as sequências de SEQ ID NOs:8, 35 e 45 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14, respectivamente.

[544] Em algumas realizações, as moléculas de ligação a ADAM9 da invenção incluem um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, ou são 100% idênticas às sequências como segue:

[545] SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[546] SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

[547] SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

[548] SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:57, respectivamente;

[549] SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[550] SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[551] SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[552] SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[553] SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[554] SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[555] SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

[556] SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55,

respectivamente;

[557] SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e

[558] SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[559] Por “substancialmente idênticas” ou “idênticas” entende-se um polipeptídeo que apresenta pelo menos 50% de identidade a uma sequência de aminoácidos de referência (por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácidos descritas aqui). Preferencialmente, essa sequência é pelo menos 60%, mais preferencialmente, pelo menos 80% ou pelo menos 85%, e mais preferencialmente, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, ou até 100% idêntica no nível de aminoácido à sequência de polipeptídeo utilizada para comparação.

[560] Identidade de sequência é tipicamente medida utilizando o software de análise de sequência (por exemplo, Pacote de Software de Análise de Sequência do Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP, ou PILEUP/PRETTYBOX). Esse software combina sequências idênticas ou semelhantes ao atribuir graus de homologia a diversas substituições, exclusões e/ou outras modificações. Substituições conservadoras tipicamente incluem substituições dentro dos seguintes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; e fenilalanina, tirosina. Em uma abordagem exemplar para a determinação do grau de identidade, um programa BLAST pode ser utilizado, com uma pontuação de probabilidade entre  $e^{-3}$  e  $e^{-}$



100 indicando uma sequência estritamente relacionada.

[561] Em realizações particulares, as moléculas de ligação a ADAM9 da invenção incluem um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, ou são 100% idênticas às sequências de SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[562] Em determinadas realizações, as moléculas de ligação a ADAM9 da invenção compreendem uma sequência de cadeia pesada e uma cadeia leve como segue:

[563] SEQ ID NO:50 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

[564] SEQ ID NO:51 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

[565] SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente; e

[566] SEQ ID NO:202 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

[567] A presente invenção também contempla expressamente as moléculas de ligação a ADAM9 (por exemplo, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes etc.) que se ligam imunoespecificamente a um epítipo de um polipeptídeo de ADAM9 humano, e que compreendem quaisquer dos Domínios VL ou VH de MAB-A anti-ADAM9 humanizados/otimizados providos acima. A presente invenção particularmente contempla essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem quaisquer das seguintes combinações de Domínios VL ou VH anti-ADAM9 humanizado:

Combinações de VH de hMAB-A/VL de hMAB-A	
VH de hMAB-A(1) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2D) / VL de hMAB-A(1)
VH de hMAB-A(1) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2D) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(1) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2D) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(1) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2D) / VL de hMAB-A(4)
VH de hMAB-A(2) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2E) / VL de hMAB-A(1)
VH de hMAB-A(2) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2E) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(2) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2E) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(2) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2E) / VL de hMAB-A(4)
VH de hMAB-A(3) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2F) / VL de hMAB-A(1)
VH de hMAB-A(3) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2F) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(3) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2F) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(3) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2F) / VL de hMAB-A(4)
VH de hMAB-A(4) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2G) / VL de hMAB-A(1)
VH de hMAB-A(4) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2G) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(4) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2G) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(4) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2G) / VL de hMAB-A(4)
VH de hMAB-A(2A) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2H) / VL de hMAB-A(1)
VH de hMAB-A(2A) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2H) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(2A) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2H) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(2A) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2H) / VL de hMAB-A(4)
VH de hMAB-A(2B) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2I) / VL de hMAB-A(1)

Combinações de VH de hMAB-A/VL de hMAB-A	
VH de hMAB-A(2B) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2I) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(2B) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2I) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(2B) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2I) / VL de hMAB-A(4)
VH de hMAB-A(2C) / VL de hMAB-A(1)	VH de hMAB-A(2J) / VL de hMAB-A(1)
VH de hMAB-A(2C) / VL de hMAB-A(2)	VH de hMAB-A(2J) / VL de hMAB-A(2)
VH de hMAB-A(2C) / VL de hMAB-A(3)	VH de hMAB-A(2J) / VL de hMAB-A(3)
VH de hMAB-A(2C) / VL de hMAB-A(4)	VH de hMAB-A(2J) / VL de hMAB-A(4)

[568] A presente invenção engloba

especificamente moléculas de ligação a ADAM9 compreendendo (i) um Domínio VL e/ou VH anti-ADAM9 humanizado/otimizado, conforme provido acima, e (ii) uma Região Fc. Em realizações particulares, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção são anticorpos monoclonais compreendendo (i) um Domínio VL e/ou VH anti-ADAM9 humanizado/otimizado, conforme provido acima, e (ii) uma Região Fc. Em outras realizações, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção são selecionadas do grupo consistindo em: anticorpos monoclonais, anticorpos multiespecíficos, anticorpos sintéticos, anticorpos quiméricos, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), Fvs biespecíficos, ligados a dissulfeto (sdFv), BiTEs, diacorpos, e moléculas de ligação trivalentes.

[569] Embora modificações particulares a Domínios VH e VL anti-ADAM9 sejam resumidas acima e comparadas nas Figuras 9A-9B, não é necessário modificar todos ou a maioria destes resíduos ao conceber um Domínio VH ou VL anti-ADAM9 humanizado e/ou otimizado da invenção. A presente

invenção também engloba variações menores dessas sequências VH e VL incluindo, por exemplo, substituições de aminoácido dos resíduos de aminoácido C-terminal e/ou N-terminal que podem ser introduzidas para facilitar a subclonagem.

[570] VII. Receptores de Antígeno Quimérico

[571] As moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser moléculas de única cadeia monoespecíficas, como fragmentos de variável de única cadeia anti-ADAM9 ("scFvs anti-ADAM9") ou Receptores de Antígeno Quimérico anti-ADAM9 ("CARs anti-ADAM9"). Conforme discutido acima, scFvs são feitos ao ligar Domínios Variáveis de Cadeia Leve e Pesada juntamente por meio de um peptídeo de ligação curto. Receptores de Antígeno Quimérico ("CARs") de Primeira Geração compreendem tipicamente o Domínio Intracelular da cadeia CD3  $\zeta$ -, que é o transmissor principal de sinais de Receptores de célula T ("TCRs") endógenos. CARs de segunda geração possuíam domínios de sinalização intracelular adicionais de diversos receptores de proteína coestimulantes (por exemplo, CD28, 41BB, ICOS etc.) fundidos à cauda citoplásmica de CAR, a fim de prover sinais adicionais à célula T. CARs de terceira geração combinam múltiplos domínios de sinalização, como CD3 $\zeta$ -CD28-41BB ou CD3 $\zeta$ -CD28-OX40, a fim de aumentar mais sua potência (Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor," Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells," Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen

*Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia,"* Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62. Receptores de Antígeno Quimérico são discutidos nas Patentes Norte-Americanas N<sup>os</sup> 9.447.194; 9.266.960; 9.212.229; 9.074.000; 8.822.196; e 8.465.743, e nas Publicações de Patente Norte-Americana N<sup>os</sup> 2016/0272718, 2016/0144026, 2016/0130357, 2016/0081314, 2016/0075784, 2016/0058857, 2016/0046729, 2016/0046700, 2016/0045551, 2016/0015750, 2015/0320799, 2015/0307623, 2015/0307564, 2015/0038684, 2014/0134142 e 2013/0280285.

[572] Os CARs anti-ADAM9 da presente invenção compreendem um scFv anti-ADAM9 fundido a um Domínio Intracelular de um receptor. O Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) do scFv anti-ADAM9 são selecionados dentre quaisquer Domínios VL anti-ADAM9 e VH anti-ADAM9 aqui revelados. Preferencialmente, o Domínio VH é selecionado do grupo consistindo em: VH de hMAB-A (1) (SEQ ID NO:16), VH de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:17), VH de hMAB-A(3) (SEQ ID NO:18), VH de hMAB-A(4) (SEQ ID NO:19), VH de hMAB-A(2A) (SEQ ID NO:20), VH de hMAB-A(2B) (SEQ ID NO:21), VH de hMAB-A(2C) (SEQ ID NO:22), VH de hMAB-A(2D) (SEQ ID NO:23), VH de hMAB-A(2E) (SEQ ID NO:24), VH de hMAB-A(2F) (SEQ ID NO:25), VH de hMAB-A(2G) (SEQ ID NO:26), VH de hMAB-A(2H) (SEQ ID NO:27), VH de hMAB-A(2I) (SEQ ID NO:28), e VH de hMAB-A(2J) (SEQ ID NO:29), e o Domínio VL é selecionado do grupo consistindo em: VL de hMAB-A(1) (SEQ ID NO:54), VL de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:55), VL de hMAB-A(3) (SEQ ID NO:56), e VL de

hMAB-A(4) (SEQ ID NO:57). Combinações de Domínios VL anti-ADAM9 e VH anti-ADAM9 humanizado/otimizado e combinações de CDR<sub>HS</sub> e CDR<sub>LS</sub> que podem ser utilizadas para formar esses Receptores de Antígeno Quimérico são apresentados acima.

[573] O Domínio Intracelular dos CARs anti-ADAM9 da presente invenção é preferencialmente selecionado dentre Domínio Intracelular de qualquer dentre: 41BB-CD3ζ, b2c-CD3ζ, CD28, CD28-4-1BB-CD3ζ, CD28-CD3ζ, CD28-FcεRIγ, CD28mut-CD3ζ, CD28-OX40-CD3ζ, CD28-OX40-CD3ζ, CD3ζ, CD4-CD3ζ, CD4-FcεRIγ, CD8-CD3ζ, FcεRIγ, FcεRIγCAIX, Heregulin-CD3ζ, IL-13-CD3ζ, ou Ly49H-CD3ζ (Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor," Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells," Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia," Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62)

[574] VIII. Moléculas de ligação a ADAM9 Multiespecíficas

[575] A presente invenção também é direcionada a moléculas de ligação a ADAM9 multiespecíficas (por exemplo, biespecíficas, triespecíficas etc.) compreendendo um sítio de ligação a epítipo (preferencialmente compreendendo 1, 2 ou

todas as 3 das CDR<sub>H</sub>S de um Domínio VH anti-ADAM9 da invenção e/ou 1, 2 ou todas as 3 das CDR<sub>L</sub>S de um Domínio VL anti-ADAM9 da invenção, ou esse Domínio VH anti-ADAM9 e/ou esse Domínio VL anti-ADAM9) e ainda compreendendo um segundo sítio de ligação a epítopo que se liga imunoesspecificamente a um segundo epítopo, em que esse segundo epítopo é (i) um epítopo diferente de ADAM9, ou (ii) um epítopo de uma molécula que não é ADAM9. Essas moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 preferencialmente compreendem uma combinação de sítios de ligação a epítopo que reconhecem um conjunto de antígenos exclusivos a células alvo ou tipo de tecido. Em particular, a presente invenção se refere a moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 que são capazes de ligação a um epítopo de ADAM9 e um epítopo da molécula presente na superfície de uma célula efetora, especialmente um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Por exemplo, essas moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser construídas para compreender um sítio de ligação a epítopo que se liga imunoesspecificamente a CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), ou NKG2D.

[576] Uma realização da presente invenção se refere a moléculas de ligação a ADAM9 biespecíficas que são capazes de ligação a um "primeiro epítopo" e um "segundo epítopo", esses epítopos não sendo idênticos entre si. Essas moléculas biespecíficas compreendem domínios "VL1"/"VH1" que são capazes de ligação ao primeiro epítopo, e domínios "VL2"/"VH2" que são capazes de ligação ao segundo epítopo. A notação "VL1" e "VH1" denota respectivamente, o Domínio Variável de Cadeia Leve e Domínio Variável de Cadeia Pesada que liga o "primeiro" epítopo dessas moléculas biespecíficas.

De maneira semelhante, a notação "VL2" e "VH2" denota respectivamente, o Domínio Variável de Cadeia Leve e Domínio Variável de Cadeia Pesada que liga o "segundo" epítipo dessas moléculas biespecíficas. É irrelevante se um epítipo particular é designado como o primeiro vs. o segundo epítipo; essa notação tendo relevância somente em relação à presença e orientação dos domínios das cadeias de polipeptídeo das moléculas de ligação da presente invenção. Em uma realização, um desses epítipos é um epítipo de ADAM9 humano e o outro é um epítipo diferente de ADAM9, ou é um epítipo de uma molécula que não é ADAM9. Em realizações particulares, um desses epítipos é um epítipo de ADAM9 humano e o outro é um epítipo de uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D etc.) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Em determinadas realizações, uma molécula biespecífica compreende mais de dois sítios de ligação a epítipo. Essas moléculas biespecíficas ligarão pelo menos um epítipo de ADAM9 e pelo menos um epítipo de uma molécula que não é ADAM9, e pode ainda ligar epítipos adicionais de ADAM9 e/ou epítipos adicionais de uma molécula que não é ADAM9.

[577] A presente invenção particularmente se refere a moléculas de ligação a ADAM9 biespecíficas, triespecíficas e multiespecíficas (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diacorpos biespecíficos, moléculas de ligação trivalentes etc.) que possuem fragmentos de ligação a epítipo de anticorpos (por exemplo, Domínios VL e VH) que permitem que sejam capazes de se ligarem de maneira coordenada a pelo menos um epítipo de ADAM9 e pelo menos um epítipo de uma segunda



molécula que não é ADAM9. A seleção dos Domínios VL e VH dos domínios de polipeptídeo dessas moléculas é coordenada, de modo que as cadeias de polipeptídeos que compõem essas moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 se unam para formar pelo menos um sítio de ligação a epítipo funcional que é específico para pelo menos um epítipo de ADAM9 e pelo menos um sítio de ligação a epítipo funcional que é específico para pelo menos um epítipo de uma molécula que não é ADAM9. Preferencialmente, as moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 compreendem 1, 2 ou todas as 3 das CDR<sub>HS</sub> de um Domínio VH anti-ADAM9 da invenção e/ou 1, 2 ou todas as 3 das CDR<sub>LS</sub> de um Domínio VL anti-ADAM9 da invenção, ou esse Domínio VH anti-ADAM9 e/ou esse Domínio VL anti-ADAM9, conforme aqui provido.

#### A. Anticorpos

##### Biespecíficos

[578] A presente invenção engloba anticorpos biespecíficos capazes de ligação simultânea a um epítipo de ADAM9 e um epítipo de uma molécula que não é ADAM9. Em algumas realizações, o anticorpo biespecífico capaz de ligação de maneira simultânea a ADAM9 e uma segunda molécula que não é ADAM9 é produzido utilizando quaisquer dos métodos descritos nas Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, e WO 2014/022540, cada um dos quais é, neste ato, incorporado aqui por referência

em sua integridade.

[579] B. Diacorpos Biespecíficos sem Regiões Fc

[580] Uma realização da presente invenção se refere a diacorpos biespecíficos que são capazes de ligação a um primeiro epítopo e um segundo epítopo, em que o primeiro epítopo é um epítopo de ADAM9 humano e o segundo é um epítopo de uma molécula que não é ADAM9, preferencialmente, uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D etc.) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Esses diacorpos compreendem, e mais preferencialmente são compostos de uma primeira cadeia de polipeptídeos e uma segunda cadeia de polipeptídeos, cujas sequências permitem que as cadeias de polipeptídeos liguem-se de maneira covalente para formar um diacorpo associado de maneira covalente que é capaz de se ligar simultaneamente a um epítopo de ADAM9 e o segundo epítopo.

[581] A primeira cadeia de polipeptídeos dessa realização de diacorpos biespecíficos compreende, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal, o Domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de ligação ao primeiro ou segundo epítopo (ou seja, VL<sub>VL anti-ADAM9</sub> ou VL<sub>Epítopo 2</sub>), um primeiro peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1), um Domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de ligação ao segundo epítopo (se essa primeira cadeia de polipeptídeo contiver VL<sub>VL anti-ADAM9</sub>) ou ADAM9 (se essa primeira cadeia de polipeptídeos contiver VL<sub>Epítopo 2</sub>), um segundo peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2) opcionalmente contendo um resíduo de cisteína, um Domínio de Promoção de Heterodímero e um C-terminal (Figura 1).

[582] A segunda cadeia de polipeptídeo desta realização de diacoros biespecíficos compreende, na direção de N-terminal para C-terminal: um N-terminal, um Domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de ligação ao primeiro ou segundo epítopo (ou seja, VL<sub>VL anti-ADAM9</sub> ou VL<sub>Epítopo 2</sub>, e sendo o Domínio VL não selecionado para inclusão na primeira cadeia de polipeptídeo do diacoro), um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1), um Domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de ligação ao segundo epítopo (se essa segunda cadeia de polipeptídeo contiver VL<sub>VL anti-ADAM9</sub>) ou a ADAM9 se essa segunda cadeia de polipeptídeo contiver VL<sub>Epítopo 2</sub>), um segundo peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2), opcionalmente, contendo um resíduo de cisteína, um Domínio de Promoção de Heterodímero, e um C-terminal (Figura 1).

[583] O Domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo interage com o Domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo para formar um primeiro sítio de ligação a epítopo funcional que é específico para um primeiro antígeno (ou seja, ADAM9 ou uma molécula que contém o segundo epítopo). Da mesma forma, o Domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo interage com o Domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo, a fim de formar um segundo sítio de ligação a epítopo funcional que é específico para um segundo antígeno (ou seja, a molécula que compreende o segundo epítopo ou ADAM9). Assim, a seleção dos Domínios VL e VH das primeira e segunda cadeias de polipeptídeo é coordenada, de modo que as duas cadeias de polipeptídeo do diacoro compreendam coletivamente Domínios VL e VH capazes de ligação a um epítopo de ADAM9 e ao segundo epítopo (ou seja, compreendem coletivamente VL<sub>VL anti-ADAM9</sub>/VH<sub>VH anti-ADAM9</sub> e VL<sub>Epítopo 2</sub>/VH<sub>Epítopo 2</sub>).

[584] Mais preferencialmente, o comprimento do peptídeo espaçador de interferência (ou seja, "Ligante 1", que separa esses Domínios VL e VH) é selecionado para impedir substancial ou completamente que os Domínios VL e VH da cadeia de polipeptídeo liguem-se um ao outro (por exemplo, consistindo em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 resíduos de aminoácido ligantes de interferências). Assim, os Domínios VL e VH da primeira cadeia de polipeptídeo são substancial ou completamente incapazes de ligação um ao outro. Da mesma forma, os Domínios VL e VH da segunda cadeia de polipeptídeo são substancial ou completamente incapazes de ligação um ao outro. Um peptídeo espaçador de interferência preferido (Ligante 1) tem a sequência (SEQ ID NO:69): GGGSGGGG.

[585] O comprimento e composição do segundo peptídeo espaçador de interferência ("Ligante 2") são selecionados com base na escolha de um ou mais domínios de polipeptídeo que promovem essa dimerização (ou seja, a "Domínio de Promoção de Heterodímero"). Tipicamente, o segundo peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2) compreenderá 3-20 resíduos de aminoácido. Em particular, quando o(s) Domínio(s) de Promoção de Heterodímero empregado(s) não compreender(em) um resíduo de cisteína, um segundo peptídeo espaçador de interferência contendo cisteína (Ligante 2) é utilizado. Um segundo peptídeo espaçador de interferência contendo cisteína (Ligante 2) conterá 1, 2, 3 ou mais cisteínas. Um peptídeo espaçador contendo cisteína preferido (Ligante 2) tem a sequência GGCGGG (SEQ ID NO:70). De maneira alternativa, o Ligante 2 não compreende uma cisteína (por exemplo, GGG, GGGS (SEQ ID NO:71), LGGGSG (SEQ ID NO:72), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:73), ASTKG (SEQ ID NO:74), LEPKSS (SEQ ID NO:75), APSSS

(SEQ ID NO:76) *etc.*) e um Domínio de Promoção de Heterodímero contendo Cisteína, conforme descrito abaixo, é utilizado. Opcionalmente, um Ligante 2 contendo cisteína e um Domínio de Promoção de Heterodímero contendo cisteína são utilizados.

[586] Os Domínios de Promoção de Heterodímero podem ser GVEPKSC (SEQ ID NO:77) ou VEPKSC (SEQ ID NO:78) ou AEPKSC (SEQ ID NO:79) em uma cadeia de polipeptídeo e GFNRGEC (SEQ ID NO:80) ou FNRGEC (SEQ ID NO:81) na outra cadeia de polipeptídeo (vide, Patente Norte-Americana Nº 9.296.816).

[587] Em uma realização preferida, os Domínios de Promoção de Heterodímero compreenderão domínios coil repetidos tandem de carga oposta, por exemplo, domínios helicoidais "E-coil" (SEQ ID NO:82): EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), cujos resíduos de glutamato formarão uma carga negativa em pH 7, e domínios "K-coil" (SEQ ID NO:83): KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK), cujos resíduos de lisina formarão uma carga positiva em pH 7. A presença desses domínios carregados promove a associação entre o primeiro e segundo polipeptídeos e, assim, fomenta a formação de heterodímero. Domínios de Promoção de Heterodímero que compreendem modificações das sequências de E-coil e K-coil descritas acima, de modo a incluir um ou mais resíduo de cisteínas, podem ser utilizados. A presença desses resíduos de cisteína permite que coil presente em uma cadeia de polipeptídeo se torne ligado de maneira covalente a um coil complementar presente em outra cadeia de polipeptídeo, com isso, ligando de maneira covalente as cadeias de polipeptídeo entre si e aumentando a estabilidade do diacorpo. Exemplos desses particularmente preferidos são Domínios de Promoção de Heterodímero incluem um E-Coil Modificado tendo a sequência de aminoácidos EVAACEK-EVAALEK-

EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:84), e um K-coil modificado tendo a sequência de aminoácidos KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:85).

[588] Conforme revelado na Publicação PCT Nº WO 2012/018687, a fim de aprimorar as propriedades farmacocinéticas *in vivo* de diacorpos, um diacorpo pode ser modificado para conter uma parte de polipeptídeo de uma proteína de ligação sérica em um ou mais dos terminos do diacorpo. Mais preferencialmente, essa parte de polipeptídeo de uma proteína de ligação sérica será instalada no Final C de uma cadeia de polipeptídeo do diacorpo. A albumina é a proteína mais abundante no plasma e tem uma meia-vida de 19 dias em humanos. A albumina possui diversos pequenos sítios de ligação de molécula que permitem que ela se ligue de maneira não covalente a outras proteínas e, com isso, estendam suas meias-vidas séricas. O Domínio de Ligação a Albumina 3 (ABD3) de proteína G da cepa G148 de *Streptococcus* consiste em 46 resíduos de aminoácido formando um agrupamento de três hélices estável e tem ampla especificidade de ligação à albumina (Johansson, M.U. et al. (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Assim, uma parte de polipeptídeo particularmente preferida de uma proteína de ligação sérica para melhorar as propriedades farmacocinéticas *in vivo* de um diacorpo é o Domínio de Ligação a Albumina (ABD) da proteína G streptocócica, e mais preferencialmente, o Domínio de Ligação a Albumina 3 (ABD3) de proteína G da cepa G148 de *Streptococcus* (SEQ ID NO:86): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

[589] Conforme revelado na Publicação PCT Nº WO

2012/162068 (aqui incorporada por referência), variantes “desimunizado” de SEQ ID NO:86 têm a capacidade de atenuar ou eliminar a ligação de classe II de MHC. Com base em resultados de mutação de combinação, as seguintes combinações de substituições são consideradas substituições preferidas para formar um ABD desimmunizado: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. ABDs variantes tendo as modificações L64A, I65A e D79A ou as modificações N66S, T70S e D79A. ABD desimmunizada variante tendo a sequência de aminoácidos:

[590] LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub>  
A<sub>71</sub>EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:87),

[591] ou a sequência de aminoácidos:

[592] LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA<sub>64</sub>A<sub>65</sub>NNAKT  
 VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP (SEQ ID NO:88),

[593] ou a sequência de aminoácidos:

[594] LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub>  
 VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP (SEQ ID NO:89),

[595] são particularmente preferidas, uma vez que ABD desimmunizada apresenta ligação substancialmente de tipo selvagem, enquanto provê ligação de classe II de MHC atenuada. Assim, a primeira cadeia de polipeptídeo desse diacorpo tendo uma ABD contém um terceiro ligante (Ligante 3) preferencialmente posicionado de maneira C-terminal para o Domínio E-coil (ou K-coil) dessa cadeia de polipeptídeo, de modo a interferir o Domínio E-coil (ou K-coil) e a ABD (que é preferencialmente uma ABD desimmunizada). Uma sequência preferida para esse Ligante 3 é GGGs (SEQ ID NO:71).

[596] C. Diacorpos Multiespecíficos Contendo

## Regiões Fc

[597] Uma realização da presente invenção se refere a diacorpos multiespecíficos capazes de ligação simultânea a um epítopo de ADAM9 e um segundo epítopo (ou seja, um epítopo diferente de ADAM9 ou um epítopo de uma molécula que não é ADAM9) que compreendem uma Região Fc. A adição de um Domínio CH2-CH3 de IgG a uma ou ambas as cadeias de polipeptídeo de diacorpo, de modo que a complexação das cadeias de diacorpo resulte na formação de um Domínio Fc, aumente a meia-vida biológica e/ou altere a valência do diacorpo. Esses diacorpos compreendem duas ou mais cadeias de polipeptídeo cujas sequências permitem que as cadeias de polipeptídeo se liguem de maneira covalente uma a outra para formarem um diacorpo associado de maneira covalente que é capaz de se ligar simultaneamente a um epítopo de ADAM9 e o segundo epítopo. A incorporação de Domínios CH2-CH3 de IgG em ambos os polipeptídeos de diacorpo permitirá que um diacorpo contendo Região Fc biespecífica de duas cadeias se forme (Figura 2).

[598] De maneira alternativa, a incorporação de um Domínio CH2-CH3 de IgG em somente um dos polipeptídeos de diacorpo permitirá que um diacorpo biespecífico de quatro cadeias mais complexo contendo Região Fc se forme (Figuras 3A-3C). A Figura 3C apresenta um diacorpo de quatro cadeias representativo que possui o Domínio Leve Constante (CL) e o Domínio CH1 Pesado Constante, entretanto, fragmentos desses domínios assim como outros polipeptídeos podem ser, de maneira alternativa, empregados (vide, por exemplo, Figuras 3A e 3B, Publicações de Patente Norte-Americana N<sup>os</sup> 2013-0295121; 2010-0174053 e 2009-0060910; Publicações de Patente Europeia N<sup>os</sup> EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 e Publicações PCT



N<sup>os</sup> WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Assim, por exemplo, em vez do Domínio CH1, pode-se empregar um peptídeo tendo a sequência de aminoácidos GVEPKSC (SEQ ID NO:77), VEPKSC (SEQ ID NO:78), ou AEPKSC (SEQ ID NO:79), derivada da Região de Dobradiça de uma IgG humana, e em vez do Domínio CL, pode-se empregar 6 aminoácidos C-terminais da cadeia leve kappa humana, GFNRGEC (SEQ ID NO:80) ou FNRGEC (SEQ ID NO:81). Um peptídeo representativo contendo diacorpo de quatro cadeias é apresentado na Figura 3A. De maneira alternativa ou adicional, pode-se empregar um peptídeo compreendendo domínios coil tandem de carga oposta, como os domínios helicoidais de "E-coil" (SEQ ID NO:82): EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK ou SEQ ID NO:84): EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); e os domínios "K-coil" (SEQ ID NO:83): KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE ou SEQ ID NO:85): KVAACKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE). Um domínio coil representativo contendo um diacorpo de quatro cadeias é apresentado na Figura 3B.

[599] As moléculas contendo Região Fc da presente invenção podem incluir peptídeos espaçadores de interferência adicionais (Ligantes), geralmente, esses Ligantes serão incorporados entre um Domínio de Promoção de Heterodímero de peptídeo (por exemplo, um E-coil ou K-coil) e Domínios CH2-CH3 e/ou entre Domínios CH2-CH3 e um Domínio Variável (ou seja, VH ou VL). Tipicamente, os ligantes adicionais compreenderão 3-20 resíduos de aminoácido e podem conter todo ou parte de uma Região de Dobradiça de IgG (preferencialmente, uma parte contendo cisteína de uma Região de Dobradiça de IgG). Ligantes que podem ser empregados nas moléculas de diacorpo de Região Fc da presente invenção incluem: GGGS (SEQ ID NO:71), LGGGSG (SEQ ID NO:72),

GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:73), ASTKG (SEQ ID NO:74), LEPKSS (SEQ ID NO:75), APSSS (SEQ ID NO:76), APSSSPME (SEQ ID NO:90), VEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:91), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:92), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:93), GGC, e GGG. LEPKSS (SEQ ID NO:75) podem ser utilizados ao invés de GGG ou GGC para facilidade de clonagem. Adicionalmente, os aminoácidos GGG, ou LEPKSS (SEQ ID NO:75) podem ser seguidos imediatamente por DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:93) para formarem ligantes alternativos: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:94); e LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:95). Moléculas biespecíficas contendo Região Fc da presente invenção podem incorporar uma Região de Dobradiça de IgG além de ou ao invés de um ligante. Regiões de Dobradiça Exemplares incluem: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:96) de IgG1, ERKCCVECP (SEQ ID NO:97) de IgG2, ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK SCDTPPPCPR CP (SEQ ID NO:206) de IgG3, ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:98) de IgG4, e ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:99), que é uma variante de dobradiça de IgG4 compreendendo uma substituição de S228P de estabilização (sublinhada) (conforme numerado pelo índice EU, conforme estabelecido em Kabat) para reduzir a troca de filamento.

[600] Conforme provido na Figura 3A-3C, diacorpos contendo Região Fc da invenção podem compreender quatro cadeias. As primeira e terceira cadeias de polipeptídeo desse diacorpo contêm três domínios: (i) um Domínio contendo VL1, (ii) um Domínio contendo VH2, (iii) Domínio de Promoção de Heterodímero e (iv) um Domínio contendo uma sequência de CH2-CH3. As segunda e quarta cadeias de polipeptídeo contêm: (i) (i) um Domínio contendo VL2, (ii) um Domínio contendo VH1 e (iii) um Domínio de Promoção de Heterodímero, em que os Domínios de Promoção de Heterodímero promovem a dimerização da

primeira/terceira cadeias de polipeptídeo com a segunda/quarta cadeias de polipeptídeo. Os Domínios VL e/ou VH da terceira e quarta cadeias de polipeptídeo, e Domínios VL e/ou VH da primeira e segunda cadeias de polipeptídeo podem ser os mesmos ou diferentes, de modo a permitir a ligação tetravalente que é monoespecífica, biespecífica ou tetraespecífica. As notações "VL3" e "VH3" denotam, respectivamente, o Domínio Variável de Cadeia Leve e Domínio Variável de Cadeia Pesada que se ligam a um "terceiro" epítipo desse diacorpo. De maneira semelhante, as notações "VL4" e "VH4" denotam, respectivamente, o Domínio Variável de Cadeia Leve e Domínio Variável de Cadeia Pesada que se ligam a um "quarto" epítipo desse diacorpo. A estrutura geral das cadeias de polipeptídeo de um diacorpo biespecífico de quatro cadeias contendo Região Fc da invenção é provida na Tabela 2:

Tabela 2		
Biespecífica	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
Tetraespecífica	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL4-VH3-HPD-COOH

[601] HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[602] Em uma realização específica, diacorpos da presente invenção são biespecíficos, tetravalentes (ou seja, possuem quatro sítios de ligação a epítipo), diacorpos contendo Fc que são compostos de quatro cadeias de polipeptídeo no total

(Figuras 3A-3C). Os diacorporos biespecíficos, tetravalentes, contendo Fc da invenção compreendem dois sítios de ligação a epítopo imunoesspecíficos para ADAM9 (que podem ser capazes de ligação ao mesmo epítopo de ADAM9 ou a diferentes epítopos de ADAM9), e dois sítios de ligação a epítopo imunoesspecíficos para uma segunda molécula (que podem ser capazes de ligação ao mesmo epítopo da segunda molécula ou a diferentes epítopos da segunda molécula). Preferencialmente, a segunda molécula é uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D etc.) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear.

[603] Em uma realização adicional, os diacorporos contendo Região Fc da presente invenção podem compreender três cadeias de polipeptídeo. O primeiro polipeptídeo desse diacorpo contém três domínios: (i) um Domínio contendo VL1, (ii) um Domínio contendo VH2 e (iii) um Domínio contendo uma sequência CH2-CH3. O segundo polipeptídeo desse diacorpo contém: (i) um Domínio contendo VL2, (ii) um Domínio contendo VH1 e (iii) um Domínio que promove a heterodimerização e ligação covalente com a primeira cadeia de polipeptídeo do diacorpo. O terceiro polipeptídeo desse diacorpo compreende uma sequência CH2-CH3. Assim, a primeira e segunda cadeias de polipeptídeo desse diacorpo associam-se para formar um sítio de ligação VL1/VH1 que é capaz de ligação ao primeiro antígeno (ou seja, ADAM9 ou uma molécula que compreende um segundo epítopo), assim como um sítio de ligação a epítopo VL2/VH2 que é capaz de ligação a um segundo antígeno (ou seja, a molécula que contém o segundo epítopo ou ADAM9). O primeiro e segundo polipeptídeos são ligados entre si por meio de uma ligação de

dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína em seus respectivos Terceiros Domínios. Notavelmente, as primeira e terceira cadeias de polipeptídeo complexam entre si para formar uma Região Fc que é estabilizada por meio de uma ligação de dissulfeto. Esses diacorpos biespecíficos têm potência intensificada. Figuras 4A e 4B ilustram as estruturas desses diacorpos. Esses diacorpos biespecíficos contendo Região Fc podem ter qualquer de duas orientações (Tabela 3):

Tabela 3		
Primeira Orientação	3ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
Segunda Orientação	3ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -VL1-VH2-HPD-COOH
	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH

[604] HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[605] Em uma realização específica, diacorpos da presente invenção são biespecíficos, bivalentes (isto é, possuem dois sítios de ligação a epítopo), diacorpos contendo Fc que são compostos de três cadeias de polipeptídeo no total (Figuras 4A-4B). Os diacorpos contendo Fc biespecíficos, bivalentes da invenção compreendem um sítio de ligação a epítopo imuno específico para ADAM9, e um sítio de ligação a epítopo imuno específico para uma segunda molécula. Preferencialmente, a segunda molécula é uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D etc.) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear.

[606] Em uma realização adicional, os diacorpos

contendo Região Fc podem compreender um total de cinco cadeias de polipeptídeo. Em uma realização particular, duas das ditas cinco cadeias de polipeptídeo têm a mesma sequência de aminoácido. A primeira cadeia de polipeptídeo desse diacorpo contém: (i) um Domínio contendo VH1, (ii) um Domínio contendo CH1, e (iii) um Domínio contendo uma sequência CH2-CH3. A primeira cadeia de polipeptídeo pode ser a cadeia pesada de um anticorpo que contém um VH1 e uma região constante de cadeia pesada. As segunda e quinta cadeias de polipeptídeo desse diacorpo contém: (i) um Domínio contendo VL1, e (ii) um Domínio contendo CL. As segunda e/ou quinta cadeias de polipeptídeo desse diacorpo podem ser cadeias leves de um anticorpo que contém VL1 complementar a VH1 da primeira/terceira cadeia de polipeptídeo. A primeira, segunda e/ou quinta cadeias de polipeptídeo podem ser isoladas de um anticorpo que ocorre naturalmente. De maneira alternativa, podem ser construídas de maneira recombinante. A terceira cadeia de polipeptídeo desse diacorpo contém: (i) um Domínio contendo VH1, (ii) um Domínio contendo CH1, (iii) um Domínio contendo uma sequência CH2-CH3, (iv) um Domínio contendo VL2, (v) um Domínio contendo VH3 e (vi) um Domínio de Promoção de Heterodímero, em que os Domínios de Promoção de Heterodímero promovem a dimerização da terceira cadeia com a quarta cadeia. O quarto polipeptídeo desses diacorpos contém: (i) um Domínio contendo VL3, (ii) um Domínio contendo VH2 e (iii) um Domínio que promove a heterodimerização e ligação covalente com a terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo.

[607] Assim, a primeira e segunda e a terceira e quinta cadeias de polipeptídeo desses diacorpos associam-se para formar dois sítios de ligação VL1/VH1 capazes de ligação

a um primeiro epítopo. A terceira e quarta cadeias de polipeptídeo desses diacorpos associam-se para formar um sítio de ligação VL2/VH2 que é capaz de ligação a um segundo epítopo, assim como um sítio de ligação VL3/VH3 que é capaz de ligação a um terceiro epítopo. O primeiro e terceiro polipeptídeos são ligados entre si por meio de uma ligação de dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína em suas respectivas regiões constantes. Notavelmente, a primeira e terceira cadeias de polipeptídeo complexam entre si para formar uma Região Fc. Esses diacorpos multiespecíficos têm potência aprimorada. A Figura 5 ilustra a estrutura desses diacorpos. Será entendido que os Domínios VL1/VH1, VL2/VH2, e VL3/VH3 podem ser os mesmos ou diferentes, de modo a permitir a ligação que é monoespecífica, biespecífica ou triespecífica. Conforme aqui provido, estes domínios são preferencialmente selecionados, de modo a ligar um epítopo de ADAM9, um epítopo da segunda molécula e, opcionalmente, um epítopo de uma terceira molécula.

[608] Os Domínios VL e VH das cadeias de polipeptídeos são selecionados de modo a formar sítios de ligação de VL/VH específicos para um epítopo desejado. Os sítios de ligação VL/VH formados pela associação das cadeias de polipeptídeo podem ser os mesmos ou diferentes, de modo a permitir a ligação tetravalente que é monoespecífica, biespecífica, triespecífica ou tetraespecífica. Em particular, os Domínios VL e VH podem ser selecionados, de modo que um diacorpo multivalente possa compreender dois sítios de ligação para um primeiro epítopo e dois sítios de ligação para um segundo epítopo, ou três sítios de ligação para um primeiro epítopo e um sítio de ligação para um segundo epítopo, ou dois sítios de ligação para um primeiro epítopo, um sítio de ligação

para um segundo epítipo e um sítio de ligação para um terceiro epítipo (conforme retratado na Figura 5). A estrutura geral das cadeias de polipeptídeo de diacórpas contendo Região Fc de cinco cadeias representativos da invenção é provida na Tabela 4:

Tabela 4		
Biespecífico (2x2)	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	5ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
	4ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH2-HPD-COOH
Biespecífico (3x1)	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	5ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
	4ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
Triespecífico (2x1x1)	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
	1ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	5ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
	4ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL3-VH2-HPD-COOH

[609] HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[610] Em uma realização específica, diacórpas da presente invenção são biespecíficas, tetravalentes (isto é, possuem quatro sítios de ligação a epítipo), diacórpas contendo Fc que são compostos de cinco cadeias de polipeptídeo no total tendo dois sítios de ligação a epítipo imuno-específico para ADAM9 (que podem ser capazes de ligação ao mesmo epítipo de ADAM9 ou a epítipos diferentes de ADAM9), e dois sítios de ligação a epítipo específicos para uma segunda molécula (que



podem ser capazes de ligação ao mesmo epítipo da segunda molécula ou a diferentes epítipos da segunda molécula). Em outra realização, os diacórpis contendo Fc biespecíficos, tetravalentes da invenção compreendem três sítios de ligação a epítipo imunoesspecíficos para ADAM9 (que podem ser capazes de ligação ao mesmo epítipo de ADAM9 ou a dois ou três epítipos diferentes de ADAM9), e um sítio de ligação a epítipo específico para uma segunda molécula. Em outra realização, os diacórpis contendo Fc biespecíficos, tetravalentes da invenção compreendem um sítio de ligação a epítipo imunoesspecífico para ADAM9, e três sítios de ligação a epítipo específicos para uma segunda molécula (que pode ser capaz de ligação ao mesmo epítipo da segunda molécula ou a dois ou três epítipos diferentes da segunda molécula). Conforme provido acima, os domínios VL e VH podem ser selecionados para permitir ligação triespecífica. Da mesma forma, a invenção também engloba diacórpis triespecíficos, tetravalentes, contendo Fc. Os diacórpis contendo Fc triespecíficos, tetravalentes da invenção compreendem dois sítios de ligação a epítipo imunoesspecíficos para ADAM9, um sítio de ligação a epítipo imunoesspecífico para uma segunda molécula, e um sítio de ligação a epítipo imunoesspecífico para uma terceira molécula. Em determinadas realizações, a segunda molécula é uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D etc.) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Em determinadas realizações, a segunda molécula é CD3 e a terceira molécula é CD8.

[611] D. Moléculas de ligação trivalentes  
Contendo Regiões Fc

[612] Uma realização adicional da presente invenção se refere a moléculas de ligação trivalentes compreendendo uma Região Fc capaz de ligação simultânea a um primeiro epítopo, um segundo epítopo e um terceiro epítopo, em que pelo menos um desses epítopos não é idêntico aos outros. Essas moléculas de ligação trivalentes compreendem três sítios de ligação a epítopo, dois dos quais são Domínios de ligação de tipo diacorpo, que proveem Sítio de ligação A e Sítio de ligação B, e um dos quais é um Domínio de Ligação do tipo Fab, ou um domínio de ligação de tipo scFv, que provê Sítio de ligação C (vide, por exemplo, Figuras 6A-6F, e Publicações PCT Nos: WO 2015/184207; e WO 2015/184203). Essas moléculas de ligação trivalentes, assim, compreendem domínios "VL1"/"VH1" que são capazes de ligação ao primeiro epítopo e domínios "VL2"/"VH2" que são capazes de ligação ao segundo epítopo e domínios "VL3" e "VH3" que são capazes de ligação ao "terceiro" epítopo dessa molécula de ligação trivalente. Um "Domínio de Ligação de Tipo Diacorpo" é o tipo de sítio de ligação a epítopo presente em um diacorpo e, especialmente, um diacorpo DART®, conforme descrito acima. Cada um dentre "Domínio de Ligação de Tipo Fab" e um "domínio de ligação de tipo scFv" são sítios de ligação a epítopo que são formados pela interação do Domínio VL de uma cadeia leve de imunoglobulina e um Domínio VH complementar de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Domínios de Ligação de Tipo Fab diferem de Domínios de ligação de tipo diacorpo em que as duas cadeias de polipeptídeo que formam um Domínio de Ligação de Tipo Fab compreendem somente um único sítio de ligação a epítopo, enquanto as duas cadeias de polipeptídeo que formam um Domínio de Ligação de Tipo Diacorpo compreendem pelo menos dois sítios de ligação a

epítopo. De maneira semelhante, domínios de ligação de tipo scFv também diferem dos Domínios de ligação de tipo diacorpo em que compreendem somente um único sítio de ligação a epítopo. Assim, conforme aqui utilizados domínios de ligação de tipo Fab e de tipo scFv são diferentes dos Domínios de ligação de tipo diacorpo.

[613] Tipicamente, as moléculas de ligação trivalentes da presente invenção compreenderão quatro cadeias de polipeptídeo diferentes (vide Figuras 6A-6B), entretanto, as moléculas podem compreender números menores ou maiores de cadeias de polipeptídeo, por exemplo, ao fundir essas cadeias de polipeptídeo entre si (por exemplo, por meio de uma ligação de peptídeo) ou ao dividir essas cadeias de polipeptídeo para formar cadeias de polipeptídeo adicionais, ou ao associar menos cadeias de polipeptídeo ou adicionais por meio de ligações de dissulfeto. As Figuras 6C-6F ilustram este aspecto da presente invenção ao retratar esquematicamente essas moléculas tendo três cadeias de polipeptídeo. Conforme provido nas Figuras 6A-6F, as moléculas de ligação trivalentes da presente invenção podem ter orientações alternativas nas quais os Domínios de Ligação do tipo Diacorpo são N-terminal (Figuras 6A, 6C e 6D) ou C-terminal (Figuras 6B, 6E e 6F) para uma Região Fc.

[614] Em determinadas realizações, a primeira cadeia de polipeptídeo dessas moléculas de ligação trivalentes da presente invenção contém: (i) um Domínio contendo VL1, (ii) um Domínio contendo VH2, (iii) um Domínio de Promoção de Heterodímero, e (iv) um Domínio contendo uma sequência CH2-CH3. Os Domínios de VL1 e VL2 são localizados N-terminal ou C-terminal para o domínio contendo CH2-CH3, conforme apresentado na Tabela 4 (vide também, Figuras 6A e 6B). A segunda cadeia

de polipeptídeo dessas realizações contém: (i) um Domínio contendo VL2, (ii) um Domínio contendo VH1, e (iii) um Domínio de Promoção de Heterodímero. A terceira cadeia de polipeptídeo dessas realizações contém: (i) um Domínio contendo VH3, (ii) um Domínio contendo CH1 e (iii) um Domínio contendo uma sequência CH2-CH3. A terceira cadeia de polipeptídeo pode ser a cadeia pesada de um anticorpo que contém um VH3 e uma região constante de cadeia pesada, ou um polipeptídeo que contém esses domínios. O quarto polipeptídeo dessas realizações contém: (i) um Domínio contendo VL3 e (ii) um Domínio contendo CL. As quartas cadeias de polipeptídeo podem ser uma cadeia leve de um anticorpo que contém um VL3 complementar a VH3 da terceira cadeia de polipeptídeo, ou um polipeptídeo que contém esses domínios. As terceiras ou quartas cadeias de polipeptídeo podem ser isoladas de anticorpos que ocorrem naturalmente. De maneira alternativa, podem ser construídos de maneira recombinante, sintética ou por outros meios.

[615] O Domínio Variável de Cadeia Leve das primeira e segunda cadeias de polipeptídeo é separado dos Domínios Variáveis de Cadeia Pesada dessas cadeias de polipeptídeo por um peptídeo espaçador de interferência tendo uma extensão que é muito curta para permitir que seus domínios VL1/VH2 (ou seus VL2/VH1) se associem para formar sítio de ligação a epítipo capaz de ligação ao primeiro ou segundo epítipo. Um peptídeo espaçador de interferência preferido (Ligante 1) para este fim tem a sequência (SEQ ID NO:69): GGGSGGGG. Outros Domínios das moléculas de ligação trivalentes podem ser separados por um ou mais peptídeos espaçadores de interferência (Ligantes), opcionalmente, compreendendo um resíduo de cisteína. Em particular, conforme provido acima,

esses Ligantes tipicamente serão incorporados entre Domínios Variáveis (isto é, VH ou VL) e Domínios de Promoção de Heterodímero de peptídeo (por exemplo, um E-coil ou K-coil) e entre esses Domínios de Promoção de Heterodímero de peptídeo (por exemplo, um E-coil ou K-coil) e Domínios CH2-CH3. Ligantes exemplares úteis para a geração de moléculas de ligação trivalentes são providos acima e também são providos nos Pedidos PCT N<sup>os</sup>: PCT/US15/33081; e PCT/US15/33076. Assim, as primeira e segunda cadeias de polipeptídeo dessas moléculas de ligação trivalentes associam-se para formar um sítio de ligação de VL1/VH1 capazes de ligação a um primeiro epítopo, assim como um sítio de ligação de VL2/VH2 que é capaz de ligação a um segundo epítopo. As terceira e quarta cadeias de polipeptídeo dessas moléculas de ligação trivalentes associam-se para formar um sítio de ligação de VL3/VH3 que é capaz de ligação a um terceiro epítopo.

[616] Conforme descrito acima, as moléculas de ligação trivalentes da presente invenção podem compreender três polipeptídeos. Moléculas de ligação trivalentes compreendendo três cadeias de polipeptídeo podem ser obtidas ao ligar os domínios do quarto polipeptídeo N-terminal ao Domínio contendo VH3 do terceiro polipeptídeo (por exemplo, utilizando um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 4)). De maneira alternativa, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma molécula de ligação trivalente da invenção contendo os seguintes domínios é utilizada: (i) um Domínio contendo VL3, (ii) um Domínio contendo VH3, e (iii) um Domínio contendo uma sequência CH2-CH3, em que VL3 e VH3 são espaçados um do outro por um peptídeo espaçador de interferência que é suficientemente extenso (pelo menos 9 ou mais resíduos de

aminoácido), de modo a permitir a associação destes domínios para formar um sítio de ligação a epítopo. Um peptídeo espaçador de interferência preferido para este fim tem a sequência: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:100).

[617] Será entendido que os Domínios VL1/VH1, VL2/VH2, e VL3/VH3 dessas moléculas de ligação trivalentes podem ser diferentes, de modo a permitir a ligação que é monoespecífica, biespecífica ou triespecífica. Em particular, os Domínios VL e VH podem ser selecionados de modo que uma molécula de ligação trivalente compreenda dois sítios de ligação para um primeiro epítopo e um sítio de ligação para um segundo epítopo, ou um sítio de ligação para um primeiro epítopo e dois sítios de ligação para um segundo epítopo, ou um sítio de ligação para um primeiro epítopo, um sítio de ligação para um segundo epítopo e um sítio de ligação para um terceiro epítopo.

[618] Entretanto, conforme aqui provido, estes domínios são preferencialmente selecionados, de modo a se ligarem a um epítopo de ADAM9, um epítopo de segunda molécula, e um epítopo de uma terceira molécula. Em determinadas realizações, a segunda molécula é uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D *etc.*) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Em determinadas realizações, a terceira molécula é CD8.

[619] A estrutura geral das cadeias de polipeptídeo das moléculas de ligação trivalentes representativas da invenção é provida nas Figuras 6A-6F e na Tabela 5:

Tabela 5		
Quatro	2ª Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH

Tabela 5		
Cadeias 1 <sup>a</sup> Orientação	1 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	3 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	2 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH
Quatro Cadeias 2 <sup>a</sup> Orientação	2 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -VL1-VH2-HPD-COOH
	3 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	2 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH
Três Cadeias 1 <sup>a</sup> Orientação	2 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	3 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
Três Cadeias 2 <sup>a</sup> Orientação	2 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -VL1-VH2-HPD-COOH
	3 <sup>a</sup> Cadeia	NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH

[620] HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[621] Uma realização da presente invenção se refere a moléculas de ligação trivalentes que compreendem dois sítios de ligação a epítipo para ADAM9 e um sítio de ligação a epítipo para uma segunda molécula. Os dois sítios de ligação a epítipo para ADAM9 podem ligar o mesmo epítipo ou diferentes epítipos. Outra realização da presente invenção se refere a moléculas de ligação trivalentes que compreendem um sítio de ligação a epítipo para ADAM9 e dois sítios de ligação a epítipo para uma segunda molécula. Os dois sítios de ligação a epítipo para a segunda molécula podem ligar o mesmo epítipo ou diferentes epítipos da segunda molécula. Uma realização adicional da presente invenção se refere a moléculas de ligação trivalentes, triespecíficas que compreendem um sítio de ligação a epítipo para ADAM9, um sítio de ligação a epítipo

para uma segunda molécula, e um sítio de ligação a epítipo para uma terceira molécula. Em determinadas realizações, a segunda molécula é uma molécula (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), NKG2D *etc.*) presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Em determinadas realizações, a segunda molécula é CD3 e a terceira molécula é CD8. Conforme provido acima, essas moléculas de ligação trivalentes podem compreender três, quatro, cinco, ou mais cadeias de polipeptídeo.

[622] IX. Domínios Constantes e Regiões Fc Variantes

[623] São providos aqui "Domínios Constantes" de anticorpo úteis na geração das moléculas de ligação a ADAM9 (por exemplo, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes *etc.*) da invenção.

[624] Um Domínio CL preferido é um Domínio CL Kappa de IgG humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio CL Kappa humano exemplar é (SEQ ID NO:101):

[625] RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN  
NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE  
KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

[626] De maneira alternativa, um Domínio CL exemplar é um Domínio CL Lambda de IgG humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio CL Lambda humano exemplar é (SEQ ID NO:102):

[627] QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS  
DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH  
RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP

[628] TECS



[629] Conforme aqui provido, as moléculas de ligação a ADAM9 da invenção podem compreender uma Região Fc. A Região Fc dessas moléculas da invenção pode ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4). As moléculas de ligação a ADAM9 da invenção podem ainda compreender um Domínio CH1 e/ou uma Região de Dobradiça. Quando presentes, o Domínio CH1 e/ou Região de Dobradiça podem ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4), e é preferencialmente do mesmo isotipo que a Região Fc desejada.

[630] Um Domínio CH1 exemplar é um Domínio CH1 de IgG1 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG1 humana exemplar é (SEQ ID NO:103):

[631]           ASTKGPSVFP           LAPSSKSTSG           GTAALGCLVK  
DYFPEPVTVS   WNSGALTSGV   HTFPAVLQSS   GLYSLSSVVT   VPSSSLGTQT  
YICNVNHNKPS NTKVDKRV

[632] Um Domínio CH1 exemplar é um Domínio CH1 de IgG2 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG2 humana exemplar é (SEQ ID NO:104):

[633]           ASTKGPSVFP           LAPCSRSTSE           STAALGCLVK  
DYFPEPVTVS   WNSGALTSGV   HTFPAVLQSS   GLYSLSSVVT   VPSSNFGTQT  
YTCNVNHNKPS NTKVDKTV

[634] Um Domínio CH1 exemplar é um Domínio CH1 de IgG3 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG3 humana exemplar é (SEQ ID NO:207):

[635]           ASTKGPSVFP           LAPCSRSTSG           GTAALGCLVK  
DYFPEPVTVS   WNSGALTSGV   HTFPAVLQSS   GLYSLSSVVT   VPSSSLGTQT  
YTCNVNHNKPS NTKVDKRV

[636] Um Domínio CH1 exemplar é um Domínio CH1 de IgG4 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG4 humana exemplar é (SEQ ID NO:105):

[637]           ASTKGPSVFP           LAPCSRSTSE           STAALGCLVK  
 DYFPEPVTVS   WNSGALTSGV   HTFPAVLQSS   GLYSLSSVVT   VPSSSLGTKT  
 YTCNVDPHKPS   NTKVDKRV

[638]           Uma Região de Dobradiça exemplar é uma Região de Dobradiça de IgG1 humana. A sequência de aminoácidos de uma Região de Dobradiça de IgG1 humana exemplar é (SEQ ID NO:96): EPKSCDKTHTCPPCP.

[639]           Outra Região de Dobradiça exemplar é uma Região de Dobradiça de IgG2 humana. A sequência de aminoácidos de uma Região de Dobradiça de IgG2 humana exemplar é (SEQ ID NO:97): ERKCCVECPPCP.

[640]           Outra Região de Dobradiça exemplar é uma Região de Dobradiça de IgG4 humana. A sequência de aminoácidos de uma Região de Dobradiça de IgG4 humana exemplar é (SEQ ID NO:98): ESKYGPPCPSCP. Conforme descrito acima, uma Região de Dobradiça de IgG4 pode compreender uma mutação estabilizante, como a substituição S228P. A sequência de aminoácidos de uma Região de Dobradiça de IgG4 estabilizada exemplar é (SEQ ID NO:99): ESKYGPPCPPCP.

[641]           A Região Fc das moléculas contendo Região Fc (por exemplo, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes *etc.*) da presente invenção pode ser uma Região Fc completa (por exemplo, uma Região Fc de IgG completa) ou somente um fragmento de uma Região Fc. Opcionalmente, a Região Fc das moléculas contendo Região Fc da presente invenção não possui resíduo de aminoácido lisina C-terminal.

[642]           Na função imune tradicional, a interação de complexos de anticorpo-antígeno com células do sistema imune resulta em um amplo arranjo de respostas, variando de funções efetoras, como citotoxicidade dependente de anticorpo,

desgranulação de mastócitos, e fagocitose para sinais imunomoduladores, como proliferação de linfócito de regulação e secreção de anticorpo. Todas essas interações são iniciadas por meio da ligação da Região Fc de anticorpos ou complexos imunes a receptores de superfície celular especializados em células hematopoiéticas. A diversidade de respostas celulares desencadeadas por anticorpos e complexos imunes resulta da heterogeneidade estrutural dos três receptores de Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) e FcγRIII (CD16) são receptores de ativação (ou seja, intensificação do sistema imune); FcγRIIB (CD32B) é um receptor de inibição (ou seja, suavização do sistema imune). Além disso, a interação com o Receptor de Fc neonatal (FcRn) media a reciclagem de moléculas de IgG do endossomo à superfície celular e liberação ao sangue. As sequências de aminoácidos de IgG1 (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:2), IgG3 (SEQ ID NO:3), e IgG4 (SEQ ID NO:4) de tipo selvagem exemplares são apresentadas acima.

[643] A modificação da Região Fc pode levar a um fenótipo alterado, por exemplo, meia-vida sérica alterada, estabilidade alterada, susceptibilidade alterada a enzimas celulares ou função efetora alterada. Portanto, pode ser desejável modificar uma molécula de ligação a ADAM9 contendo Região Fc da presente invenção em relação à função efetora, por exemplo, de modo a intensificar a eficácia dessa molécula no tratamento de câncer. A redução ou eliminação da função efetora é desejável em determinados casos, por exemplo, no caso de anticorpos cujo mecanismo de ação envolve o bloqueio ou antagonismo, mas não a morte das células que possuem um antígeno alvo. A função efetora aumentada é geralmente

desejável quando direcionada a células indesejáveis, como células de tumor e estranhas, onde os FcγRs são expressos em baixos níveis, por exemplo, células B específicas de tumor com baixos níveis de FcγRIIB (por exemplo, linfoma não Hodgkin, CLL, e linfoma de Burkitt). Moléculas da invenção que possuem essa atividade de função efetora conferida ou alterada são úteis para o tratamento e/ou prevenção de uma doença, distúrbio ou infecção na qual uma eficácia intensificada da atividade de função efetora é desejada.

[644] Da mesma forma, em determinadas realizações, a Região Fc das moléculas contendo Região Fc da presente invenção pode ser uma Região Fc variante concebida. Embora a Região Fc das moléculas contendo Região Fc, biespecíficas da presente invenção possa possuir a capacidade de se ligar a um ou mais receptores de Fc (por exemplo, FcγR(s)), mais preferencialmente, essa Região Fc variante tem ligação alterada a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação apresentada por uma Região Fc de tipo selvagem), por exemplo, terá ligação intensificada a um receptor de ativação e/ou terá capacidade substancialmente reduzida ou nenhuma a receptores inibidores. Assim, a Região Fc das moléculas contendo Região Fc da presente invenção pode incluir algum ou todo o Domínio CH2 e/ou algum ou todo o Domínio CH3 de uma Região Fc completa, ou pode compreender uma sequência de CH2 variante e/ou de CH3 variante (que pode incluir, por exemplo, uma ou mais inserções e/ou uma ou mais exclusões em relação aos domínios CH2 ou CH3 de uma Região Fc completa). Essas Regiões Fc podem compreender partes de polipeptídeo não Fc, ou podem compreender partes de Regiões Fc completas que não

ocorrem naturalmente, ou podem compreender orientações que não ocorrem naturalmente de Domínios CH2 e/ou CH3 (como, por exemplo, dois domínios CH2 ou dois domínios CH3, ou na direção N-terminal para C-terminal, um Domínio CH3 ligado a um Domínio CH2 etc.).

[645] As modificações de Região Fc identificadas como função efetora de alteração são conhecidas na técnica, incluindo modificações que aumentam a ligação a receptores de ativação (por exemplo, FcγRIIA (CD16A) e reduzem a ligação a receptores inibidores (por exemplo, FcγRIIB (CD32B) (vide, por exemplo, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγgamma Receptors*," Cancer Res. 57(18):8882-8890). A Tabela 6 lista substituições únicas, duplas, triplas, quádruplas e quintuplas (numeração é a do índice EU, como em Kabat, e substituições são relativas à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1) da modificação exemplar que aumentam a ligação a receptores de ativação e/ou reduzem a ligação a receptores inibidores.

Tabela 6			
Variações de Regiões Fc de Ativação Preferidas			
Variações de Sítio Único			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Variações de Sítio Duplo			
F243L e R292P	F243L e Y300L	F243L e P396L	R292P e Y300L
D270E e P396L	R292P e V305I	P396L e Q419H	P247L e N421K
R292P e P396L	Y300L e P396L	R255L e P396L	R292P e P305I
K392T e P396L			
Variações de Sítio Triplo			
F243L, P247L e N421K		P247L, D270E e N421K	
F243L, R292P e Y300L		R255L, D270E e P396L	
F243L, R292P e V305I		D270E, G316D e R416G	

Tabela 6	
Variações de Regiões Fc de Ativação Preferidas	
F243L, R292P e P396L	D270E, K392T e P396L
F243L, Y300L e P396L	D270E, P396L e Q419H
V284M, R292L e K370N	R292P, Y300L e P396L
Variações de Sítio Quádruplo	
L234F, F243L, R292P e Y300L	F243L, P247L, D270E e N421K
L234F, F243L, R292P e Y300L	F243L, R255L, D270E e P396L
L235I, F243L, R292P e Y300L	F243L, D270E, G316D e R416G
L235Q, F243L, R292P e Y300L	F243L, D270E, K392T e P396L
P247L, D270E, Y300L e N421K	F243L, R292P, Y300L, e P396L
R255L, D270E, R292G e P396L	F243L, R292P, V305I e P396L
R255L, D270E, Y300L e P396L	F243L, D270E, P396L e Q419H
D270E, G316D, P396L e R416G	
Variações de Sítio Quintuplo	
L235V, F243L, R292P, Y300L e P396L	F243L, R292P, V305I, Y300L e P396L
L235P, F243L, R292P, Y300L e P396L	

[646] As variantes exemplares de Regiões Fc de IgG2 humana com ligação reduzida a CD32B e/ou ligação aumentada a CD16A contêm substituições de F243L, R292P, Y300L, V305I ou P396L, em que a numeração é a do índice EU, como em Kabat. Essas substituições de aminoácido podem estar presentes em uma Região Fc de IgG1 humana em qualquer combinação. Em uma realização, a Região Fc de IgG1 humana variante contém uma substituição de F243L, R292P e Y300L. Em outra realização, a Região Fc de IgG1 humana variante contém uma substituição de F243L, R292P, Y300L, V305I e P396L.

[647] Em determinadas realizações, é preferido que as Regiões Fc de moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção apresentem ligação reduzida (ou substancialmente nenhuma) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação apresentada pela Região Fc de IgG1 de tipo selvagem (SEQ ID NO:1)). Em uma realização específica, as moléculas de ligação

a ADAM9 da presente invenção compreendem uma Região Fc de IgG que apresenta função efetora de ADCC reduzida. Em uma realização preferida, os Domínios CH2-CH3 dessas moléculas de ligação a ADAM9 incluem qualquer 1, 2, 3, ou 4 das substituições: L234A, L235A, D265A, N297Q, e N297G, em que a numeração é a do índice EU, como em Kabat. Em outra realização, os Domínios CH2-CH3 contêm uma substituição de N297Q, uma substituição de N297G, substituições de L234A e L235A ou uma substituição de D265A, uma vez que essas mutações abolem a ligação de FcR. De maneira alternativa, um Domínio CH2-CH3 de uma região Fc que ocorre naturalmente que apresenta inerentemente ligação reduzida (ou substancialmente nenhuma) a FcγRIIIA (CD16a) e/ou função efetora reduzida (em relação à ligação e função efetora apresentadas pela Região Fc de IgG1 de tipo selvagem (SEQ ID NO:1)) é utilizada. Em uma realização específica, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção compreendem uma Região Fc de IgG2 (SEQ ID NO:2) ou uma Região Fc de IgG4 (SEQ ID:NO:4). Quando uma Região Fc de IgG4 for utilizada, a presente invenção também engloba a introdução de uma mutação de estabilização, como a substituição S228P de Região de Dobradiça descrita acima (vide, por exemplo, SEQ ID NO:99). Uma vez que as substituições N297G, N297Q, L234A, L235A e D265A abolem a função efetora, em circunstâncias nas quais a função efetora é desejada, essas substituições preferencialmente não seriam empregadas.

[648] Uma sequência de IgG1 preferida para os Domínios CH2 e CH3 das moléculas contendo Região Fc da presente invenção tendo função efetora reduzida ou abolida compreenderão as substituições L234A/L235A (apresentada sublinhada) (SEQ ID NO:106):

[649]            APEAAGGPSV            FLFPPKPKDT            LMISRTPEVT  
 CVVVDVSHED    PEVKFNWYVD    GVEVHNAKTK    PREEQYNSTY    RVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYK    CKVSNKALPA    PIEKTISKAK    GQPREPQVYT    LPPSREEMTK  
 NQVSLTCLVK    GFYPSDIAVE    WESNGQPENN    YKTTTPVLDS    DGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQG    NVFSCSVMHE    ALHNHYTQKS    LSLSPGX

[650]            em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[651]            Uma segunda sequência de IgG1 preferida para os Domínios CH2 e CH3 das moléculas contendo Região Fc da presente invenção compreende uma substituição S442C (apresentada sublinhada), de modo a permitir que dois domínios CH3 sejam ligados de maneira covalente entre si, por meio de uma ligação de dissulfeto ou permitir a conjugação de uma parte de droga. A sequência de aminoácidos dessa molécula é (SEQ ID NO:107):

[652]            APELLGGPSV            FLFPPKPKDT            LMISRTPEVT  
 CVVVDVSHED    PEVKFNWYVD    GVEVHNAKTK    PREEQYNSTY    RVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYK    CKVSNKALPA    PIEKTISKAK    GQPREPQVYT    LPPSREEMTK  
 NQVSLTCLVK    GFYPSDIAVE    WESNGQPENN    YKTTTPVLDS    DGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQG    NVFSCSVMHE    ALHNHYTQKS    LCLSPGX

[653]            em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[654]            A terceira sequência de IgG1 preferida para os Domínios CH2 e CH3 das moléculas contendo Região Fc da presente invenção compreende as substituições L234A/L235A (apresentada sublinhada) que reduzem ou abolem a função efetora e a substituição S442C (apresentada sublinhada) que permite que dois domínios CH3 sejam ligados de maneira covalente entre si por meio de uma ligação de dissulfeto ou conjugação de uma parte de droga. A sequência de aminoácidos dessa molécula é (SEQ ID NO:108):

[655]            APEAAGGPSV            FLFPPKPKDT            LMISRTPEVT



CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK  
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LCLSPGX

[656] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[657] A meia-vida sérica de proteínas compreendendo Regiões Fc pode ser aumentada ao aumentar a afinidade de ligação da Região Fc para FcRn. O termo "meia-vida", conforme utilizado aqui, significa uma propriedade farmacocinética de uma molécula que é uma medida do tempo médio de sobrevivência das moléculas após sua administração. A meia-vida pode ser expressa como o tempo necessário para eliminar cinquenta por cento (50%) de uma quantidade conhecida da molécula do corpo do indivíduo (por exemplo, um paciente humano ou outro mamífero) ou um compartimento específico deste, por exemplo, conforme medida no soro, ou seja, meia-vida de circulação, ou em outros tecidos. Em geral, um aumento na meia-vida resulta em um aumento no tempo de residência médio (MRT) na circulação para a molécula administrada.

[658] Em algumas realizações, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção compreendem uma Região Fc variante que compreende pelo menos uma modificação de aminoácido em relação a uma Região Fc de tipo selvagem, de modo que a dita molécula tenha uma meia-vida aumentada (em relação a uma molécula compreendendo uma Região Fc de tipo selvagem). Em algumas realizações, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção compreendem uma Região Fc de IgG variante, em que a dita Região Fc variante compreende uma substituição de aminoácido que estende a meia-vida em uma ou mais posições selecionadas do grupo consistindo em 238, 250,

252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, e 436, em que a numeração é a do índice EU, como em Kabat. Diversas mutações capazes de aumentar a meia-vida de uma molécula contendo Região Fc são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, M252Y, S254T, T256E, e combinações destas. Por exemplo, vide as mutações descritas nas Patentes Norte-Americanas N<sup>os</sup> 6.277.375, 7.083.784; 7.217.797, 8.088.376; Publicações Norte-Americanas N<sup>os</sup> 2002/0147311; 2007/0148164; e Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 98/23289; WO 2009/058492; e WO 2010/033279, que são aqui incorporadas por referência em suas integridades. Moléculas de ligação a ADAM9 com meia-vida intensificada também incluem as que possuem Regiões Fc variantes compreendendo substituições em dois ou mais resíduos de Região Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 e 436. Em particular, duas ou mais substituições selecionadas dentre: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, e Y436I, em que a numeração é a do índice EU, como em Kabat.

[659] Em uma realização específica, uma molécula de ligação a ADAM9 da presente invenção possui uma Região Fc de IgG variante compreendendo as substituições:

- (A) M252Y, S254T e T256E;
- (B) M252Y e S254T;
- (C) M252Y e T256E;
- (D) T250Q e M428L;
- (E) T307Q e N434A;
- (F) A378V e N434A;
- (G) N434A e Y436I;

(H) V308P e N434A; ou

(I) K288D e H435K.

[660] Em uma realização preferida, uma molécula de ligação a ADAM9 da presente invenção possui uma Região Fc de IgG variante compreendendo qualquer 1, 2, ou 3 das substituições: M252Y, S254T e T256E. A invenção ainda engloba moléculas de ligação a ADAM9 possuindo Regiões Fc variantes compreendendo:

(A) uma ou mais mutações que alteram a função efetora e/ou FcγR; e

(B) uma ou mais mutações que estendem a meia-vida sérica.

[661] Uma quarta sequência de IgG1 preferida para os Domínios CH2 e CH3 das moléculas contendo Região Fc da presente invenção compreende as substituições M252Y, S254T e T256E (apresentadas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica. A sequência de aminoácidos dessa molécula é (SEQ ID NO:200):

[662]	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LYITREPEVT
CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK
LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN
DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSV MHE	ALHNHYTQKS
LSLSPGX			

[663] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[664] Uma quinta sequência de IgG1 preferida para os Domínios CH2 e CH3 das moléculas contendo Região Fc da presente invenção compreende as substituições L234A/L235A (apresentadas sublinhadas) que reduzem ou abolem a função efetora e as substituições M252Y, S254T e T256E (apresentadas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica. A

sequência de aminoácidos dessa molécula é (SEQ ID NO:201):

```

[665]      APEAAGGPSV      FLFPPKPKDT      LYITREPEVT
CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD  GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA  PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK
NQVSLTCLVK  GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

[666] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[667] Uma sexta sequência de IgG1 preferida para os Domínios CH2 e CH3 das moléculas contendo Região Fc da presente invenção compreende as substituições L234A/L235A (apresentadas sublinhadas) que reduzem ou abolem a função efetora e as substituições M252Y, S254T e T256E (apresentadas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica e a substituição S442C (apresentada sublinhada), de modo a permitir que dois domínios CH3 sejam ligados de maneira covalente entre si por meio de uma ligação de dissulfeto ou a permitir a conjugação de uma parte da droga. A sequência de aminoácidos dessa molécula é (SEQ ID NO:203):

```

[668]      APEAAGGPSV      FLFPPKPKDT      LYITREPEVT
CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD  GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA  PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK
NQVSLTCLVK  GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LCLSPGX

```

[669] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[670] Para determinados anticorpos, diacorpos e moléculas de ligação trivalentes cujas primeira e terceira cadeias de polipeptídeos contendo Região Fc não são idênticas, é desejável reduzir ou impedir a homodimerização de ocorrer entre os Domínios CH2-CH3 das duas primeiras cadeias de polipeptídeos ou entre os Domínios CH2-CH3 das duas terceiras

cadeias de polipeptídeos. Os Domínios CH2 e/ou CH3 dessas cadeias de polipeptídeos não precisam ser idênticos em sequência e, de maneira vantajosa, são modificados para adotar a complexação entre as duas cadeias de polipeptídeos. Por exemplo, uma substituição de aminoácido (preferencialmente, uma substituição com um aminoácido compreendendo um grupo paralelo volumoso formando um "knob", por exemplo, triptofano) pode ser introduzida ao Domínio CH2 ou CH3, de modo que a interferência estérica impeça a interação com um domínio mutado de maneira semelhante e obrigará o domínio mutado a parear com um domínio ao qual uma mutação complementar ou de acomodação foi concebida, ou seja, "o hole" (por exemplo, uma substituição por glicina). Esses conjuntos de mutações podem estar na engenharia em qualquer par de polipeptídeos compreendendo Domínios CH2-CH3 que formam uma Região Fc para adotar a heterodimerização. Métodos de engenharia de proteína para favorecer a heterodimerização sobre homodimerização são bem conhecidos na técnica, em particular, em relação à engenharia de moléculas semelhante à imunoglobulina, e são aqui englobadas (vide, por exemplo, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621; Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35; and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101; cada um dos quais é neste ato incorporado aqui por referência em sua integridade).

[671] Um knob preferido é criado ao modificar

uma Região Fc de IgG para conter a modificação T366W. Um *hole* preferido é criado ao modificar uma Região Fc de IgG para conter a modificação T366S, L368A e Y407V. Para auxiliar na purificação de homodímero de terceira cadeia de polipeptídeo possuindo *hole* da molécula contendo Região Fc heterodimérico biespecífico final, o sítio de ligação de proteína A dos Domínios CH2 e CH3 possuindo *hole* da terceira cadeia de polipeptídeo é preferencialmente mutado pela substituição de aminoácido na posição 435 (H435R). Assim, o homodímero de terceira cadeia de polipeptídeo possuindo *hole* não se ligará à proteína A, enquanto o heterodímero biespecífico reterá sua capacidade de ligar a proteína A por meio do sítio de ligação de proteína A na primeira cadeia de polipeptídeo. Em uma realização alternativa, a terceira cadeia de polipeptídeo possuindo *hole* pode incorporar substituições de aminoácido nas posições 434 e 435 (N434A/N435K).

[672] Uma sequência de aminoácidos de IgG preferida para os Domínios CH2 e CH3 da primeira cadeia de polipeptídeos de uma molécula contendo Região Fc da presente invenção terá a sequência "possuindo knob" (SEQ ID NO:109):

[673]        APEAAGGPSV            FLFPPKPKDT            LMISRTPEVT  
 CVVVDVSHED    PEVKFNWYVD    GVEVHNAKTK    PREEQYNSTY    RVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYK    CKVSNKALPA    PIEKTISKAK    GQPREPQVYT    LPPSREEMTK  
 NQVSLWCLVK    GFYPSDIAVE    WESNGQPENN    YKTTTPVLDS    DGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQG    NVFSCSVMHE    ALHNHYTQKS    LSLSPGX

[674]        em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[675] Uma sequência de aminoácido de IgG preferida para os Domínios CH2 e CH3 da segunda cadeia de polipeptídeo de uma molécula contendo Região Fc da presente invenção tendo duas cadeias de polipeptídeo (ou a terceira

cadeia de polipeptídeo de uma molécula contendo Região Fc tendo três, quatro, ou cinco cadeias de polipeptídeo) terá a sequência "possuindo hole" (SEQ ID NO:110):

```
[676]      APEAAGGPSV      FLFPPKPKDT      LMISRTPEVT
CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD  GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA  PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK
NQVSLSCAVK  GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLVSKL
TVDKSRWQQG  NVFSCSVMHE  ALHNRYTQKS  LSLSPGX
```

[677] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[678] Conforme será observado, os Domínios CH2-CH3 de SEQ ID NO:109 e SEQ ID NO:110 incluem uma substituição na posição 234 por alanina e 235 por alanina e, assim, forma um Domínio Fc que apresenta ligação reduzida (ou substancialmente nenhuma) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação apresentada pela Região Fc de tipo selvagem (SEQ ID NO:1)). A invenção também engloba esses Domínios CH2-CH3, que compreendem os resíduos de alanina de tipo selvagem, substituições alternativas e/ou adicionais que modificam a função efetora e/ou atividade de ligação de FcγR da região Fc.

[679] A invenção também engloba esses Domínios CH2-CH3, que ainda compreendem uma ou mais substituições de aminoácido que estendem a meia-vida. Em particular, a invenção engloba esses Domínios CH2-CH3 possuindo hole e possuindo knob que ainda compreendem as substituições M252Y/S254T/T256E.

[680] Domínios de CH2 e CH3 possuindo knob exemplar compreendendo as substituições L234A e L235A e ainda compreendendo as substituições M252Y, S254T, e T256E são providos abaixo (SEQ ID NO:204):

```
[681]      APEAAGGPSV      FLFPPKPKDT      LYITREPEVT
```

CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK  
 NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

[682] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[683] Domínios de CH2 e CH3 possuindo hole exemplar compreendendo as substituições L234A e L235A e ainda compreendendo as substituições M252Y, S254T, e T256E são providos abaixo (SEQ ID NO:205):

[684] APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT  
 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK  
 NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNRYTQKS LSLSPGX

[685] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[686] É preferido que a primeira cadeia de polipeptídeos terá uma sequência de CH2-CH3 "possuindo knob", como a de SEQ ID NO:109. Entretanto, conforme será reconhecido, um Domínio CH2-CH3 "possuindo hole" (por exemplo, SEQ ID NO:110 poderia ser empregada na primeira cadeia de polipeptídeos, nesse caso, um Domínio CH2-CH3 "possuindo knob" (por exemplo, SEQ ID NO:109) seria empregado na segunda cadeia de polipeptídeos de uma molécula contendo Região Fc da presente invenção tendo duas cadeias de polipeptídeos (ou na terceira cadeia de polipeptídeos de uma molécula contendo Região Fc tendo três, quatro, ou cinco cadeias de polipeptídeos).

[687] Em outras realizações, a invenção engloba moléculas de ligação a ADAM9 compreendendo Domínios CH2 e/ou CH3 que foram concebidos para favorecer a heterodimerização sobre a homodimerização utilizando mutações conhecidas na



técnica, como as reveladas nas Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; e WO 2013/06867, todas as quais são aqui incorporadas por referência em sua integridade.

[688] X. Capacidades de ligação de Célula efetora

[689] Conforme aqui provido, as moléculas de ligação a ADAM9 da invenção podem ser concebidas para compreender uma combinação de sítios de ligação a epítopo que reconhecem um conjunto de antígenos exclusivo a uma célula alvo ou tipo de tecido. Em particular, a presente invenção se refere a moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 que são capazes de ligação a um epítopo de ADAM9 e um epítopo de uma molécula presente na superfície de uma célula efetora, como um linfócito T, uma célula natural killer (NK) ou outra célula mononuclear. Por exemplo, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser construídas para compreenderem um sítio de ligação a epítopo que se liga imunoespecificamente a CD2, CD3, CD8, CD16, Receptor de Célula T (TCR), ou NKG2D. A invenção também se refere a moléculas de ligação a ADAM9 triespecíficas que são capazes de ligação a um epítopo de CD3 e um epítopo de CD8 (vide, por exemplo, Publicação PCT N<sup>o</sup> WO 2015/026894).

[690] Capacidades de Ligação de CD2

[691] Em uma realização, as moléculas de ligação a ADAM9 biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas da invenção são capazes de ligação a um epítopo de ADAM9 e um epítopo de CD2. CD2 é uma molécula de adesão celular encontrada na superfície de células T e células natural killer (NK). CD2 intensifica a citotoxicidade de célula NK, possivelmente um

promotor de formação de nanotubo de célula NK (Mace, E.M. et al. (2014) "Cell Biological Steps and Checkpoints in Accessing NK Cell Cytotoxicity," Immunol. Cell. Biol. 92(3):245-255; Comerci, C.J. et al. (2012) "CD2 Promotes Human Natural Killer Cell Membrane Nanotube Formation," PLoS One 7(10):e47664:1-12). Moléculas que se ligam especificamente a CD2 incluem o anticorpo anti-CD2 "Lo-CD2a."

[692] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de Lo-CD2a (Nº de Acesso ATCC: 11423; SEQ ID NO:111) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[693] EVQLQQSGPE LQRPGASVKL SCKASGYIFT  
EYYMYWVKQR PKQGLELVGR IDPEDGSIDY VEKFKKKATL TADTSSNTAY  
 MQLSSLTSED TATYFCARGK FNYRFAYWGQ GTLVTVSS

[694] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de Lo-CD2a (Nº de Acesso ATCC: 11423; SEQ ID NO:112) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[695] DVVLTQTPPT LLATIGQSVS ISCRSSQSL  
HSSGNTYLNW LLQRTGQSPQ PLIYLVSKLE SGVPNRFSGS GSGTDFTLKI  
 SGVEAEDLGV YYCMQFTHYP YTFGAGTKLE LK

[696] Capacidades de Ligação a CD3

[697] Em uma realização, as moléculas de ligação a ADAM9 biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas da invenção são capazes de ligação a um epítipo de ADAM9 e um epítipo de CD3. CD3 é um correceptor de célula T composto de quatro cadeias distintas (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140;

pages 1-14). Em mamíferos, o complexo contém uma cadeia CD3 $\gamma$ , uma cadeia CD3 $\delta$ , e duas cadeias CD3 $\epsilon$ . Essas cadeias associam-se a uma molécula conhecida como o Receptor de Célula T (TCR), a fim de gerar um sinal de ativação em linfócitos T. Na ausência de CD3, TCRs não se unem adequadamente e são degradados (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer," Immunology 129(2):170-177). CD3 é encontrado ligado a membranas de todas as células T maduras e virtualmente em nenhum outro tipo celular (vide, Janeway, C.A. et al. (2005) In: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE," 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216; Sun, Z. J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 $\epsilon$ : $\gamma$  Heterodimer," Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex," Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139). Moléculas que se ligam especificamente a CD3 incluem os anticorpos anti-CD3 "mAb-1 de CD3" e "OKT3". O anticorpo anti-CD3 mAb-1 de CD3 é capaz de ligação a primatas não humanos (por exemplo, macaco *cynomolgus*).

[698] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de VH de mAb-1 de CD3 (1) (SEQ ID NO:113) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[699] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS  
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[700] A sequência de aminoácidos de um Domínio VH alternativo de VH de mAb-1 de CD3 (2) (SEQ ID NO:114) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados em

sublinhado único; diferenças relativas ao Domínio VH de VH de mAb-1 de CD3 (1) (SEQ ID NO:92) são apresentadas em sublinhado duplo).

[701] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN  
TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS  
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[702] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:115) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[703] QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT  
TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA  
 QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

[704] O Domínio VH de VH de mAb-1 de CD3(1) (SEQ ID NO:) pode ser utilizado com o Domínio VL de CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:) para formar uma molécula de ligação a CD3 funcional, de acordo com a presente invenção. Da mesma forma, o Domínio VH de VH de mAb-1 de CD3(2) (SEQ ID NO:) pode ser utilizado com o Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:) para formar uma molécula de ligação a CD3 funcional, de acordo com a presente invenção.

[705] Conforme discutido abaixo, a fim de ilustrar a presente invenção, moléculas de ligação a ADAM9 x CD3 biespecíficas foram produzidas. Em algumas das construções de ADAM9 x CD3, uma variante de mAb-1 de CD3 foi empregada. A variante "mAb-1 de CD3 (D65G)", compreende o Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:115) e um Domínio VH de mAb-1 de CD3 tendo uma substituição D65G (posição 65 de Kabat, correspondente ao resíduo 68 de SEQ ID NO:113).

[706] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de mAb-1 de CD3 (D65G) (SEQ ID NO:116) é apresentada abaixo

(resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados, a posição substituída (D65G) é apresentada em sublinhado duplo):

[707] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS  
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[708] De maneira alternativa, uma variante de afinidade de mAb-1 de CD3 pode ser incorporada. Variantes incluem uma variante de baixa afinidade designada "mAb-1 de CD3 Baixo" e uma variante tendo uma constante de dissociação mais rápida designada "mAb-1 de CD3 Rápido". O Domínio VL de mAb1 de CD (SEQ ID NO:115) é comum a mAb-1 de CD3 Baixo e mAb1 de CD3 Rápido e é provido acima. As sequências de aminoácidos dos Domínios VH de cada um dentre mAb-1 de CD3 Baixo e mAb-1 de CD3 Rápido são providas abaixo.

[709] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de mAb-1 de CD3 anti-humano Baixo (SEQ ID NO:117) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados; diferenças relativas ao Domínio VH de VH de mAb-1 de CD3 (1) (SEQ ID NO:113) são apresentadas em sublinhado duplo):

[710] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS  
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVT WFAYWGQGTL VTVSS

[711] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de mAb-1 de CD3 anti-humano Rápido (SEQ ID NO:118) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados; diferenças relativas ao Domínio VH de VH de mAb-1 de CD3(1) (SEQ ID NO:113) são apresentadas em sublinhado duplo):

[712] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS

LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNFGNSYVT WFAYWGQGTL VTVSS

[713] Outro anticorpo anti-CD3, que pode ser utilizado é anticorpo Muromonab-CD3 "OKT3" (Xu et al. (2000) *"In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies,"* Cell. Immunol. 200:16-26; Norman, D.J. (1995) *"Mechanisms Of Action And Overview Of OKT3,"* Ther. Drug Monit. 17(6):615-620; Canafax, D.M. et al. (1987) *"Monoclonal Antilymphocyte Antibody (OKT3) Treatment Of Acute Renal Allograft Rejection,"* Pharmacotherapy 7(4):121-124; Swinnen, L.J. et al. (1993) *"OKT3 Monoclonal Antibodies Induce Interleukin-6 And Interleukin-10: A Possible Cause Of Lymphoproliferative Disorders Associated With Transplantation,"* Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2(4):670-678)

[714] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de OKT3 (SEQ ID NO:119) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[715] QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT  
RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY  
 MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSS

[716] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de OKT3 (SEQ ID NO:120) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[717] QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS  
YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE  
 DAATYYCQOW SSNPFTFGSG TKLEINR

[718] Anticorpos anti-CD3 adicionais que podem ser utilizados incluem, entre outros, nas Publicações PCT Nos WO 2008/119566; e WO 2005/118635.

[719] Capacidade de Ligação a CD8

[720] Em uma realização, as moléculas de ligação a ADAM9 biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas da invenção são capazes de ligação a um epítipo de ADAM9 e um epítipo de CD8. CD8 é um correceptor de célula T composto de duas cadeias distintas (Leahy, D.J., (1995) "A Structural View of CD4 and CD8," FASEB J., 9:17-25) que é expresso em células T citotóxicas. A ativação de células T CD8<sup>+</sup> foi descoberta por ser mediada por meio de interações coestimulantes entre um complexo de antígeno:molécula classe I de histocompatibilidade importante (MHC I) que é disposto na superfície de uma célula alvo e um complexo de CD8 e o Receptor de Célula T, que são dispostos na superfície da célula T CD8<sup>+</sup> (Gao, G., and Jakobsen, B., (2000). "Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-Cell Receptor". Immunol Today 21: 630-636). Moléculas MHC II diferentes, que são expressas somente por determinadas células do sistema imune, moléculas MHC I são expressas de maneira muito ampla. Assim, células T citotóxicas são capazes de ligação a uma ampla variedade de tipos celulares. Células T citotóxicas ativadas mediam a morte celular por meio de sua liberação das citotoxinas perforina, granzimas, e granulísina. Anticorpos que se ligam especificamente a CD8 incluem os anticorpos anti-CD8 "OKT8" e "TRX2."

[721] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de OKT8 (SEQ ID NO:121) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[722] QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKASGYTFT  
DYNMHWVKQS HGKSLEWIGY IYPYTGGTGY NQKFKNKATL TVDSSSSTAY  
MELRSLTSED SAVYYCARNF RYTYWYFDVW GQGTTVTVSS

[723] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de OKT8 (SEQ ID NO:122) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[724] DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD  
SYDNSLMHWY QQKPGQPPKV LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID  
 PVEADDAATY YCQONNEDPY TFGGGTKLEI KR

[725] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de TRX2 (SEQ ID NO:123) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[726] QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS  
DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY  
LQMNSLRAED TAVYYCAKPH YDGYHFFDS WGQGTLVTVS S

[727] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de TRX2 (SEQ ID NO:124) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[728] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN  
NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLPQ  
EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIK

[729] Capacidades de ligação a CD16

[730] Em uma realização, as moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 da invenção são capazes de ligação a um epítipo de ADAM9 e um epítipo de CD16. CD16 é o receptor de FcγRIIIA. CD16 é expresso por neutrófilos, eosinófilos, células Natural Killer (NK), e macrófagos de tecido que ligam IgG humana agregada mas não monomérica (Peltz, G.A. et al. (1989) "Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, And Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3):1013-1017; Bachanova, V. et al. (2014) "NK Cells In Therapy Of Cancer," Crit. Rev. Oncog. 19(1-2):133-141; Miller, J.S. (2013)



"*Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic*," Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2013:247-253; Youinou, P. et al. (2002) "*Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases*," Autoimmun Rev. 1(1-2):13-19; Peipp, M. et al. (2002) "*Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells*," Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511). Moléculas que se ligam especificamente a CD16 incluem os anticorpos anti-CD16 "3G8" e "A9". Anticorpos A9 humanizados são descritos na Publicação PCT Nº WO 03/101485.

[731] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de 3G8 (SEQ ID NO:125) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[732] QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLR  
TSGMGVGVWIR QPSGKGLEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSSNQV  
 FLKIASVDTA DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSA

[733] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de 3G8 (SEQ ID NO:126) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[734] DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD  
FDGDSFMNWF QQKPGQPPKL LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH  
 PVEEEDTATY YCQQSNEDPY TFGGGTKLEI K

[735] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de A9 (SEQ ID NO:127) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[736] QVQLQQSGAE LVRPGTSVKI SCKASGYTFT  
NYWLGWVKQR PGHGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGKATV TADTSSRTAY  
 VQVRSLTSED SAVYFCARSA SWYFDVWGAR TTVTVSS

[737] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de A9 (SEQ ID NO:128) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>L</sub> são

apresentados sublinhados):

[738]           DIQAVVTQES           ALTTSPGETV           TLTCRSNTGT  
VTTSNYANWV   QEKPDHLFTG   LIGHTNNRAP   GVPARFSGSL   IGDKAALTIT  
 GAQTEDEAIY FCALWYNNHW VFGGGTKLTVL

[739]           Anticorpos anti-CD16 adicionais que podem ser utilizados incluem, entre outros, os descritos nas Publicações PCT Nºs WO 03/101485; e WO 2006/125668.

[740]           Capacidade de ligação a TCR

[741]           Em uma realização, as moléculas de ligação a ADAM9 biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas da invenção são capazes de ligação a um epítipo de ADAM9 e um epítipo do Receptor de Célula T (TCR). O Receptor de Célula T é expresso naturalmente por células T CD4+ ou CD8+, e permite que essas células reconheçam peptídeos antigênicos que são ligados e apresentados para reconhecer peptídeos antigênicos que são ligados e apresentados por proteínas MHC de classe I ou classe II de células de apresentação de antígeno. O reconhecimento de um complexo pMHC (peptídeo-MHC) por um TCR inicia a propagação de uma resposta imune celular que leva à produção de citocinas e a lise da célula de apresentação de antígeno (vide, por exemplo, Armstrong, K.M. et al. (2008) "Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes," Biochem. J. 415(Pt 2):183-196; Willemssen, R. (2008) "Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy," Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. et al. (2007) "Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation," Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. et al. (2005) "Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes," Am. J. Ther. 12(6):534-

550). CD3 é o receptor que se liga ao TCR (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer," Immunology 129(2):170-177; Guy, C.S. et al. (2009) "Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex," Immunol. Rev. 232(1):7-21; St. Clair, E.W. (Epub 2009 Oct 12) "Novel Targeted Therapies For Autoimmunity," Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657; Baeuerle, P.A. et al. (Epub 2009 Jun 9) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944; Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) "T Cell Activation," Annu. Rev. Immunol. 27:591-619; Renders, L. et al. (2003) "Engineered CD3 Antibodies For Immunosuppression," Clin. Exp. Immunol. 133(3):307-309).

[742] Moléculas que se ligam especificamente ao Receptor de Célula T incluem o anticorpo anti-TCR "BMA 031" (EP 0403156; Kurrle, R. et al. (1989) "BMA 031 - A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application," Transplant Proc. 21(1 Pt 1):1017-1019; Nashan, B. et al. (1987) "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex," Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human  $\alpha/\beta$  T Cell," J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human  $\alpha/\beta$  T Cell Receptor," J. Immunol. 147(12):4366-4373; e Publicação PCT Nº WO 2010/027797).

[743] A sequência de aminoácidos de um Domínio VH de BMA 031 (SEQ ID NO:129) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[744] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYKFT  
SYVMHWVRQA PGQGLEWIGY INPYNDVTKY NEKFKGRVTI TADKSTSTAY  
 LQMNSLRSED TAVHYCARGS YYDYDGFVYW GQGTILVTVSS

[745] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de BMA 031 (SEQ ID NO:130) é apresentada abaixo (resíduos de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[746] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS  
YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE  
 DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIK

[747] Capacidades de Ligação a NKG2D

[748] Em uma realização, as moléculas de ligação multiespecíficas a ADAM9 da invenção são capazes de ligação a um epítipo de ADAM9 e um epítipo do receptor NKG2D. O receptor NKG2D é expresso em todas as células *Natural Killer* em todos os humanos (e outros mamíferos) (Bauer, S. et al. (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA," Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing," Immunity 17(1):19-29) assim como em todas as células T CD8<sup>+</sup> (Groh, V. et al. (2001) "Costimulation Of CD8 $\alpha\beta$  T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells," Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing," Immunity 17(1):19-29). Esses ligantes de ligação e, particularmente, os que não são expressos em células normais, incluem a molécula de histocompatibilidade 60 (H60), o produto do gene-1 induzível precocemente de ácido retinoico (RAE-1), e a transcrição 1 semelhante a proteína de ligação a UL16 murina (MUL1) (Raulet D.H. (2003) "Roles Of The NKG2D

*Immunoreceptor And Its Ligands," Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al. (2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells," Blood 106:1711-1717). Moléculas que se ligam especificamente ao Receptor NKG2D incluem os anticorpos anti-NKG2D "KYK-1.0" e "KYK-2.0" (Kwong, KY et al. (2008) "Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity," J. Mol. Biol. 384:1143-1156)*

[749] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de KYK-1.0 (SEQ ID NO:131) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[750] EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYGMHWVRQA PGKGLEWVAF IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTKY  
 LQMNSLRAED TAVYYCAKDR FGYYLDYWGO GTLVTVSS

[751] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de KYK-1.0 (SEQ ID NO:132) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[752] QPVLTPQSSV SVAPGETARI PCGGDDIETK  
SVHWYQQKPG QAPVLVIYDD DDRPSGIPER FFGSNSGNTA TLSISRVEAG  
 DEADYYCQVW DDNNDEWVFG GGTQLTVL

[753] A sequência de aminoácidos de um Domínio VH de KYK-2.0 (SEQ ID NO:133) é apresentada abaixo (resíduos CDR<sub>H</sub> são apresentados sublinhados):

[754] QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS  
SYGMHWVRQA PGKGLEWVAF IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY  
 LQMNSLRAED TAVYYCAKDR GLGDGTYFDY WGQGTTVTVS S

[755] A sequência de aminoácidos de um Domínio VL de KYK-2.0 (SEQ ID NO:134) é apresentada abaixo (resíduos

de CDR<sub>L</sub> são apresentados sublinhados):

[756]           QSALTQPASV           SGSPGQSITI           SCSGSSSNIG  
NNAVNWYQQL   PGKAPKLLIY   YDDLLPSGVS   DRFSGSKSGT   SAFLAISGLQ  
 SEDEADYYCA AWDDSLNGPV FGGGTKLTVL

[757]           XI.   Moléculas   de   ligação   a   ADAM9  
 Multiespecíficas

[758]           Diacorpos de Duas Cadeias biespecíficos a  
 ADAM9 x CD3

[759]           Os Domínios VL e VH do anticorpo MAB-A anti-ADAM9 humanizado, otimizado descrito acima são utilizados para construir diacorpos biespecíficos ADAM9 x CD3 compostos de duas cadeias de polipeptídeos ligadas de maneira covalente e compreendendo os Domínios VL e VH de MAB-A humanizados, otimizados discutidos acima. A estrutura e sequências de aminoácidos gerais desses diacorpos biespecíficos de ADAM9 x CD3 é provida abaixo.

[760]           A primeira cadeia de polipeptídeos de um diacorpo de duas cadeias biespecífico a ADAM9 x CD3 exemplar compreende, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal; o Domínio VL de um anticorpo anti-ADAM9 (por exemplo, VL de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:55); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:69)); o Domínio VH de um anticorpo anti-CD3 (por exemplo, mAb 1 de CD3 (D65G) (SEQ ID NO:116)); um peptídeo espaçador de interferência contendo cisteína (Ligante 2: GGCGGG (SEQ ID NO:70)); um Domínio de Promoção de Heterodímero (por exemplo, um E-coil) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:82); e um C-terminal.

[761]           A segunda cadeia de polipeptídeos desse diacorpo de duas cadeias, biespecífico a ADAM9 x CD3 exemplar

compreende, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal; o Domínio VL de um anticorpo anti-CD3 correspondente (por exemplo, um domínio VL que, em associação ao Domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeos forma um sítio de ligação a CD3, por exemplo, o Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:115); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:69)); o Domínio VH de um anticorpo anti-ADAM9 correspondente (por exemplo, um Domínio VH que, em associação ao Domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeos, forme um sítio de ligação a ADAM9, por exemplo, VH de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:17); um peptídeo espaçador de interferência contendo cisteína (Ligante 2: GGCGGG (SEQ ID NO:70)); um Domínio de Promoção de Heterodímero (por exemplo, K-coil) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:83); e um C-terminal.

[762] Conforme aqui provido, ligantes alternativos e/ou Domínios de Promoção de Heterodímero alternativos podem ser utilizados na geração desses diacorpos. Por exemplo, a primeira cadeia de polipeptídeos de um diacorpo de duas cadeias, biespecífico a ADAM9xCD3 exemplar alternativo pode compreender, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal; o Domínio VL de um anticorpo anti-ADAM9; o peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:69)); o Domínio VH do anticorpo anti-CD3 ou de um anticorpo anti-CD3 correspondente; um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2: ASTKG (SEQ ID NO:74)); um Domínio de Promoção de Heterodímero contendo cisteína (por exemplo, K-coil) (KVAACKKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:85); e um C-terminal. A segunda cadeia de polipeptídeos desse diacorpo exemplar alternativo pode compreender, na direção N-terminal

para C-terminal: um N-terminal; o Domínio VL de um anticorpo anti-CD3 correspondente; um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:69)); o Domínio VH de um anticorpo anti-ADAM9 correspondente; um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2: ASTKG (SEQ ID NO:74)); um Domínio de Promoção de Heterodímero contendo cisteína (por exemplo, E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:84); e um C-terminal.

[763] Um diacorpo de duas cadeias biespecífico a ADAM x CD3 representativo ("DART-1") compreendendo os Domínios VH e VL de hMAB-A (2.2) e os Domínios VH e VL de um mAb-1 de CD3 é construído.

[764] A sequência de aminoácidos da primeira cadeia de polipeptídeos de DART-1 (SEQ ID NO:135) é apresentada abaixo (a sequência do Domínio VL de hMAB-A(2) (SEQ ID NO:55) está sublinhada; a sequência do Domínio VH de mAb-1 de CD3 (D65G) (SEQ ID NO:116) está em itálico):

[765]	<u>DIVMTQSPDS</u>	<u>LAVSLGERAT</u>	<u>ISCKASQSVD</u>
<u>YSGDSYMNWY</u>	<u>QQKPGQPPKL</u>	<u>LIYAASDLES</u>	<u>GIPARFSGSG</u>
<u>SLEPEDFATY</u>	<u>YCQQSHEDPF</u>	<u>TFGQGTKLEI</u>	<u>KGGSGGGGGE</u>
<u>VQPGGSLRLS</u>	<u>CAASGFTFST</u>	<u>YAMNWVRQAP</u>	<u>GKGLEWVGRI</u>
<u>YADSVKGRFT</u>	<u>ISRDDSKNSL</u>	<u>YLQMNSLKTE</u>	<u>DTAVYYCVRH</u>
<u>FAYWGQGTLV</u>	<u>TVSSGCGGG</u>	<u>EVAALEKEVA</u>	<u>ALEKEVAALE</u>
		<u>KEVAALEK</u>	

[766] A sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeos de DART-1 (SEQ ID NO:136) é apresentada abaixo (a sequência do Domínio VH de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:17) está sublinhada; a sequência do Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:115) está em itálico):

[767]	<u>QAVVTQEPSL</u>	<u>TVSPGGTVTL</u>	<u>TCRSSTGAVT</u>
<u>TSNYANWVQQ</u>	<u>KPGQAPRGLI</u>	<u>GGTNKRAPWT</u>	<u>PARFSGSLLG</u>
			<u>GKAALTITGA</u>



QAEDEADYYC    ALWYSNLWVF    GGGTKLTVLG    GGGSGGGGEV    QLVESGGGLV  
KPGGSLRLSC    AASGFTFSSY    WMHWVRQAPG    KGLEWVGEII    PIFGHTNYNE  
KFKSRFTISL    DNSKNTLYLQ    MGSLRAEDTA    VYYCARGGY    YYGSRDYFDY  
WGQGTTVTVS SGGCGGGKVA ALKEKVAALK EKVAALKEKV AALKE

[768]            Diacorpos de três Cadeias, Biespecíficos a ADAM9 x CD3

[769]            Um diacorpo de ADAM9 x CD3 tendo três cadeias e possuindo uma Região Fc é gerado tendo um sítio de ligação específico para ADAM9 (compreendendo Domínios VH e VL humanizados/otimizados de hMAB-A) e um sítio de ligação específico para CD3 (compreendendo os Domínios VL e VH de mAb 1 de CD3 (D65G)). O diacorpo é designado "DART-2."

[770]            A primeira cadeia de polipeptídeos dos diacorpos de três cadeias, biespecíficos a ADAM9 x CD3 exemplares compreende, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal; o Domínio VL de um anticorpo anti-ADAM9 (por exemplo, VL de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:55)); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:69)); o Domínio VH de mAb 1 de CD3 (D65G) (SEQ ID NO:116); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2: ASTKG (SEQ ID NO:74)); um Domínio de Promoção de Heterodímero (E-coil) contendo cisteína (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:82)); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:94)); um Domínio CH2-CH3 de IgG1 possuindo knob (SEQ ID NO:109); e um C-terminal. Polinucleotídeos que codificam essa cadeia de polipeptídeos podem codificar o resíduo de lisina C-terminal de SEQ ID NO:109 (ou seja, X de SEQ ID NO:109), entretanto, conforme discutido acima, esse resíduo de lisina pode ser removido de maneira pós-translacional em alguns sistemas de expressão. Da mesma

forma, a invenção engloba, como uma primeira cadeia de polipeptídeos que contém esse resíduo de lisina (ou seja, SEQ ID NO:109, em que X é lisina), assim como uma primeira cadeia de polipeptídeos que não possui esse resíduo de lisina (ou seja, SEQ ID NO:109, em que X está ausente). As sequências de aminoácidos dessa primeira cadeia de polipeptídeos de DART-2 (SEQ ID NO:137) são providas abaixo (a sequência do Domínio VL de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:55) está sublinhada; a sequência do Domínio VH de mAb-1 de CD3 (D65G) (SEQ ID NO:116) está em *itálico*):

	<u>[771]</u>	<u>DIVMTQSPDS</u>	<u>LAVSLGERAT</u>	<u>ISCKASQSVD</u>
<u>YSGDSYMNWY</u>	<u>QQKPGQPPKL</u>	<u>LIYAASDLES</u>	<u>GIPARFSGSG</u>	<u>SGTDFTLTIS</u>
<u>SLEPEDFATY</u>	<u>YCQQSHEDPF</u>	<u>TFGQGGTKLEI</u>	<u>KGGGSGGGGE</u>	<u>VQLVESGGGL</u>
<i>VQPGGSLRLS</i>	<i>CAASGFTFST</i>	<i>YAMNWVRQAP</i>	<i>GKGLEWVGRI</i>	<i>RSKYNNYATY</i>
<i>YADSVKGRFT</i>	<i>ISRDDSKNSL</i>	<i>YLQMNSLKTE</i>	<i>DTAVYYCVRH</i>	<i>GNFGNSYVSW</i>
<i>FAYWGQGLTV</i>	<i>TVSSASTKGE</i>	<i>VAACEKEVAA</i>	<i>LEKEVAALEK</i>	<i>EVAALEKGGG</i>
<i>DKTHTCPPCP</i>	<i>APEAAGGPSV</i>	<i>FLFPPKPKDT</i>	<i>LMISRTPEVT</i>	<i>CVVVDVSHED</i>
<i>PEVKFNWYVD</i>	<i>GVEVHNAKTK</i>	<i>PREEQYNSTY</i>	<i>RVVSVLTVLH</i>	<i>QDWLNGKEYK</i>
<i>CKVSNKALPA</i>	<i>PIEKTISKAK</i>	<i>GQPREPQVYT</i>	<i>LPPSREEMTK</i>	<i>NQVSLWCLVK</i>
<i>GFYPSDIAVE</i>	<i>WESNGQPENN</i>	<i>YKTTTPVLDS</i>	<i>DGSFFLYSKL</i>	<i>TVDKSRWQQG</i>
NVFSCSV MHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGX		

[772] em que X é Lisina (K) ou está ausente.

[773] A segunda cadeia de polipeptídeos dos diacórpas de três cadeias, biespecíficos a ADAM9 x CD3 exemplares compreende, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal; o Domínio VL de mAb 1 de CD3 (SEQ ID NO:115); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:69)); o Domínio VH de um anticorpo anti-ADAM9 (por exemplo, VH de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:17)); um peptídeo espaçador de interferência (Ligante 2: ASTKG (SEQ ID NO:74));

um Domínio de Promoção de Heterodímero (K-coil) contendo cisteína (KVAACKKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:85)); e um C-terminal. A sequência de aminoácidos dessa segunda cadeia de polipeptídeos de DART-2 (SEQ ID NO:138) é provida abaixo (a sequência do Domínio VH de hMAB-A (2) (SEQ ID NO:17) está sublinhada; a sequência do Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:115) está em itálico):

[774]	<i>QAVVTQEPSL</i>	<i>TVSPGGTVTL</i>	<i>TCRSSTGAVT</i>
<i>TSNYANWVQQ</i>	<i>KPGQAPRGLI</i>	<i>GGTNKRAPWT</i>	<i>PARFSGSLLG</i>
<i>QAEDEADYYC</i>	<i>ALWYSNLWVF</i>	<i>GGGTKLTVLG</i>	<i>GGSGGGGGEV</i>
<i>KPGGSLRLSC</i>	<i>AASGFTFSSY</i>	<i>WMHWVRQAPG</i>	<i>KGLEWVGEII</i>
<i>KFKSRFTISL</i>	<i>DNSKNTLYLQ</i>	<i>MGSLRAEDTA</i>	<i>VYYCARGGY</i>
<i>WGQGTITVTVS</i>	<i>SASTKGKVAA</i>	<i>CKEKVAALKE</i>	<i>KVAALKEKVA</i>
		<i>ALKE</i>	

[775] A terceira cadeia de polipeptídeos dos diacoros de três cadeias, biespecíficos a ADAM9 x CD3 exemplares compreende, na direção N-terminal para C-terminal: um N-terminal; um peptídeo espaçador (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:93)); um Domínio CH2-CH3 de IGG1 possuindo hole (SEQ ID NO:110); e um C-terminal. Polinucleotídeos que codificam essa cadeia de polipeptídeos podem codificar o resíduo de lisina C-terminal da SEQ ID NO:110 (ou seja, X da SEQ ID NO:110), entretanto, conforme discutido acima, esse resíduo de lisina pode ser removido de maneira pós-translacional em alguns sistemas de expressão. Da mesma forma, a invenção engloba essa terceira cadeia de polipeptídeos que contém esse resíduo de lisina (ou seja, SEQ ID NO:110, em que X é lisina), assim como uma terceira cadeia de polipeptídeos que não possui esse resíduo de lisina (ou seja, SEQ ID NO:110, em que X está ausente). A sequência de aminoácidos dessa terceira cadeia de polipeptídeos (SEQ ID NO:139) é provida abaixo:

[776] DKHTTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT  
 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY  
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT  
 LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS  
 DGSFFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGX

[777] em que X é Lisina (K) ou está ausente.

[778] Será percebido, tendo em vista os ensinamentos aqui providos, que diferentes orientações de domínio, Domínios VH, Domínios VL, ligantes, e/ou domínios de promoção de heterodímero, poderiam ser utilizados para gerar Diacorpos de três cadeias, biespecíficos a ADAM9 x CD3 alternativos. Em particular, o Domínio VH e Domínio VL de diferentes variantes de hMAB-A podem ser utilizados.

[779] Moléculas de ligação a ADAM9 x CD3 x CD8 trivalentes

[780] Moléculas de ligação a "ADAM9 x CD3 x CD8" trivalentes exemplares tendo um sítio de ligação específico para ADAM9 (compreendendo um Domínio VL anti-ADAM9 parental e/ou humanizado e um Domínio VH anti-ADAM9 correspondente, conforme descrito acima), um sítio de ligação específico para CD3 (compreendendo, por exemplo, o Domínio VL de mAb-1 de CD3 (SEQ ID NO:115) e o Domínio VH de anticorpo anti-CD3 (por exemplo, mAb 1 de CD3 (D65G) (SEQ ID NO:116)), e um sítio de ligação específico para CD8 (compreendendo, por exemplo, os Domínios VH e VL de TRX2 (SEQ ID NOs:123 e 124, respectivamente). Essas moléculas de ligação trivalentes podem ter duas cadeias de polipeptídeos (vide, por exemplo, Figura 6E, e Figura 6F), três cadeias de polipeptídeos (vide, por exemplo, Figura 6C e Figura 6D), quatro cadeias de polipeptídeos (vide, por exemplo, Figura 6A e Figura 6B), ou

cinco cadeias de polipeptídeos (vide, por exemplo, Figura 5).

[781] XII. Métodos de Produção

[782] As moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção são mais preferencialmente produzidas por meio da expressão recombinante de moléculas de ácido nucleico que codificam esses polipeptídeos, conforme é bem conhecido na técnica.

[783] Polipeptídeos da invenção podem ser preparados de maneira conveniente utilizando síntese de peptídeo de fase sólida (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10)

[784] Em uma alternativa, anticorpos podem ser feitos de maneira recombinante e expressos utilizando qualquer método conhecido na técnica. Anticorpos podem ser feitos de maneira recombinante, primeiro, ao isolar os anticorpos feitos de animais hospedeiros, obtendo a sequência genética, e utilizando a sequência genética para expressar o anticorpo de maneira recombinante nas células hospedeiras (por exemplo, células CHO). Outro método que pode ser empregado é expressar a sequência de anticorpos em vegetais (por exemplo, tabaco) ou leite transgênico. Métodos adequados para expressar anticorpos de maneira recombinante em vegetais ou leite foram revelados (vide, por exemplo, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," Vaccine 19:2756;

Lonberg, N. et al. (1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*," Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*," J. Immunol Methods 231:147-157). Métodos adequados para fazer derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única etc. são conhecidos na técnica, e foram descritos acima. Em outra alternativa, anticorpos podem ser feitos de maneira recombinante por tecnologia de apresentação de fago (vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas Nºs 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; e Winter, G. et al. (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*," Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

[785] Vetores contendo os polinucleotídeos de interesse (por exemplo, polinucleotídeos que codificam as cadeias de polipeptídeo das moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção) podem ser introduzidos à célula hospedeira por quaisquer de diversos meios adequados, incluindo eletroporação, transfecção empregando cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, ou outras substâncias; bombardeio de microprojéteis; lipofecção; e infecção (por exemplo, quando o vetor for um agente infeccioso, como o vírus vaccinia). A escolha de introdução de vetores ou polinucleotídeos geralmente dependerá dos aspectos da célula hospedeira.

[786] Qualquer célula hospedeira capaz de superexpressar DNAs heterólogos pode ser utilizada com o objetivo de expressar um polipeptídeo ou proteína de interesse. Exemplos não limitantes de células hospedeira de mamífero adequadas incluem, entre outros, células COS, HeLa, e CHO.

[787] A invenção inclui polipeptídeos

compreendendo uma sequência de moléculas de ligação a ADAM9 desta invenção. Os polipeptídeos desta invenção podem ser feitos por procedimentos conhecidos na técnica. Os polipeptídeos podem ser produzidos por proteólise ou outra degradação dos anticorpos, por métodos recombinantes (isto é, polipeptídeos únicos ou de fusão), conforme descrito acima ou por síntese química. Polipeptídeos dos anticorpos, especialmente polipeptídeos menores de até cerca de 50 aminoácidos, são feitos de maneira conveniente por síntese química. Métodos de síntese química são conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente.

[788] A invenção inclui variantes de moléculas de ligação a ADAM9, incluindo polipeptídeos funcionalmente equivalentes que não afetam significativamente as propriedades dessas moléculas, assim como variantes que têm atividade intensificada ou reduzida. A modificação de polipeptídeos é prática de rotina na técnica e não precisa ser descrita em detalhes aqui. Exemplos de polipeptídeos modificados incluem polipeptídeos com substituições conservadoras de resíduos de aminoácido, uma ou mais exclusões ou adições de aminoácidos que não alteram significativamente de maneira prejudicial a atividade funciona, ou uso de análogos químicos. Resíduos de aminoácido que podem ser substituídos de maneira conservadora entre si incluem, entre outros: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutâmico; lisina/arginina; e fenilalanina/tirosina. Estes polipeptídeos também incluem peptídeos glicosilados e não glicosilados, assim como polipeptídeos com outras modificações pós-translacionais, como, por exemplo, glicosilação com diferentes

açúcares, acetilação, e fosforilação. Preferencialmente, as substituições de aminoácido seriam conservadoras, isto é, o aminoácido substituído possuiria propriedades químicas semelhantes, como as do aminoácido original. Essas substituições conservadoras são conhecidas na técnica e exemplos foram providos acima. Modificações de aminoácido podem variar de alteração ou modificação de um ou mais aminoácidos para concluir o novo projeto de uma região, como o Domínio Variável. Alterações no Domínio Variável podem alterar a afinidade e/ou especificidade de ligação. Outros métodos de modificação incluem a utilização de técnicas de acoplamento conhecidas na técnica, incluindo, entre outros, meios enzimáticos, substituição oxidativa e quelação. Modificações podem ser utilizadas, por exemplo, para afixação de marcações para imunoensaio, como a afixação de partes radioativas para radioimunoensaio. Polipeptídeos modificados são feitos utilizando procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser selecionados utilizando testes padrão conhecidos na técnica.

[789] A presente invenção engloba proteínas de fusão compreendendo um ou mais dos polipeptídeos ou anticorpos desta invenção. Em uma realização, um polipeptídeo de fusão é provido, que compreende uma cadeia leve, uma cadeia pesada ou tanto uma cadeia leve quanto pesada. Em outra realização, o polipeptídeo de fusão contém uma região constante de imunoglobulina heteróloga. Em outra realização, o polipeptídeo de fusão contém um Domínio Variável de Cadeia Leve e um Domínio Variável de Cadeia Pesada de um anticorpo produzido de um hibridoma depositado publicamente. Para os objetivos desta invenção, uma proteína de fusão de anticorpo contém um ou mais



domínios de polipeptídeo que se ligam especificamente a ADAM9 e outra sequência de aminoácidos à qual não é incluído na molécula natural, por exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência homóloga de outra região.

[790] A presente invenção particularmente engloba moléculas de ligação a ADAM9 (por exemplo, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes *etc.*) conjugadas a uma parte de diagnóstico ou terapêutica. Para fins de diagnóstico, moléculas de ligação a ADAM9 da invenção podem ser unidas a uma substância detectável. Essas moléculas de ligação a ADAM9 são úteis para monitorar e/ou prognosticar o desenvolvimento ou progressão de uma doença como parte de um procedimento de teste clínico, como a determinação da eficácia de uma terapia particular. Exemplos de substâncias detectáveis incluem diversas enzimas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, beta-galactosidase *etc.*), grupos prostéticos (por exemplo, avidina/biotina), materiais fluorescentes (por exemplo, umbeliferona, fluoresceína ou ficoeritrina), materiais luminescentes (por exemplo, luminol), materiais bioluminescentes (por exemplo, luciferase ou aequorina), materiais radioativos (por exemplo, carbono-14, manganês-54, estrôncio-85 ou zinco-65), metais de emissão de pósitron, e íons de metal paramagnético não radioativos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente à molécula de ligação a ADAM9 ou indiretamente, por meio de um intermediário (por exemplo, um ligante) utilizando técnicas conhecidas na técnica.

[791] Para fins terapêuticos, moléculas de ligação a ADAM9 da invenção podem ser conjugadas a uma parte terapêutica, como uma citotoxina, (por exemplo, um agente

citostático ou citocidal), um agente terapêutico ou um íon de metal radioativo, por exemplo, alfa-emissores. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial a células, como, por exemplo, exotoxina *Pseudomonas*, toxina de *Difteria*, uma toxina botulínica A a F, rícino, abrina, saporina, e fragmentos citotóxicos desses agentes. Um agente terapêutico inclui qualquer agente tendo um efeito terapêutico para tratar de maneira profilática ou terapêutica um distúrbio. Esses agentes terapêuticos podem ser agentes terapêuticos químicos, agentes terapêuticos de proteína ou polipeptídeo, e incluem agentes terapêuticos que possuem uma atividade biológica desejada e/ou modificam uma determinada resposta biológica. Exemplos de agentes terapêuticos incluem agentes alquilantes, inibidores de angiogênese, agentes anti-mitóticos, agentes de terapia hormonal, e anticorpos úteis para o tratamento de distúrbios proliferativos celulares. A parte terapêutica pode ser unida ou conjugada diretamente à molécula de ligação a ADAM9 ou indiretamente, por meio de um intermediário (por exemplo, um ligante) utilizando técnicas conhecidas na técnica.

[792] XIII. Usos das Moléculas de ligação ADAM9 da presente invenção

[793] A presente invenção engloba composições, incluindo composições farmacêuticas, compreendendo as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção (por exemplo, anticorpos, anticorpos biespecíficos, diacorpos biespecíficos, moléculas de ligação trivalentes etc.), polipeptídeos derivados dessas moléculas, polinucleotídeos compreendendo sequências que codificam essas moléculas ou polipeptídeos, e outros agentes, conforme descrito aqui.

[794] Conforme aqui provido, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção, compreendendo os Domínios VL e/ou VH anti-ADAM9 providos aqui, têm a capacidade de se ligar a ADAM9 presente na superfície de uma célula e induzir citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou mediar morte celular redirecionada (por exemplo, citotoxicidade de célula T redirecionada).

[795] Assim, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção, compreendendo os Domínios VL e/ou VH anti-ADAM9 aqui providos, têm a capacidade de tratar qualquer doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9. Conforme discutido acima, ADAM9 é um antígeno onco-embriônico expresso em diversas malignidades do sangue e sólidas que é associado a tumores de alto grau apresentando uma morfologia menos diferenciada, e é correlacionado com resultados clínicos ruins. Assim, sem limitação, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser empregadas no diagnóstico ou tratamento de câncer, particularmente, um câncer caracterizado por uma expressão de ADAM9.

[796] Em particular, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser utilizadas no tratamento de câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal, câncer esofágico, câncer gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer do fígado, câncer linfoide, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer mieloide, câncer de ovário, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, câncer de tireoide, câncer testicular, e câncer do útero.

[797] Em realizações adicionais, moléculas de

ligação a ADAM-9 da presente invenção podem ser úteis no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (célula escamosa, adenocarcinoma, ou carcinoma indiferenciado de células grandes) e câncer colorretal (adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma, melanoma, ou carcinoma de células escamosas).

[798] As moléculas biespecíficas de ligação a ADAM9 da presente invenção aumentam a terapia de câncer provida por ADAM9 ao promover a mote redirecionada de células tumorais que expressam a segunda especificidade dessas moléculas (por exemplo, CD2, CD3, CD8, CD16, o Receptor de Célula T (TCR), NKG2D etc.). Essas moléculas de ligação a ADAM9 são particularmente úteis para o tratamento de câncer.

[799] Além de sua utilidade na terapia, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser marcadas de maneira detectável e utilizadas no diagnóstico de câncer ou na formação de imagem de tumores e células tumorais.

#### [800] XIV. Composições farmacêuticas

[801] As composições da invenção incluem composições medicamentosas em massa úteis na fabricação de composições farmacêuticas (por exemplo, composições impuras ou não estéreis) e composições farmacêuticas (ou seja, composições que são adequadas para a administração a um indivíduo ou paciente) que podem ser utilizadas na preparação de formas de dosagem unitárias. Essas composições compreendem uma quantidade profilática ou terapeuticamente eficaz das moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção, ou uma combinação desses agentes e um veículo farmacêuticamente aceitável. Preferencialmente, composições da invenção

compreendem uma quantidade profilática ou terapêuticamente eficaz das moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável. A invenção também engloba essas composições farmacêuticas que incluem adicionalmente um segundo anticorpo terapêutico (por exemplo, anticorpo monoclonal específico a tumor) que é específico a um antígeno de câncer particular, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[802] Em uma realização específica, o termo "farmacêuticamente aceitável" significa aprovada por uma agência regulatória do governo Federal ou Estadual ou listado na Farmacopeia Norte-Americana ou outra farmacopeia geralmente reconhecida para uso em animais, e mais particularmente em humanos. O termo "veículo" se refere a um diluente, adjuvante (por exemplo, adjuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente, ou veículo com o qual o agente terapêutico é administrado. De modo geral, os ingredientes das composições da invenção são fornecidos separadamente ou misturados juntamente em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente vedado, como uma ampola ou sachê indicando a quantidade do princípio ativo. Quando a composição tiver de ser administrada por infusão, pode ser dispensada em um frasco de infusão contendo água ou solução fisiológica de grau farmacêutico estéril. Quando a composição for administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução fisiológica pode ser provida, de modo que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

[803] A invenção também provê um pacote ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes cheios com

uma molécula de ligação a ADAM9 da presente invenção, isoladamente ou com esse veículo farmacêuticamente aceitável. Adicionalmente, um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma doença também podem ser incluídos no pacote ou kit farmacêutico. A invenção também provê um pacote ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente, associado a esse(s) recipiente(s) pode haver um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, esse aviso reflete a aprovação pela agência de fabricação, uso ou venda para a administração a humanos.

[804] A presente invenção provê kits que podem ser utilizados nos métodos acima. Um kit pode compreender quaisquer das moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção. O kit pode ainda compreender um ou mais outros agentes profiláticos e/ou terapêuticos úteis para o tratamento de câncer, em um ou mais recipientes.

[805] XV. Métodos de Administração

[806] As composições da presente invenção podem ser providas para o tratamento, profilaxia, e melhora de um ou mais sintomas associados a uma doença, distúrbio ou infecção ao administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de uma molécula capaz de ligação a ADAM9 (por exemplo, um anticorpo, anticorpo biespecífico, diacorpo, molécula de ligação trivalente, proteína de fusão etc.) ou uma molécula de ligação a ADAM9 conjugada da invenção, ou uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula de ligação a ADAM9 ou uma molécula de ligação a ADAM9 conjugada da invenção. Em um aspecto

preferido, essas composições são substancialmente purificadas (ou seja, substancialmente livres de substâncias que limitam seu efeito ou produzem efeito colaterais indesejados). Em uma realização específica, o indivíduo é um animal, preferencialmente, um mamífero, como não primata (por exemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor *etc.*) ou um primata (por exemplo, macaco, como um macaco *cynomolgus*, humano *etc.*). Em uma realização preferida, o indivíduo é um humano.

[807] Diversos sistemas de liberação são conhecidos e podem ser utilizados para administrar as composições da invenção, por exemplo, encapsulamento em lipossomos, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar o anticorpo ou proteína de fusão, endocitose mediada por receptor (vide, por exemplo, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construção de um ácido nucleico como parte de um retrovírus ou outro vetor *etc.*

[808] Métodos de administração de uma molécula de ligação a ADAM9 da invenção incluem, entre outros, administração parenteral (por exemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), epidural, e mucosal (por exemplo, intranasal e vias orais). Em uma realização específica, as moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção são administradas via intramuscular, intravenosa, ou subcutânea. As composições podem ser administradas por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção em bólus, por absorção por linhagens epiteliais ou mucocutâneas (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal *etc.*) e podem ser administradas juntamente

a outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local. Além disso, a administração pulmonar também pode ser empregada, por exemplo, pelo uso de um inalador ou nebulizador, e formulação com um agente em aerossol. Vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas N<sup>os</sup> 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; e 4.880.078; e Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; e WO 99/66903, cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua integridade.

[809] A invenção também provê que preparações das moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção são embaladas em um recipiente hermeticamente vedado, como uma ampola ou sachê indicando a quantidade da molécula. Em uma realização, essas moléculas são fornecidas como um pó liofilizado esterilizado seco ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente vedado e pode ser reconstituído, por exemplo, com água ou solução fisiológica para a concentração adequada para administração a um indivíduo. Preferencialmente, as moléculas de ligação da presente invenção são fornecidas como um pó liofilizado estéril seco em um recipiente hermeticamente vedado.

[810] As preparações liofilizadas das moléculas de ligação a ADAM9 da presente invenção devem ser armazenadas entre 2 °C e 8 °C em seu recipiente original e as moléculas devem ser administradas dentro de 12 horas, preferencialmente, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, ou dentro de 1 hora após serem reconstituídas. Em uma realização alternativa, essas moléculas são fornecidas na forma líquida em um recipiente hermeticamente vedado, indicando a quantidade e concentração da molécula, proteína de fusão, ou molécula



conjugada. Preferencialmente, essas moléculas de ligação a ADAM9, quando providas na forma líquida, são fornecidas em um recipiente hermeticamente vedado.

[811] Conforme aqui utilizado, uma "quantidade eficaz" de uma composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para efetuar os resultados benéficos ou desejados, incluindo, entre outros, resultados clínicos, como a redução dos sintomas que resultam da doença, atenuação de um sintoma de infecção (por exemplo, carga viral, febre, dor, sepse etc.) ou um sintoma de câncer (por exemplo, a proliferação de células neoplásicas, presença de tumor, metástase de tumor etc.), aumentando, com isso, a qualidade de vida dos que sofrem da doença, diminuindo a dose de outras medicações necessárias para tratar a doença, intensificando o efeito de outra medicação, como por meio de focalização e/ou internalização, atraso da progressão da doença e/ou prolongamento da sobrevivência de indivíduos.

[812] Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para os objetivos dessa invenção, uma quantidade eficaz da droga, composto ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente: para matar e/ou reduzir a proliferação de células neoplásicas, e/ou eliminar, reduzir e/ou atrasar o desenvolvimento de metástase de um sítio principal de câncer. Em algumas realizações, uma quantidade eficaz de uma droga, composto, ou composição farmacêutica pode ou não ser alcançada em conjunto com outra droga, composto ou composição farmacêutica. Portanto, uma "quantidade eficaz" pode ser considerada no contexto de administração de um ou mais agentes quimioterapêuticos, e um único agente pode ser considerado por ser dado em uma

quantidade eficaz se, em conjunto com um ou mais outros agentes, um resultado desejável pode ser ou é alcançado.

[813] Para as moléculas de ligação a ADAM9 englobadas pela invenção, a dosagem administrada a um paciente é preferencialmente determinada com base no peso corporal (kg) do indivíduo receptor.

[814] A dosagem e frequência de administração de uma molécula de ligação a ADAM9 da presente invenção podem ser reduzidas ou alteradas ao intensificar a ingestão e penetração no tecido da molécula por modificações, como, por exemplo, lipidação.

[815] A dosagem de uma molécula de ligação a ADAM9 da invenção administrada a um paciente pode ser calculada para uso como uma terapia de único agente. De maneira alternativa, a molécula pode ser utilizada em combinação com outras composições terapêuticas e a dosagem administrada a um paciente são menores do que quando as ditas moléculas são utilizadas como uma terapia de único agente.

[816] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas localmente à área que precisa de tratamento; isso pode ser alcançado, por exemplo, e entre outros, por infusão local, por injeção, ou pode meio de um implante, o dito implante sendo de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, como membranas sialásticas, ou fibras. Preferencialmente, ao administrar uma molécula da invenção, deve ser tomado cuidado ao utilizar materiais aos quais a molécula não absorve.

[817] As composições da invenção podem ser liberadas em uma vesícula, em particular, um lipossomo (Vide Langer (1990) "*New Methods Of Drug Delivery*," Science 249:1527-

1533); Treat et al., in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327).

[818] Quando a composição da invenção for um ácido nucléico que codifica uma molécula de ligação a ADAM9 da presente invenção, o ácido nucléico pode ser administrado *in vivo* para promover a expressão de sua molécula de ligação a ADAM9 codificada ao construí-la como parte de um vetor de expressão de ácido nucléico adequado e administração dele, de modo que se torne intracelular, por exemplo, pelo uso de um vetor retroviral (Vide Patente Norte-Americana Nº 4.980.286), ou por injeção direta, ou pelo uso de bombardeio de micropartículas (por exemplo, uma pistola de gene; Biolistic, Dupont), ou revestimento com lipídeos ou receptores de superfície celular ou agentes de transfecção, ou ao administrá-la na ligação a um peptídeo semelhante a homeobox que é conhecido por entrar no núcleo (Vide, por exemplo, Joliot et al. (1991) "*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868) etc. De maneira alternativa, um ácido nucléico pode ser introduzido via intracelular e incorporado dentro do DNA da célula hospedeira para expressão por recombinação homóloga.

[819] EXEMPLOS

[820] Tendo, agora, descrito a invenção, ela será mais prontamente entendida por meio de referência aos seguintes Exemplos. Os seguintes exemplos ilustram diversos métodos para composições nos métodos de diagnóstico ou tratamento da invenção. Os exemplos são destinados a ilustrar, mas de maneira alguma limitar o escopo da invenção.

[821] Exemplo 1

[822] Especificidade da Célula Tumoral do Anticorpo anti-ADAM9 MAB-A

[823] Um anticorpo murino anti-ADAM9 (designado aqui como MAB-A) foi identificado, que: (1) bloqueia a atividade de processamento de proteína alvo de ADAM9; (2) é internalizado; e (3) tem atividade anti-tumoral (vide, por exemplo, Patente Norte-Americana Nº 8361475). A especificidade de célula tumoral de MAB-A foi investigada por IHC. O tecido tumoral foi contatado com MAB-A (0,4 µg/mL) ou um controle de isotipo (0,4 µg/mL) e a extensão de coloração foi visualizada. MAB-A foi descoberto por marcar fortemente uma variedade de carcinoma de célula grande, carcinoma de células escamosas, e tipos celulares de adenocarcinoma, câncer de pulmão de células não pequenas (Figura 7A, Quadros 1-8), células de câncer de mama, células de câncer de próstata, células de câncer gástrico (Figura 7B, Quadros 1-6), assim como amostras de câncer de cólon amostras (Figura 7C, Quadros 1-8). Tecido normal foi contatado com MAB-A (1,25 µg/mL) e a extensão de coloração foi visualizada. Conforme resumido na Tabela 1 acima, MAB-A apresentou pouca ou nenhuma coloração de uma ampla variedade de tecidos normais. Será observado que a concentração de MAB-A utilizado nesses estudos foi quase 3 vezes a utilizada para a coloração de células tumorais. Os resultados desses estudos de IHC indicam que MAB-A apresenta forte ligação preferencial a células tumorais sobre células normais.

[824] Exemplo 2

[825] Reatividade Cruzada de Espécies

[826] A ligação de MAB-A a ADAM9 humano (huADAM9) e ADAM9 de macaco *cynomolgus* (cynoADAM9) foi examinada. Resumidamente, células 293-FT e CHO-K que expressam de maneira

temporária huADAM9, cynoADAM9, um antígeno não relacionado, ou as células originais não transfectadas foram incubadas com MAB-A, seguido por anticorpo secundário anti-PE murino de cabra e analisado por FACS. Conforme apresentado nas Figuras 8A-8B, MAB-A apresentou forte ligação a huADAM9 exposto temporariamente em ambos os tipos celulares. MAB-A apresentou má ligação a cynoADAM9. MAB-A não se ligou às células originárias ou células que expressam um antígeno irrelevante. Ligação ruim semelhante a cynoADAM foi vista em testes ELISA.

[827] Exemplo 2

[828] Humanização e Otimização inicial

[829] A humanização de MAB-A produziu um Domínio VH humanizado, designado aqui como "VH de hMAB-A(1)" e um Domínio VL humanizado designado aqui como "VL de hMAB-A(1)." Os Domínios Variáveis humanizados foram, então, otimizados para intensificar a atividade de ligação e/ou remover resíduos de aminoácido potencialmente lábeis, conforme descrito em mais detalhes abaixo. A primeira rodada de otimização produziu três Domínios VH humanizados adicionais, aqui designados como "VH de hMAB-A(2)", "VH de hMAB-A(3)" e "VH de hMAB-A(4)", e três Domínios VL humanizados, adicionais aqui designados como "VL de hMAB-A(2)", "VL de hMAB-A(3)" e "VL de hMAB-A(4)". Além disso, uma versão quimérica de MAB-A ("chMAB-A") tendo os Domínios VH e VL murinos e regiões constantes humanas foi gerada. As sequências de aminoácidos dos Domínios VH e VL murinos e os humanizados/otimizados são providos acima, é provido um alinhamento nas Figuras 9A e 9B. A sequência de consenso desses Domínios VH e VL humanizados/otimizados é provida acima. Quando Domínios Variáveis humanizados, múltiplos forem gerados o domínio variável de cadeias pesada

e leve humanizadas de um anticorpo anti-ADAM9 particular (por exemplo, MAB-A) pode ser utilizado em qualquer combinação e combinações particulares de cadeias humanizadas são mencionadas por referência aos Domínios VH/VL específicos, por exemplo, uma molécula (por exemplo, um anticorpo ou diacorpo) compreendendo VH de hMAB-A(1) e VL de hMAB-A(2) é especificamente mencionada como "hMAB-A (1.2)."

[830] VH de hMAB-A(1) foi gerado tendo regiões estruturais derivadas de linhagens de germe humano VH3-21 e VH3-64, e VL de hMAB-A(1) foi gerado tendo regiões estruturais derivadas de linhagens de germe humanas B3 e L6. As CDRs murinas foram retidas nesses domínios variáveis humanizados.

[831] Um possível sítio de desamidação foi identificado na CDR<sub>H</sub>2 (apresentado em sublinhado único na Figura 9A) e um possível sítio de isomerização de ácido aspártico foi identificado na CDR<sub>L</sub>1 (apresentado em sublinhado único na Figura 9B). Substituições de aminoácido nessas posições foram examinadas para identificar substituições para remover esses sítios, enquanto mantém a afinidade de ligação. Uma substituição de fenilalanina na posição 54 (N54F) de CDR<sub>H</sub>2 (presente em VH de hMAB-A(2)) e de serina na posição 28 (D28S) de CDR<sub>L</sub>1 (presente em VL de hMAB-A(2)) foram selecionadas, em que a numeração é de acordo com Kabat. As substituições identificadas podem ser utilizadas separadamente ou em combinação. Surpreendentemente, anticorpos compreendendo a substituição N54F foram descobertas por apresentar aproximadamente um aumento de 2 vezes em afinidade para ADAM9 humano, e por apresentar ligação levemente aprimorada a ADAM9 de *cynomolgus*.

[832] Além disso, variantes otimizadas foram

geradas para minimizar o número de resíduos de lisina presentes nas CDRs. Dois resíduos de lisina estão presentes na CDR<sub>H2</sub> (indicados com um sublinhado duplo na Figura 9A), e uma lisina está presente em CDR<sub>L1</sub> (indicada com um sublinhado duplo na Figura 9B). Substituições de aminoácido nessas posições foram examinadas para identificar substituições que mantiveram afinidade de ligação. As Substituições de arginina na posição 62 (K62R), de glutamina na posição 64 (K64Q), e serina na posição 65 (S65G) foram selecionadas para CDR<sub>H2</sub> (presentes em VH de hMAB-A(3)), em que a numeração é de acordo com Kabat. Uma substituição de uma arginina na posição 24 (K24R) foi selecionada para CDR<sub>L1</sub> (presente em VL de hMAB-A(3)). As substituições identificadas podem ser utilizadas separadamente ou em combinação.

[833] Outros resíduos possivelmente lábeis presentes nas CDRs foram identificados (indicado com um sublinhado pontilhado nas Figuras 9A-9B), um resíduo de metionina dentro de CDR<sub>H1</sub> na posição 34 (M34), um resíduo de metionina dentro de CDR<sub>L1</sub> na posição 33 (M33), e resíduos de histidina, ácido glutâmico, e ácido aspártico resíduos na posição 92 (H93), 93 (E93), e 94 (D94), dentro de CDR<sub>L3</sub>, em que a numeração é de acordo com Kabat. Substituições de aminoácido nessas posições foram examinadas para identificar as substituições que mantiveram afinidade de ligação. A substituição de isoleucina na posição 34 (M34I) foi selecionada para CDR<sub>H1</sub> e substituições de leucina, tirosina, serina e treonina foram selecionadas para as posições 33 (M33L), 92 (H93Y), 93 (E93S), e 94 (D94T) de CDR<sub>L3</sub>, em que a numeração é de acordo com Kabat. Cada uma dessas posições poderiam ser prontamente substituídas em combinação com todas as

substituições detalhadas acima para produzir VH de hMAB-A(4) e VL de hMAB-A(4), que quando pareados juntamente geram um anticorpo que reteve uma pequena melhoria na afinidade, conforme comparado ao anticorpo murino original, e que tem um potencial grandemente reduzido para desamidação ou oxidação e nenhum resíduo de lisina nas CDRs.

[834] A afinidade de ligação relativa dos anticorpos humanizados/otimizados hMAB-A (1.1), hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (3.3), hMAB-A (4.4) e chMAB-A quimérico (tendo Domínios VH/VL murinos) huADAM foi investigado utilizando análise BIAcore®, em que ADAM9 humano solúvel, sinalizado por His ("shADAM9-His," contendo uma parte extracelular de ADAM9 humano fundido a um peptídeo contendo histidina) foi passado sobre uma superfície com anticorpo imobilizado. Resumidamente, cada anticorpo foi capturado em uma superfície revestida de Fc anti-humano de cabra Fab<sub>2</sub> e, então, incubado na presença de diferentes concentrações (6,25-100 nM) do peptídeo shADAM9-His. A cinética de ligação foi determinada por meio de ligação de análise BIAcore® (modelo de ligação de Langmuir de 1:1 normalizada). A  $k_a$ ,  $k_d$  e  $K_D$  calculadas destes estudos são apresentado na Tabela 7. A ligação a cynoADAM9 foi examinada por FACS, conforme descrito acima e por ELISA.

Tabela 7				
Anticorpo	pI	huADAM9		
		$k_a$ ( $\times 10^6$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-3}$ )	KD (nM)
chMAB-A	6,61	1,3	4,7	3,6
hMAB-A (1.1)	6,44	1,5	5,2	3,5
hMAB-A (2.2)	6,58	1,1	1,5	1,4
hMAB-A (2.3)	6,58	1,3	1,7	1,3
hMAB-A (3.3)	6,44	1,1	1,5	1,4
hMAB-A (4.4)	6,73	1,0	2,0	2,0



[835] Os resultados destes estudos demonstram que os anticorpos humanizados/otimizados têm a mesma afinidade de ligação ou maior a ADAM9 humano que o anticorpo murino parental. Em particular, foi observado que a introdução da mutação N54F nos anticorpos humanizados resultou em ligação aprimorada a huADAM9 (ou seja, hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3) e hMAB-A (3.3)). Essa mutação também proveu uma leve melhoria na ligação a cynoADAM9, conforme determinada por FACS e ELISA; entretanto, estes anticorpos continuaram a apresentar má ligação a cynoADAM9. Esses estudos também identificaram substituições adicionais que poderiam ser introduzidas para remover resíduos de lisina das CDRs sem reduzir a afinidade. Substituições adicionais foram identificadas para remover outros resíduos potencialmente lábeis com um impacto mínimo na afinidade.

[836] Exemplo 4

[837] Otimização de Ligação a ADAM9 de Primata não humano

[838] Foi utilizada mutagênese aleatória para introduzir substituições dentro dos domínios de Cadeia pesada CDR<sub>H2</sub> (posições Kabat 53-58) e CDR<sub>H3</sub> (posições Kabat 95-100 e 100a-100f) de hMAB-A (2.2). Os mutantes foram selecionados para identificar clones tendo ligação aprimorada a ADAM9 de primata não humano (*por exemplo*, cynoADAM9) e que retinham ligação de alta afinidade a huADAM9. 48 clones foram selecionados das duas seleções independentes de mutações dentro de CDR<sub>H3</sub> (posições Kabna 100a-100f). A Tabela 8 provê um alinhamento da sequência de aminoácidos de resíduos de CDR<sub>H3</sub> 100a-f de Kabat de clones de hMAB-A (2.2) selecionados para a ligação intensificada a cynoADAM9 de duas seleções

independentes. Alinhamentos de clone adicionais são providas na Tabela 9. Conforme indicado nessas Tabelas, clones semelhantes surgiram em cada experimento, que pareceram em padrões de substituição diferentes.

Tabela 8 Substituições dentro do Sub-Domínio da Cadeia pesada CDRH3 de MAB-A (posições Kabat 100a-100f)					
Seleção 1			Seleção 2		
ID de Clone	SEQ ID NO	Sequência de Sub-Domínio de CDR <sub>H</sub> 3	ID de Clone	SEQ ID NO	Sequência de Sub-Domínio de CDR <sub>H</sub> 3
MAB-A	140	GSRDYF	MAB-A	140	GSRDYF
1	141	DGEGVM	1	171	DGKAVL
2	141	DGEGVM	2	172	FNKAVL
3	142	FHSGLL	3	143	FNSATL
4	143	FNSATL	4	173	FNSGTW
5	144	FNSGTL	5	174	FNTGVF
6	145	FNSSTL	6	175	GKSRFH
7	146	GKSKWL	7	150	IGKGVF
8	147	GMGGTL	8	151	IGKGVL
9	148	HAKGGM	9	176	IGKNVY
10	149	IGEAVL	10	177	MGKGVM
11	150	IGKGVF	11	178	NGESVF
12	150	IGKGVF	12	179	PDFGWM
13	151	IGKGVL	13	180	PGSGVM
14	152	KHDSVL	14	181	PKDAWL
15	153	LNTAVM	15	158	PKFGWK
16	154	NGEGTL	16	158	PKFGWK
17	155	NGKNTL	17	182	PKFGWL
18	156	NSAGIL	18	183	PKIGWH
19	157	PKEGWM	19	183	PKIGWH
20	158	PKFGWK	20	183	PKIGWH
21	159	PKMGWV	21	184	PKMGWA
22	160	PRLGHL	22	185	PKMGWM
23	161	PSFGWA	23	185	PKMGWM
24	162	QAKGTM	24	185	PKMGWM
25	163	RGMGVM	25	185	PKMGWM
26	164	RKEGWM	26	186	PQMGWL
27	165	TGKGVL	27	187	PRFGWL

28	166	TGMGTL	28	187	PRFGWL
29	167	TGNGVM	29	187	PRFGWL
30	167	TGNGVM	30	188	PRMGFL
31	168	WNAGTF	31	189	PRMGFM
32	169	YHHTPL	32	190	PSFGWM
33	169	YHHTPL	33	191	RREGWM
34	170	YQSATL	34	192	SGEGVL
			35	193	SGNGVM
			36	194	VGKAVL

Tabela 9

Substituições dentro do Sub-Domínio da Cadeia pesada CDRH3 de MAB-A  
(posições Kabat 100a-100f)

ID de Clone	SEQ ID NO	Sequência de Sub-Domínio de CDR <sub>H</sub> 3
MAB-A VH (2A)	144	FNSGTL
MAB-A VH (2B)	151	IGKGVV
MAB-A VH (2C)	187	PRFGWL
MAB-A VH (2D)	165	TGKGVV
MAB-A VH (2E)	195	DSNAVL
MAB-A VH (2F)	196	FHSGTL
MAB-A VH (2G)	172	FNKAVL
MAB-A VH (2H)	197	GGSGVL
MAB-A VH (2I)	198	PRQGFL
MAB-A VH (2J)	199	YNSGTL

[839] Para todos os clones examinados, Gly e Ala são os resíduos de aminoácido preferidos na posição 4 (P4) e Leu, Met, e Phe são os resíduos de aminoácido preferidos na posição 6 (P6). Os resíduos de aminoácido preferidos em outras posições (por exemplo, posição 2 (P2), posição 3 (P3) e posição 5 (P5)) dependem do resíduo de aminoácido encontrado em P1. Para clones tendo um resíduo Pro na posição 1 (P1), Lys e Arg foram preferidos em P2, Phe e Met em P3, Gly em P4, e Trp ou Phe em P5. Para clones tendo Phe, Tyr ou Trp em P1, Asn e His foram preferidos em P2, Ser e His em P3, e Leu em P6. Para clones tendo Ile, Leu ou Val em P1, Gly foi preferido em P2, Lys em P3, Val em P5 e hidrofóbico em P6. Além disso, como

pode ser visto na Tabela 8, para clones tendo um resíduo de Thr em P1, Gly foi preferido em P2, Lys, Met, e Asn foram preferidos em P3, Gly foi preferido em P4, Val ou Thr foram preferidos em P5 e Leu e Met em P6. Clones adicionais tendo um resíduo de Asp, Gly, Arg, His, ou Ser em P1 também foram identificados em frequências menores (vide Tabela 8 e Tabela 9).

[840] O Domínio VH dos dez clones apresentados na Tabela 9 foram utilizados para gerar variantes adicionais otimizadas de hMAB-A (2.2), designadas hMAB-A (2A.2). A ligação dos clones selecionados foi examinada por teste ELISA. Resumidamente, anticorpos que se ligam a peptídeos contendo histidina e que foram revestidos em placas de microtitulação foram utilizados para capturar cynoADAM9 solúvel sinalizado por peptídeo His ("cynoADAM9-His") (1 µg/mL) ou huADAM9 solúvel sinalizado por peptídeo His (1 µg/mL), e a ligação de diluições em série do hMAB-A (2.2) original e as dez variantes de hMAB-A (2A.2) de CDR<sub>H</sub>3 foi examinada. As curvas de ligação para cynoADAM9 e huADAM9 são apresentadas na Figura 10A e Figura 10B, respectivamente. Variantes de hMAB-A (2A.2) compreendendo cada um dos Domínios VH selecionados apresentaram ligação aprimorada a cynoADAM9 com VH de MAB-A (2B), VH de MAB-A(2C), VH de MAB-A (2D), e VH de MAB-A (2I), apresentado a maior intensificação na ligação a cynoADAM9, enquanto mantém ligação semelhante a huADAM9 como o anticorpo original hMAB-A (2.2).

[841] A afinidade de ligação relativa dos anticorpos humanizados/mais otimizados VH de MAB-A (2B.2), VH de MAB-A (2C.2), VH de MAB-A (2D.2), e VH de MAB-A (2I.2), e o hMAB-A (2.2) original, a huADAM9-His e cynoADAM9-His foi investigada utilizando análise BIACORE® essencialmente

conforme descrito acima.  $k_a$ ,  $k_d$  e  $K_D$  calculados destes estudos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10						
Anticorpo	huADAM9			cynoADAM9		
	$k_a$ ( $\times 10^5$ ) ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-4}$ ) ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	$k_a$ ( $\times 10^5$ ) ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-4}$ ) ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
hMAB-A (2.2)	9,0	5,5	0,6	2,0	220	110
hMAB-A (2B.2)	6,1	3,9	0,6	3,4	0,66	0,2
hMAB-A (2C.2)	5,9	8,1	1,4	3,5	<0,1	<0,3
hMAB-A (2D.2)	6,9	5,8	0,8	4,2	3,0	0,7
hMAB-A (2I.2)	6,6	2,3	0,4	4,0	0,85	0,2

[842] Os estudos de ligação demonstram que os quatro clones superiores apresentaram intensificação entre 150-550 vezes na afinidade de ligação a cynoADAM9, enquanto mantiveram a mesma ligação de alta afinidade a huADAM9 como o anticorpo original. hMAB-A (2C.2) e hMAB-A (2I.2) foi selecionado para estudos adicionais.

[843] Exemplo 5

[844] Estudo de Imuno-histoquímica de Anticorpo hMAB-A (2I.2)

Tabela 11		
Célula/Tecido	hMAB-A (2I.2) (2,5 $\mu$ g/mL)	Controle Negativo de IgG1 (2,5 $\mu$ g/mL)
Células originais de Cho-K	-	-
Expressão de meio de Cho-K/huADAM9 P:1	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional	-
Alta expressão de Cho-K/huADAM9	2-4+ (gr c > m) frequente	-

Tabela 11		
Célula/Tecido	hMAB-A (2I.2) (2,5 µg/mL)	Controle Negativo de IgG1 (2,5 µg/mL)
Clone 2 de Cho-K/cynoADAM9	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Clone #16 de Cho-K/cynoADAM9	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Células A498	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
MG06-CHTN-96 B de Cólon	-	numerosas células 2-4+ (gr c) compatíveis com macrófagos
MG06-CHtN-162B1 A de Pulmão	-	células ocasionais 2-4+ (gr c) compatíveis com macrófagos
ILS11103 B de Fígado	-	hepatócitos 1+ (gr c) raros a ocasionais
ILS10266 de Pâncreas	-	-
0910035D de Herança de Vida Cardíaca	-	células de músculo cardíaco com diversos pequenos focos 1-3+ de (gr c) compatíveis com pigmento lipofuscina
ILS10241 B de Rins	-	epi tubulares 1+ (gr c) raras
ILSD8011 J de Bexiga	-	células ocasionais 2-4+ (gr c) compatíveis com macrófagos
Cólon de Cyno #1	-	epi de mucosa (m luminal) 2-4+ raras a ocasionais e 1+ raras a ocasionais; diversas células 2-3+ (gr c) compatíveis com macrófagos predominantemente dentro de LP
Pulmão de Cyno #1	-	células muito raras 2-4+ (gr c) compatíveis com macrófagos
Fígado de Cyno #1	-	-

Tabela 11		
Célula/Tecido	hMAB-A (2I.2) (2,5 µg/mL)	Controle Negativo de IgG1 (2,5 µg/mL)
Pâncreas de Cyno #1	-	-
Coração de Cyno #1	-	-
Rins de Cyno #070368M	-	epi tubulares 2+ (gr c) raras e 1+ (gr c) rara a ocasional
Bexiga de Cyno #1	células epi temporárias ± (gr c) raras	células raras 1-4+ (gr c) compatíveis com macrófagos
CA ILS10108 de Pulmão	Pontuação H 150	tu -
CA ILS7223 de Pulmão	Pontuação H 180	tu -
CA ILS2156 A de Pulmão	Pontuação H 80	tu -
CA ILS7295 A de Pulmão	Pontuação H 60	tu -

[845] Estudos de IHC também foram conduzidos para avaliar a ligação de hMAB-A (2I.2) humanizado/otimizados em uma concentração de 12,5 µg/mL (5x concentração de coloração ideal). Células controle positivas e negativas, tecidos humanos normais, e tecidos de macaco *cynomolgus* foram empregados neste estudo. Os resultados do estudo são resumidos na Tabela 12.

Tabela 12		
Célula/Tecido	hMAB-A (2I.2) (12,5 µg/mL)	Controle Negativo de IgG1 (12,5 µg/mL)
Células Originais de Cho-K	-	-
Expressão de meio de Cho-K/huADAM9 P:1	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
Alta expressão de Cho-K/huADAM9	3-4+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
Clone 2 de Cho-K/cynoADAM9	3-4+ (gr c > m) frequente	-

Tabela 12		
Célula/Tecido	hMAB-A (2I.2) (12,5 µg/mL)	Controle Negativo de IgG1 (12,5 µg/mL)
clone #16 de Cho-K/cynoADAM9	3-4+ (gr c > m) frequente	-
Células A498	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
MG06-CHTN-96 B de Cólon	Bepi ± - 1+ rara a ocasional	numerosas células 2-4+ (gr c) compatíveis com macrófagos predominantemente dentro de LP no artigo de teste e controle negativo
MG06-CHtN-162B1 A de Pulmão	células alveolares (favorecem pneumócitos) 2-3+ (gr c > m) raras, 1+ (gr c > m) raras a ocasionais; EC 2-4+ (c,m) rara, 1+ (c,m) rara	Células compatíveis com macrófagos disseminadas ocasionais 2-4+ (gr c) no artigo de teste e controle negativo
ILS11103 B de Fígado	-	Células compatíveis com macrófagos disseminadas ocasionais 2-4+ (gr c) no artigo de teste e controle negativo
ILS10266 de Pâncreas	epi ductais 1+ (gr c > m) muito raras	células (favorecem células do tipo acinar) 1+ (gr c) muito raras; Células compatíveis com macrófagos disseminadas ocasionais 2-4+ (gr c) no artigo de teste e controle negativo
0910035D de Herança de Vida-Cardíaca	-	coloração de numerosos pequenos focos 1-3+ granular com células de músculo cardíaco compatíveis com pigmento lipofuscina compatível com artefato em teste e controle negativo



Tabela 12		
Célula/Tecido	hMAB-A (2I.2) (12,5 µg/mL)	Controle Negativo de IgG1 (12,5 µg/mL)
ILS10241 B de Rins	epi tubular 1+ (gr c) rara a ocasional	epi tubular ± (gr c) rara
ILSD8011 J de bexiga	célula epi temporária 1+ (gr c) rara	células compatíveis com macrófagos raras 2-4+ (gr c) em artigo de teste e controle negativo
Cólon de Cyno #1	-	epi de mucosa (luminal m) 2-4+ ocasional e 1+ rara a ocasional
Pulmão de Cyno #1	epi brônquica 1+ (gr c > m) rara a ocasional e ± (gr c > m) ocasional a frequente	-
Fígado de Cyno #1	-	-
Pâncreas de Cyno #1	-	-
Coração de Cyno #1	-	-
Rins de Cyno #070368M	-	epi tubular 1+ (gr c) rara e ± (gr c) rara
Bexiga de Cyno #1	célula epi temporária 2+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) rara a ocasional	-
CA ILS10108 de Pulmão	Pontuação H 180	tu -
CA ILS7223 de Pulmão	Pontuação H 180	tu -
CA ILS2156 A de Pulmão	Pontuação H 115	tu -
CA ILS7295 A de Pulmão	Pontuação H 115	tu -

[846] Um estudo de IHC comparativo foi conduzido a fim de avaliar as diferenças na ligação por hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (2C.2), e hMAB-A (2I.2) em 2,5 µg/mL ou 5 µg/mL. Células de controle positivo e negativo, tecidos humanos normais e tecidos de macaco *cynomolgus* foram empregados neste estudo. Os resultados do estudo são resumidos na Tabela 13.

Tabela 13					
Tecido	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 2,5 µg/mL	Controle de isotipo 5 µg/mL
P:3 Original de Cho-K	-	-	-	-	-
Expressão do meio P:1 de Cho-K/hu ADAM9.2	1+ (c) ocasional	2-4+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) rara a ocasional	2-4+ (gr c > m) rara a ocasional e 1+ (gr c > m) rara a ocasional	2-4+ (gr c > m) rara a ocasional e 1+ (gr c > m) rara a ocasional	-
P:1 de alta expressão de Cho- K/hu ADAM9.18	3+ (m,c) frequente	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente e 1+ (gr c > m) ocasional	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente e 1+ (gr c > m) ocasional	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K Cyno #2	1+ (c) ocasional	-	3-4+ (gr c > m) frequente	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K Cyno #16	2+ (c,m) ocasional a frequente	2-4+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) rara a ocasional	3-4+ (gr c > m) frequente	2-4+ (gr c > m) frequente	-
A498 072210	3-4+ (c,m) frequente	2-4+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	2-4+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	2-4+ (gr c > m) rara a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
CA ILS10108 de Pulmão	Pontuação de IHC 3	Pontuação de H 55	Pontuação de H 17	Pontuação de H 150	-
CA ILS7223 de Pulmão	Pontuação de IHC 3	Pontuação de H 205	Pontuação de H 160	Pontuação de H 180	-

Tabela 13					
Tecido	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 2,5 µg/mL	Controle de isotipo 5 µg/mL
CA ILS2156 A de Pulmão	Pontuação de IHC 1	Pontuação de H 5	Pontuação de H 0	Pontuação de H 80	-
CA ILS7295 A de Pulmão	Pontuação de IHC 1	Pontuação de H 1	Pontuação de H 0	Pontuação de H 60	-

[847] Um estudo de IHC comparativo adicional foi conduzido a fim de avaliar as diferenças na ligação por hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (2C.2), e hMAB-A (2I.2) e MAB-A murino em 2,5 µg/mL 5 µg/mL ou 12,5 µg/mL. Células de controle positivo e negativo, tecidos humanos normais e tecidos de macaco *cynomolgus* foram empregados neste estudo. Os resultados do estudo são resumidos na Tabela 14.

Tabela 14					
Tecido	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 12,5 µg/ml	MAB-A 5 µg/mL
MG06- CHTN-96 B Cólon	epi 1+ (c,m) rara; negativo	-	-	epi ± - 1+ rara ocasional	Epitélio 1-3+ [m, c] (ocas. a freq.); Outros (Neg)
MG06- CHtN- 162B1 A de pulmão	pneumócito s/macrófag Aos 2+ (c,m) ocasional	-	-	células alveolares (favorecem pneumócito s) 2-3+ (gr c > m) raras, 1+ (gr c > m) raras ocasionais ; EC 2-4+ (c,m)	Monócitos 1+ [c] (raros a ocas.); Outros (Neg)

Tabela 14					
Tecido	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 12,5 µg/ml	MAB-A 5 µg/mL
				rara, 1+ (c,m) rara	
ILS11103 B de Fígado	hepatócito s 1+ (c) raros a ocasionais	hepatócito s 1+ (gr c) frequentes	hepatócito s 2+ (gr c) raros e 1+ (gr c) frequentes	-	células Kupffer 3+ [c] (ocas.); Outros (Neg)
ILS10266 de Pâncreas	epi 1+ (c) raras; Células de Ilhota 1+ (c) muito raras	-	-	epi ductais 1+ (gr c > m) muito raras	Epitélio Ductal 1- 2+ [c, m] (raras a ocas.); Fibrilosa 2+ (rara); Outras (Neg)
0910035D de Herança ± de Vida Cardíaca		-	-	-	Neg
ILS10241 B de Rins	epi 2-3+ (c,m) frequente	epi tubular 2+ (gr c) rara ocasional e 1+ (gr c) ocasional a frequente	epi tubular 2+ (gr c) rara ocasional e 1+ (gr c) ocasional a frequente	epi atubular 1+ (gr c) rara ocasional	Epitélio 1+ [c] (rara); Outros (Neg)
ILSD8011 J de Bexiga	epi temporário 1+ (c) rara a ocasional	-	-	célula epi temporária 1+ (gr c) rara	Epitélio temporário 2+ [c, m] (ocas. a freq.); Células estromais 3+ [c] (raras);

Tabela 14					
Tecido	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 12,5 µg/ml	MAB-A 5 µg/mL
					Outros (Neg)
Cólon de Cyno #1	epi 1+ (c,m) rara	-	-	-	
Pulmão de Cyno #1	Macrófago e pneumócito s 1+ (c) muito raros	-	epi brônquicas 3-4+ (gr c) raras, 2+ (gr c) ocasional, e 1+ (gr c) ocasional	epi brônquicas 1+ (gr c > m) rara a ocasional e ± (gr c > m) ocasional a frequente	
Fígado de Cyno #1	hepatócito s 1+ (c) frequente	hepatócito s 2+ (gr c) rara a ocasional e 1+ (gr c) rara a ocasional	hepatócito s 2+ (gr c) rara a ocasional e 1+ (gr c) ocasional; epi ductal 1+ (gr c) ocasional	-	
Pâncreas de Cyno #1	epi e Células de Ilhota 1+ (c) muito raras	-	Células de Ilhota ± (gr c) frequentes ; epi ductal 1+ (gr c) rara a ocasional	-	positivo
Coração de Cyno #1	miocárdio 1+ (c) frequente	-	-	-	
Rins de Cyno #070368M	epi 2+ (c) frequente	epi tubular 2+	epi tubular 2+	-	positivo

Tabela 14					
Tecido	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 12,5 µg/ml	MAB-A 5 µg/mL
		(gr c) rara ocasional e 1+ (gr c) rara ocasional	(gr c) rara ocasional e 1+ (gr c) rara ocasional frequente		
Bexiga de Cyno #1	epi temporário ± (c); macrófagos muito raros	-	célula epi temporária 2-3+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) ocasional	célula epi temporária 2+ (gr c > m) rara e 1+ (gr c > m) rara ocasional	

[848] Os resultados, portanto, demonstram que hMAB-A (2.2) apresentou uma coloração de baixo nível geral de hepatócitos humanos e células tubulares dos rins em concentração ideal, com uma intensidade/frequência de coloração menor de reatividade em hepatócitos e células tubulares dos rins observada no controle negativo. hMAB-A (2.2) apresentou coloração de baixo nível semelhante de hepatócitos e células tubulares dos rins cyno em concentração ideal, com menor intensidade/frequência de coloração de reatividade em células tubulares dos rins observada no controle negativo.

[849] Os resultados também demonstram que hMAB-A (2C.2) apresentou uma coloração de baixo nível geral de hepatócitos e células tubulares dos rins humanos em concentração ideal, com menor intensidade/frequência de coloração de reatividade em hepatócitos e células tubulares dos rins observados no controle negativo. hMAB-A (2C.2) apresentou coloração de baixo nível semelhante em hepatócitos

e células tubulares dos rins cyno em concentração ideal. Achados mínimos adicionais em epitélio pulmonar, ilhotas/epitélio do pâncreas e epitélio de bexiga de cyno para hMAB-A (2C.2) não foram observados no tecido humano correspondente; intensidade/frequência de coloração menor de reatividade foi observada em epitélio de pulmão, células tubulares dos rins, epitélio de bexiga no controle negativo.

[850] Os resultados também demonstram que hMAB-A (2I.2) não apresentou coloração de tecidos humanos ou de cyno em concentração ideal, com coloração de célula epitelial temporária +/- rara. hMAB-A (2I.2) também apresentou coloração de baixo nível e de frequência geral de células alveolares do pulmão, epitélio ductal do pâncreas, células tubulares dos rins, célula epitelial temporária da bexiga de humano 5x a concentração ideal, e coloração de baixo nível geral de célula epitelial brônquica e de bexiga temporária de cyno em 5x a concentração ideal. hMAB-A (2I.2) apresentou um perfil de IHC favorável geral nos tecidos normais de humano testados e um perfil semelhante em tecidos de macaco *cynomolgus* correspondentes.

[851] Todas as publicações e patentes mencionadas nesta especificação são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado por referência em sua integridade. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com suas realizações específicas, será entendido que é capaz de modificações adicionais e esse pedido é destinado a abranger quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção, seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais desvios

da presente revelação como estando dentro da prática conhecida ou costumeira dentro da técnica à qual a invenção pertence e conforme possam ser aplicados aos aspectos essenciais estabelecidos aqui acima.



### REIVINDICAÇÕES

1. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, caracterizada por compreender um domínio de ligação a ADAM9, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 compreende um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH), em que o dito Domínio Variável de Cadeia Pesada compreende um Domínio CDR<sub>H1</sub>, um Domínio CDR<sub>H2</sub> e um Domínio CDR<sub>H3</sub>, e o dito Domínio Variável de Cadeia Leve compreende um Domínio CDR<sub>L1</sub>, um Domínio CDR<sub>L2</sub>, e um Domínio CDR<sub>L3</sub>, em que:

(A) os ditos Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de **MAB-A**; e os ditos Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de **MAB-A**; ou

(B) os ditos Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de **MAB-A**; e os ditos Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de **MAB-A**; ou

(C) os ditos Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> têm a sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de **MAB-A**; e os ditos Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub>, e Domínio CDR<sub>L3</sub> têm a

sequência de aminoácidos do Domínio CDR<sub>L</sub>1, Domínio CDR<sub>L</sub>2, e Domínio CDR<sub>L</sub>3 de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de **MAB-A**.

2. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo dito domínio de ligação a ADAM9 possuir:

(A) (1) o Domínio CDR<sub>H</sub>1, Domínio CDR<sub>H</sub>2 e Domínio CDR<sub>H</sub>3 do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de **MAB-A**; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 de um Domínio VH de uma variante humanizada de **MAB-A**; ou

(B) (1) o Domínio CDR<sub>L</sub>1, Domínio CDR<sub>L</sub>2 e Domínio CDR<sub>L</sub>3 do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) **MAB-A**; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 de um Domínio VL de uma variante humanizada de **MAB-A**; ou

(C) (1) o Domínio CDR<sub>H</sub>1, Domínio CDR<sub>H</sub>2 e Domínio CDR<sub>H</sub>3 de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de **MAB-A**; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 do Domínio VH de uma variante humanizada de **MAB-A**; ou

(D) (1) o Domínio CDR<sub>L</sub>1, Domínio CDR<sub>L</sub>2 e Domínio CDR<sub>L</sub>3 de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de **MAB-A**; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 do Domínio VL de uma variante humanizada de **MAB-A**; ou

(E) (1) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante humanizada/otimizada de **MAB-A**; e

(2) o Domínio VL Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante humanizada/otimizada de **MAB-A**.

3. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que o dito Domínio

Variável de Cadeia Pesada (VH) da dita variante otimizada de **MAB-A** é caracterizado por compreender a sequência de aminoácidos de **SEQ ID NO:15**:

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWX<sub>1</sub>HWVRQA**  
 PGKGLEWVGE **IIPIX<sub>2</sub>GHTNY** **NEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RFTI** SLDNSKNTLY  
 LQMGSRLRAED TAVYYCARGG **YYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>**  
**DYWGQGTTVT** VSS

em que: **X<sub>1</sub>**, **X<sub>2</sub>**, **X<sub>3</sub>**, **X<sub>4</sub>**, **X<sub>5</sub>**, e **X<sub>6</sub>** são selecionados de maneira independente,

em que: **X<sub>1</sub>** é M ou I; **X<sub>2</sub>** é N ou F;

**X<sub>3</sub>** é K ou R; **X<sub>4</sub>** é K ou Q;

**X<sub>5</sub>** é S ou G, e **X<sub>6</sub>** é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D;

em que: **X<sub>7</sub>**, **X<sub>8</sub>**, **X<sub>9</sub>**, **X<sub>10</sub>**, e **X<sub>11</sub>** são selecionados de modo que:

quando **X<sub>6</sub>** for P; **X<sub>7</sub>** é K ou R; **X<sub>8</sub>** é F ou M; **X<sub>9</sub>** é G; **X<sub>10</sub>** é W ou F; e **X<sub>11</sub>** é M, L ou K;

quando **X<sub>6</sub>** for F, Y ou W; **X<sub>7</sub>** é N ou H; **X<sub>8</sub>** é S ou K; **X<sub>9</sub>** é G ou A; **X<sub>10</sub>** é T ou V; e **X<sub>11</sub>** é M, L ou K;

quando **X<sub>6</sub>** for I, L ou V; **X<sub>7</sub>** é G; **X<sub>8</sub>** é K; **X<sub>9</sub>** é G ou A; **X<sub>10</sub>** é V; e **X<sub>11</sub>** é M, L ou K;

quando **X<sub>6</sub>** for T; **X<sub>7</sub>** é G; **X<sub>8</sub>** é K, M ou N; **X<sub>9</sub>** é G; **X<sub>10</sub>** é V ou T; e **X<sub>11</sub>** é L ou M;

quando **X<sub>6</sub>** for G; **X<sub>7</sub>** é G; **X<sub>8</sub>** é S; **X<sub>9</sub>** é G; **X<sub>10</sub>** é V; e **X<sub>11</sub>** é L;

quando **X<sub>6</sub>** for D; **X<sub>7</sub>** é S; **X<sub>8</sub>** é N; **X<sub>9</sub>** é A; **X<sub>10</sub>** é V; e **X<sub>11</sub>** é L.

4. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelos ditos Domínio CDR<sub>H1</sub>, Domínio CDR<sub>H2</sub> e Domínio CDR<sub>H3</sub> do dito Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) da dita variante

otimizada de **MAB-A**, respectivamente, têm as sequências de aminoácidos de:

(1) **SEQ ID NO:47** (SYWX<sub>1</sub>H)

em que: **X<sub>1</sub>** é M ou I;

(2) **SEQ ID NO:48** (EIIPIX<sub>2</sub>GHTNYNEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>)

em que: **X<sub>2</sub>**, **X<sub>3</sub>**, **X<sub>4</sub>**, e **X<sub>5</sub>** são selecionados de maneira independente, e

em que: **X<sub>2</sub>** é N ou F; **X<sub>3</sub>** é K ou R;

**X<sub>4</sub>** é K ou Q; e

**X<sub>5</sub>** é S ou G; e

(3) **SEQ ID NO:49** (GGYYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DY)

em que: **X<sub>6</sub>**, é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D, e **X<sub>7</sub>**, **X<sub>8</sub>**, **X<sub>9</sub>**, **X<sub>10</sub>**, e **X<sub>11</sub>** são selecionados de modo que:

(A) quando **X<sub>6</sub>** for P:

**X<sub>7</sub>** é K ou R; **X<sub>8</sub>** é F ou M; **X<sub>9</sub>** é G;

**X<sub>10</sub>** é W ou F; e **X<sub>11</sub>** é M, L ou K;

(B) quando **X<sub>6</sub>** for F, Y ou W:

**X<sub>7</sub>** é N ou H; **X<sub>8</sub>** é S ou K; **X<sub>9</sub>** é G ou A;

**X<sub>10</sub>** é T ou V; e **X<sub>11</sub>** é M, L ou K;

(C) quando **X<sub>6</sub>** for I, L ou V:

**X<sub>7</sub>** é G; **X<sub>8</sub>** é K; **X<sub>9</sub>** é G ou A;

**X<sub>10</sub>** é V; e **X<sub>11</sub>** é M, L ou K;

(D) quando **X<sub>6</sub>** for T:

**X<sub>7</sub>** é G; **X<sub>8</sub>** é K, M ou N; **X<sub>9</sub>** é G;

**X<sub>10</sub>** é V ou T; e **X<sub>11</sub>** é L ou M;

(E) quando **X<sub>6</sub>** for G:

**X<sub>7</sub>** é G; **X<sub>8</sub>** é S; **X<sub>9</sub>** é G;

**X<sub>10</sub>** é V; e **X<sub>11</sub>** é L; e

(F) quando **X<sub>6</sub>** for D:

**X<sub>7</sub>** é S; **X<sub>8</sub>** é N; **X<sub>9</sub>** é A;

**X<sub>10</sub>** é V; e **X<sub>11</sub>** é L.

5. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 4, em que o dito Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) da dita variante otimizada de **MAB-A** é selecionado do grupo caracterizado por consistir em:

- (1) **hMAB-A VH(1)** (SEQ ID NO:16);
- (2) **hMAB-A VH(2)** (SEQ ID NO:17);
- (3) **hMAB-A VH(3)** (SEQ ID NO:18);
- (4) **hMAB-A VH(4)** (SEQ ID NO:19);
- (5) **hMAB-A VH(2A)** (SEQ ID NO:20);
- (6) **hMAB-A VH(2B)** (SEQ ID NO:21);
- (7) **hMAB-A VH(2C)** (SEQ ID NO:22);
- (8) **hMAB-A VH(2D)** (SEQ ID NO:23);
- (9) **hMAB-A VH(2E)** (SEQ ID NO:24);
- (10) **hMAB-A VH(2F)** (SEQ ID NO:25);
- (11) **hMAB-A VH(2G)** (SEQ ID NO:26);
- (12) **hMAB-A VH(2H)** (SEQ ID NO:27);
- (13) **hMAB-A VH(2I)** (SEQ ID NO:28); e
- (14) **hMAB-A VH(2J)** (SEQ ID NO:29).

6. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o dito Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) é caracterizado por compreender a sequência de aminoácidos de **SEQ ID NO:53**:

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISC <b><u>X<sub>12</sub>ASQSVD</u></b>
<b><u>YX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>NWY</u></b>	QQKPGQPPKL	LIY <b><u>AASDLES</u></b>
GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFATY
YC <b><u>QQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PF</u></b>	<b><u>TFGQGTKLEI</u></b>	K

em que: **X<sub>12</sub>**, **X<sub>13</sub>**, **X<sub>14</sub>**, **X<sub>15</sub>**, **X<sub>16</sub>**, e **X<sub>17</sub>**, são selecionados de maneira independente, e

em que: **X<sub>12</sub>** é K ou R; **X<sub>13</sub>** é D ou S;

**X<sub>14</sub>** é M ou L; **X<sub>15</sub>** é H ou Y;

**X<sub>16</sub>** é E ou S; e **X<sub>17</sub>** é D ou T.

7. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelos ditos Domínio CDR<sub>L1</sub>, Domínio CDR<sub>L2</sub> e Domínio CDR<sub>L3</sub> do dito Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) da dita variante otimizada de **MAB-A** respectivamente ter as sequências de aminoácidos de:

(1) **SEQ ID NO:66** (X<sub>12</sub>ASQSV<sub>DYX</sub><sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>N)

em que: **X<sub>12</sub>**, **X<sub>13</sub>**, **X<sub>14</sub>**, são selecionados de maneira independente, e

em que: **X<sub>12</sub>** é K ou R; **X<sub>13</sub>** é D ou S; e **X<sub>14</sub>** é M ou L;

(2) **SEQ ID NO:13** (AASDLES); e

(3) **SEQ ID NO:67** (QQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PFT)

em que: **X<sub>15</sub>**, **X<sub>16</sub>**, e **X<sub>17</sub>**, são selecionados de maneira independente, e

em que: **X<sub>15</sub>** é H ou Y; **X<sub>16</sub>** é E ou S; e **X<sub>17</sub>** é D ou T.

8. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 7, em que o dito Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) da dita variante otimizada de **MAB-A** é selecionado do grupo caracterizado por consistir em:

(1) **hMAB-A VL(1)** (**SEQ ID NO:54**);

(2) **hMAB-A VL(2)** (**SEQ ID NO:55**);

(3) **hMAB-A VL(3)** (**SEQ ID NO:56**);

(4) **hMAB-A VL(4)** (**SEQ ID NO:57**);

(5) **hMAB-A VL(2A)** (**SEQ ID NO:20**).

9. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender:

(A) (1) um Domínio CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência

de aminoácidos SYWMH (**SEQ ID NO:8**);

(2) um Domínio CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de aminoácidos EIIPIFGHTNYNEKFKS (**SEQ ID NO:35**); ou

(3) um Domínio CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de aminoácidos GGYYYYPRQGFLDY (**SEQ ID NO:45**);

ou

(B) (1) um Domínio CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de aminoácidos KASQSVDSYSGDSYMN (**SEQ ID NO:62**);

(2) um Domínio CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de aminoácidos AASDLES (**SEQ ID NO:13**); ou

(3) um Domínio CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de aminoácidos QQSHEDPFT (**SEQ ID NO:14**);

10. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 9, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender o dito Domínio CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de aminoácidos SYWMH (**SEQ ID NO:8**), o dito Domínio CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de aminoácidos EIIPIFGHTNYNEKFKS (**SEQ ID NO:35**), e o dito Domínio CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de aminoácidos GGYYYYPRQGFLDY (**SEQ ID NO:45**).

11. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 ou 10, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender o dito Domínio CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de aminoácidos KASQSVDSYSGDSYMN (**SEQ ID NO:62**), o dito Domínio CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de aminoácidos AASDLES (**SEQ ID NO:13**), e dito Domínio CDR<sub>L3</sub> que compreender a sequência de aminoácidos QQSHEDPFT (**SEQ ID NO:14**).

12. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, em que o dito domínio

de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender:

(A) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de **hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28)**; ou

(B) o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de **hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55)**; ou

(C) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de **hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28)** e o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de **hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55)**.

13. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender um Domínio CDR<sub>H</sub>1, um Domínio CDR<sub>H</sub>2, e um Domínio CDR<sub>H</sub>3 e um Domínio CDR<sub>L</sub>1, um Domínio CDR<sub>L</sub>2, e um Domínio CDR<sub>L</sub>3 tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

(a) **SEQ ID NOS:8, 35 e 10 e SEQ ID NOS:62, 13 e 14**, respectivamente

(b) **SEQ ID NOS:8, 35 e 10 e SEQ ID NOS:63, 13 e 14**, respectivamente;

(c) **SEQ ID NOS:8, 36 e 10 e SEQ ID NOS:63, 13 e 14**, respectivamente; e

(d) **SEQ ID NOS:34, 36 e 10 e SEQ ID NO:64, 13 e 65**, respectivamente.

14. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 13, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas às sequências selecionadas do grupo consistindo em:

(a) **SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:55**, respectivamente;



- (b) **SEQ ID NO:17** e **SEQ ID NO:56**, respectivamente;
- (c) **SEQ ID NO:18** e **SEQ ID NO:56**, respectivamente; e
- (d) **SEQ ID NO:19** e **SEQ ID NO:57**, respectivamente.

15. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 14, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

- (a) **SEQ ID NO:17** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (b) **SEQ ID NO:17** e **SEQ ID NO:56**, respectivamente;
- (c) **SEQ ID NO:18** e **SEQ ID NO:56**, respectivamente; e
- (d) **SEQ ID NO:19** e **SEQ ID NO:57**, respectivamente.

16. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo dito domínio de ligação a ADAM9 ter pelo menos uma intensificação de 150 vezes na afinidade de ligação a ADAM9 cino e reter ligação de alta afinidade a ADAM9 humano conforme comparado a **MAB-A**.

17. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 16, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender um Domínio CDR<sub>H</sub>1, um Domínio CDR<sub>H</sub>2, e um Domínio CDR<sub>H</sub>3 e um Domínio CDR<sub>L</sub>1, um Domínio CDR<sub>L</sub>2, e um Domínio CDR<sub>L</sub>3 tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

- (a) **SEQ ID NOs:8, 35 e 37** e **SEQ ID NOs:62, 13 e 14**, respectivamente;
- (b) **SEQ ID NOs:8, 35 e 38** e **SEQ ID NOs:62, 13 e 14**, respectivamente;
- (c) **SEQ ID NOs:8, 35 e 39** e **SEQ ID NOs:62, 13 e 14**, respectivamente;
- (d) **SEQ ID NOs:8, 35 e 40** e **SEQ ID NOs:62, 13 e 14**,

respectivamente;

(e) **SEQ ID NOs:8, 35 e 41 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14,**  
respectivamente;

(f) **SEQ ID NOs:8, 35 e 42 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14,**  
respectivamente;

(g) **SEQ ID NOs:8, 35 e 43 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14,**  
respectivamente;

(h) **SEQ ID NOs:8, 35 e 44 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14,**  
respectivamente;

(i) **SEQ ID NOs:8, 35 e 45 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14,**  
respectivamente; e

(j) **SEQ ID NOs:8, 35 e 46 e SEQ ID NOs:62, 13 e 14,**  
respectivamente.

18. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 17, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas às sequências selecionadas do grupo consistindo em:

- (a) **SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (b) **SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (c) **SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (d) **SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (e) **SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (f) **SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (g) **SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (h) **SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55,** respectivamente;
- (i) **SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55,** respectivamente; e
- (j) **SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55,** respectivamente.

19. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 18, em que o dito domínio de ligação a ADAM9 é caracterizado por compreender um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências selecionadas do grupo consistindo em:

- (a) **SEQ ID NO:20** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (b) **SEQ ID NO:21** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (c) **SEQ ID NO:22** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (d) **SEQ ID NO:23** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (e) **SEQ ID NO:24** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (f) **SEQ ID NO:25** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (g) **SEQ ID NO:26** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (h) **SEQ ID NO:27** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente;
- (i) **SEQ ID NO:28** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente; e
- (j) **SEQ ID NO:29** e **SEQ ID NO:55**, respectivamente.

20. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pela dita molécula ser um anticorpo de ligação a ADAM9 monoespecífico ou um fragmento de ligação a ADAM9 deste.

21. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pela dita molécula ser um anticorpo biespecífico.

22. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, em que a dita molécula é um diacorpo, o dito diacorpo sendo um complexo ligado de maneira covalente caracterizado por compreender duas, três, quatro ou cinco cadeias de polipeptídeos.

23. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pela dita molécula ser uma molécula de ligação trivalente, a dita

molécula de ligação trivalente sendo um complexo ligado de maneira covalente que compreende três, quatro, cinco ou mais cadeias de polipeptídeos.

24. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 23, em que a dita molécula é caracterizada por compreender um Domínio de Ligação a Albumina (ABD).

25. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, em que a dita molécula de ligação a ADAM9 é caracterizada por compreender uma Região Fc.

26. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 21, em que a dita Região Fc é uma Região Fc variante caracterizada por compreender:

(a) uma ou mais modificações de aminoácidos que redizem a afinidade da Região Fc variante para uma FcγR; e/ou

(b) uma ou mais modificações de aminoácidos que intensifica a meia-vida sérica da dita molécula de ligação a ADAM9.

27. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 26, em que as ditas uma ou mais modificações de aminoácidos que reduzem a afinidade da Região Fc variante para uma FcγR são caracterizadas por compreender:

(A) L234A;

(B) L235A; ou

(C) L234A e L235A;

em que a dita numeração é a do índice EU, como em Kabat.

28. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 ou 27, em que as ditas uma

ou mais modificações de aminoácidos que intensificam a meia-vida sérica da dita molécula de ligação a ADAM9 são caracterizadas por compreender:

- (A) M252Y;
- (B) M252Y e S254T;
- (C) M252Y e T256E;
- (D) M252Y, S254T e T256E; ou
- (E) K288D e H435K;

em que a dita numeração é a do índice EU, como em Kabat.

29. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20 ou 22 a 28, em que a dita molécula é biespecífica e caracterizada por compreender um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de ADAM9 e um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de uma molécula presente na superfície de uma célula efetora.

30. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 22, em que a dita molécula é caracterizada por compreender dois sítios de ligação a epítopo capazes de ligação imunoesspecífica a epítopo(s) de ADAM9 e dois sítios de ligação a epítopo capazes de ligação imunoesspecífica a epítopo(s) de uma molécula presente na superfície de uma célula efetora.

31. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou 23 a 28, em que a dita molécula é triespecífica e caracterizada por compreender:

(a) um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de ADAM9;

(b) um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de uma primeira molécula presente na superfície de uma célula efetora; e

(c) um sítio de ligação a epítopo capaz de ligação imunoesspecífica a um epítopo de uma segunda molécula presente na superfície de uma célula efetora.

32. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizada pela dita molécula ser capaz de se ligar simultaneamente a ADAM9 e à dita molécula presente na superfície de uma célula efetora.

33. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizada pela dita molécula presente na superfície de uma célula efetora ser CD2, CD3, CD8, TCR, ou NKG2D.

34. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33, caracterizada pela dita célula efetora ser uma célula T citotóxica ou uma célula *Natural Killer* (NK).

35. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 34, caracterizada pela dita molécula presente na superfície da dita célula efetora ser CD3.

36. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pela dita primeira molécula presente na superfície de uma célula efetora ser CD3 e a dita segunda molécula presente na superfície de uma célula efetora ser CD8.

37. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 36, caracterizada pela dita molécula de ligação a ADAM9 mediar ligação coordenada de

uma célula que expressa ADAM9 e uma célula T citotóxica.

38. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender uma quantidade eficaz da molécula de ligação a ADAM9, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, e um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

39. USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou da composição farmacêutica, conforme definido na reivindicação 38, caracterizada por ser no tratamento de uma doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9.

40. USO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pela dita doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9 ser câncer.

41. USO, de acordo com a reivindicação 40, em que o dito câncer é selecionado do grupo caracterizado por consistir em: câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal, câncer esofágico, câncer gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer da fígado, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer mieloide, câncer de ovário, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, câncer de tireoide, câncer testicular, e câncer do útero.

42. USO, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo dito câncer de pulmão de células não pequenas ser carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, ou carcinoma indiferenciado de células grandes.

43. USO, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo dito câncer colorretal ser adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais

gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma, melanoma, ou carcinoma de células escamosas.

44. MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO ASSOCIADA OU CARACTERIZADA PELA EXPRESSÃO DE ADAM9 EM UM INDIVÍDUO, caracterizado por compreender administração ao dito indivíduo de uma quantidade eficaz da molécula de ligação a ADAM9, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou da composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 38.

45. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pela dita doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de ADAM9 ser câncer.

46. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 45, em que o dito câncer é selecionado do grupo caracterizado por consistir em câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal, câncer esofágico, câncer gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer do fígado, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer mieloide, câncer de ovário, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, câncer de tireoide, câncer testicular, e câncer do útero.

47. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo dito câncer de pulmão de células não pequenas ser carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, ou carcinoma indiferenciado de células grandes.

48. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo dito câncer colorretal ser adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma, melanoma, ou carcinoma de células escamosas.



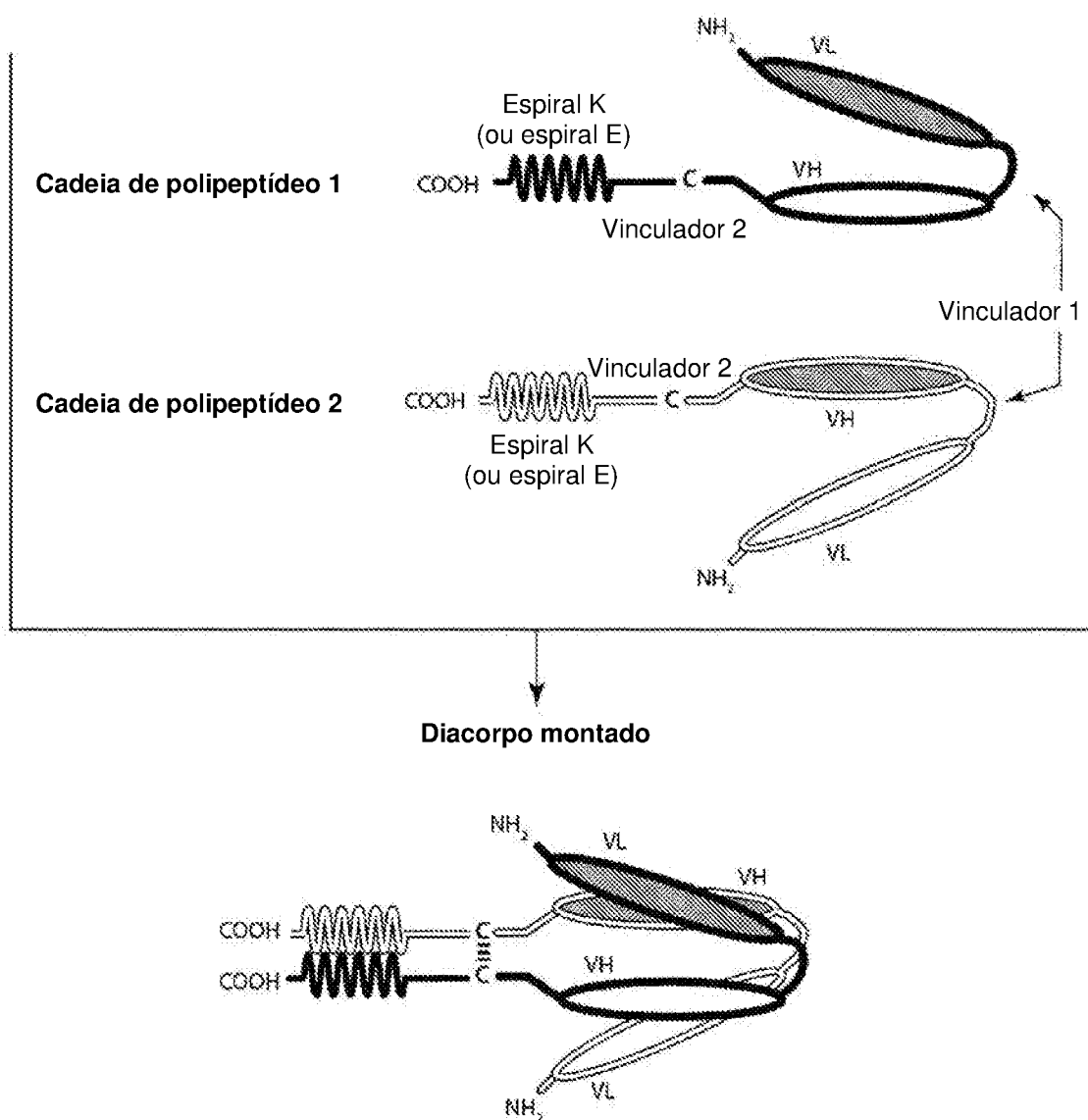


Figura 1

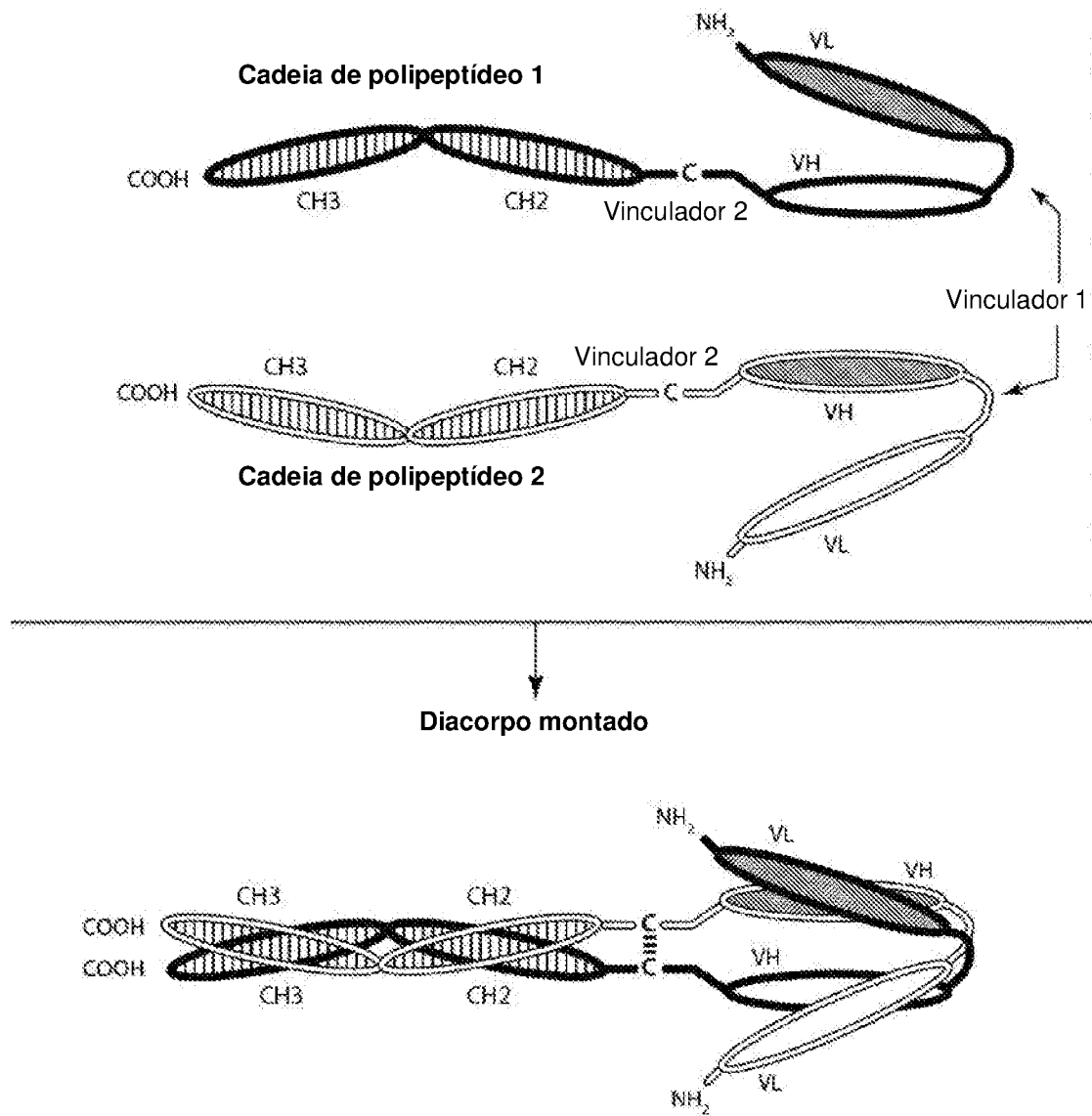


Figura 2

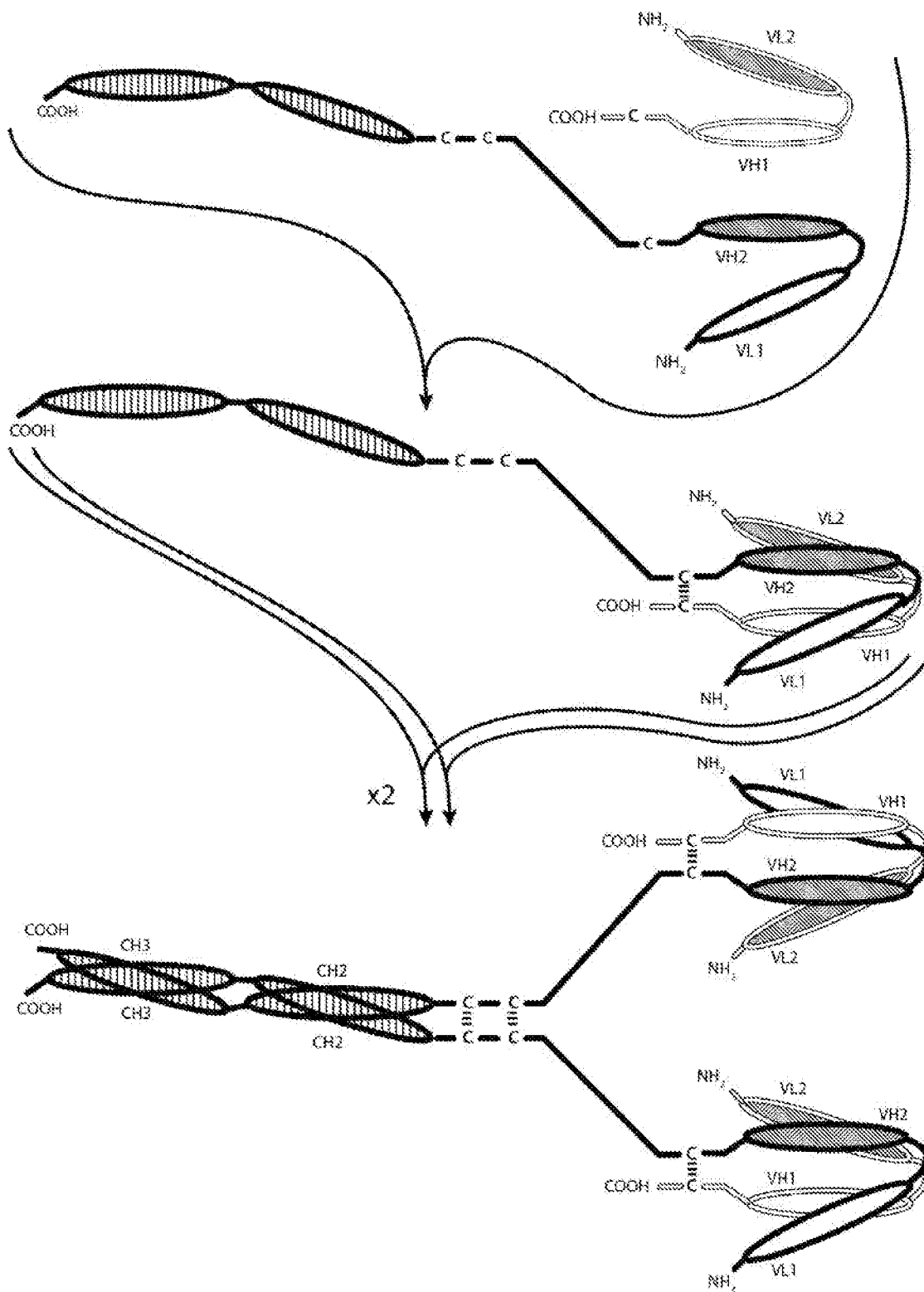


Figura 3A

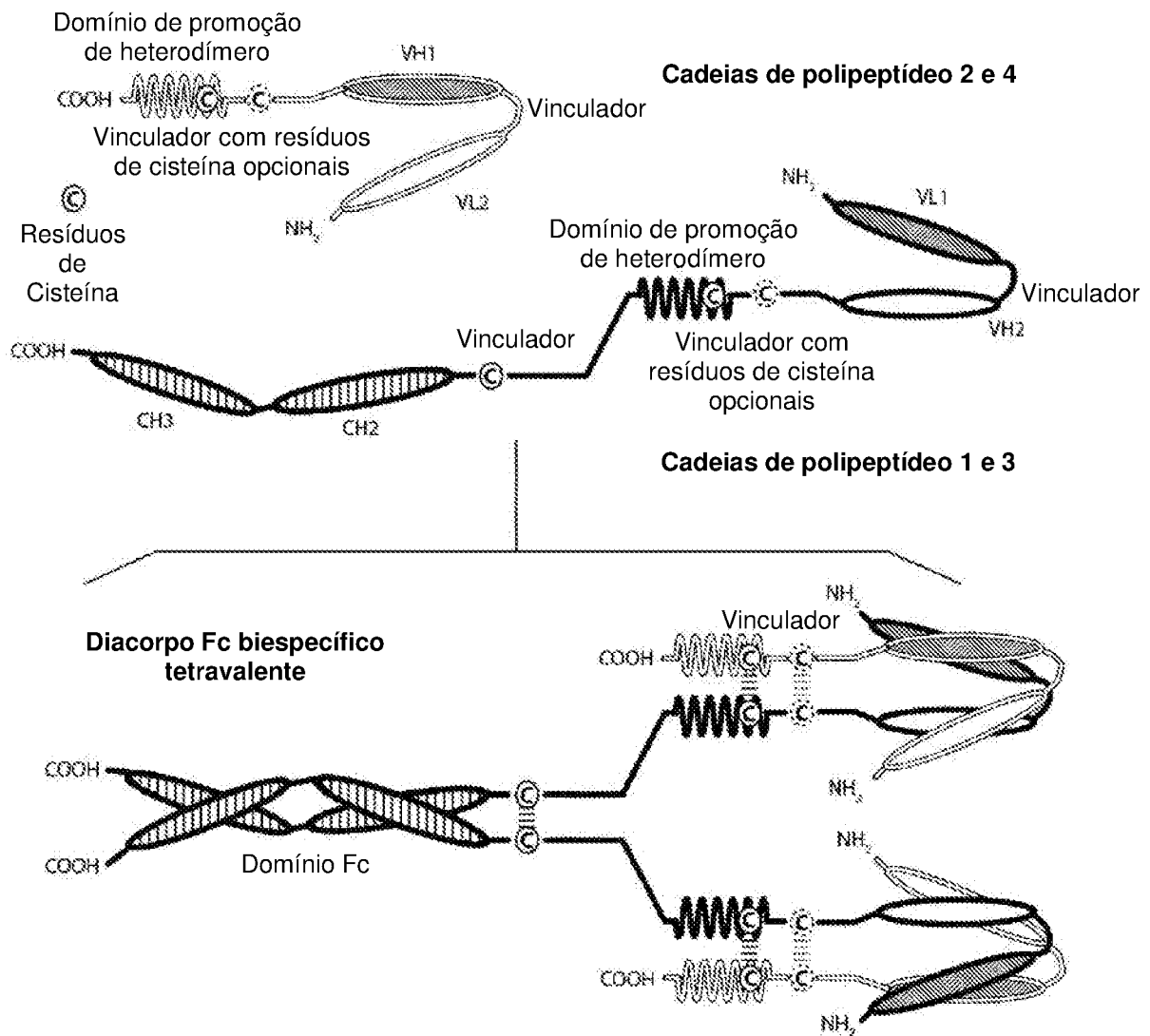


Figura 3B

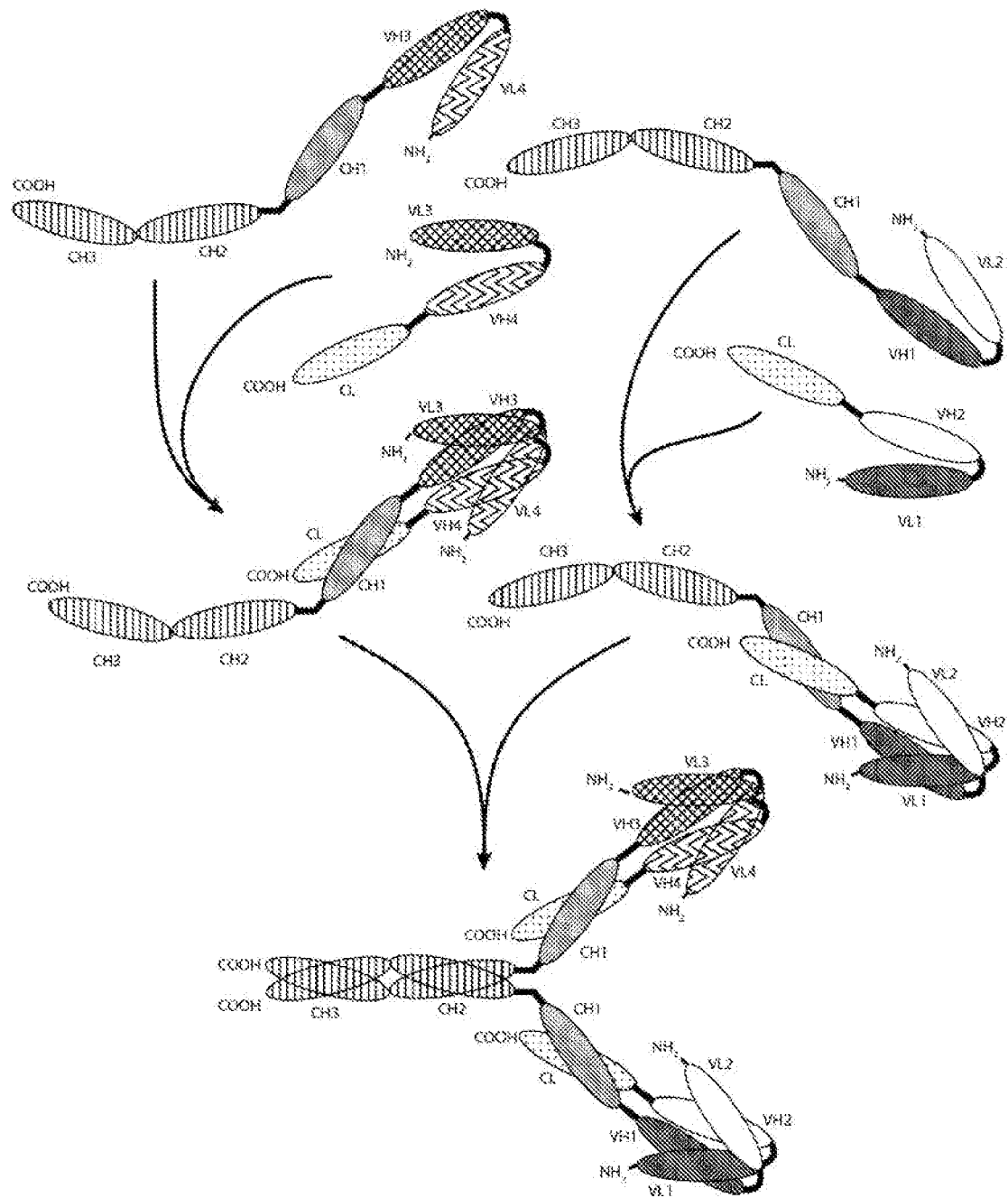


Figura 3C

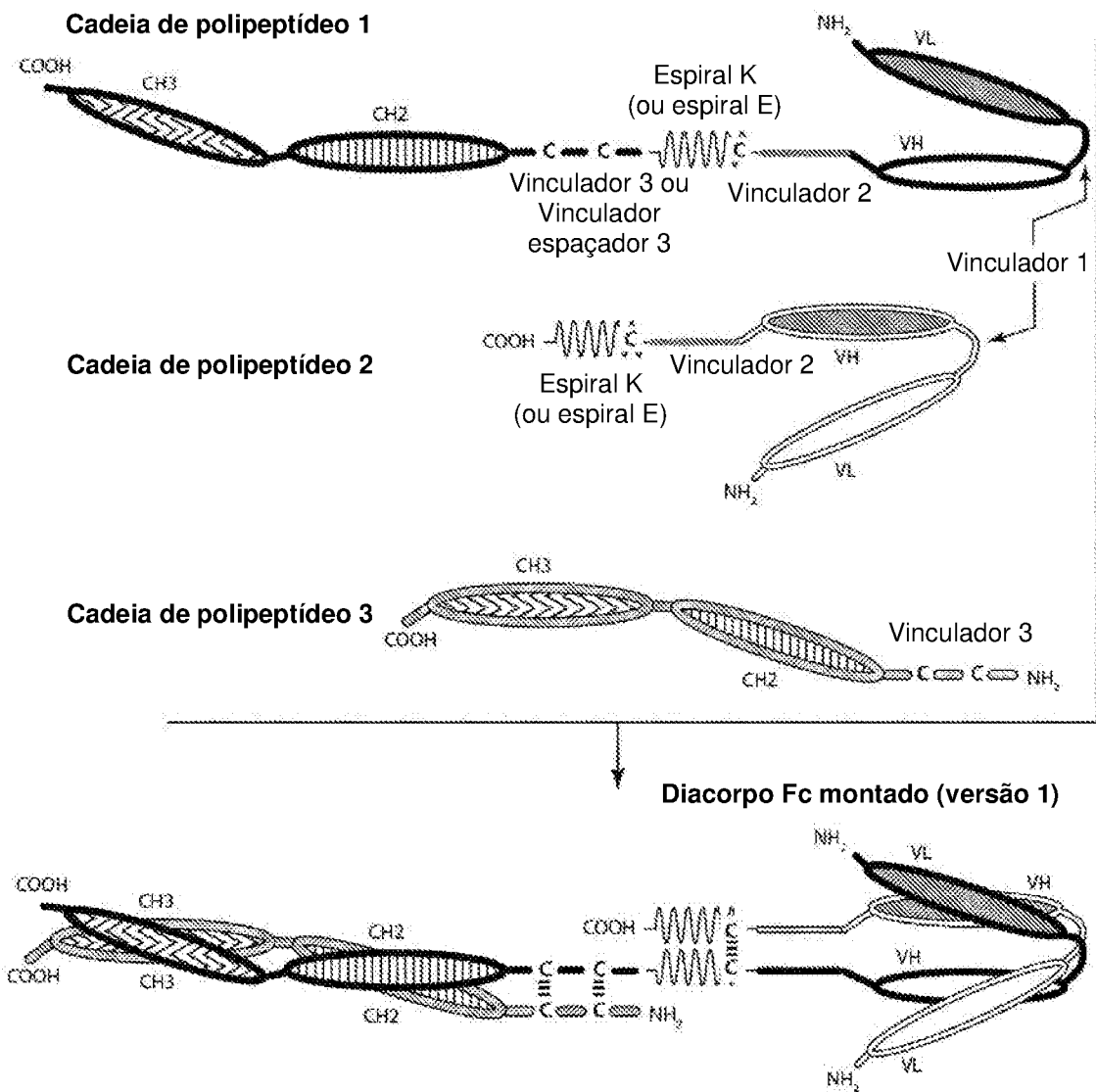


Figura 4A

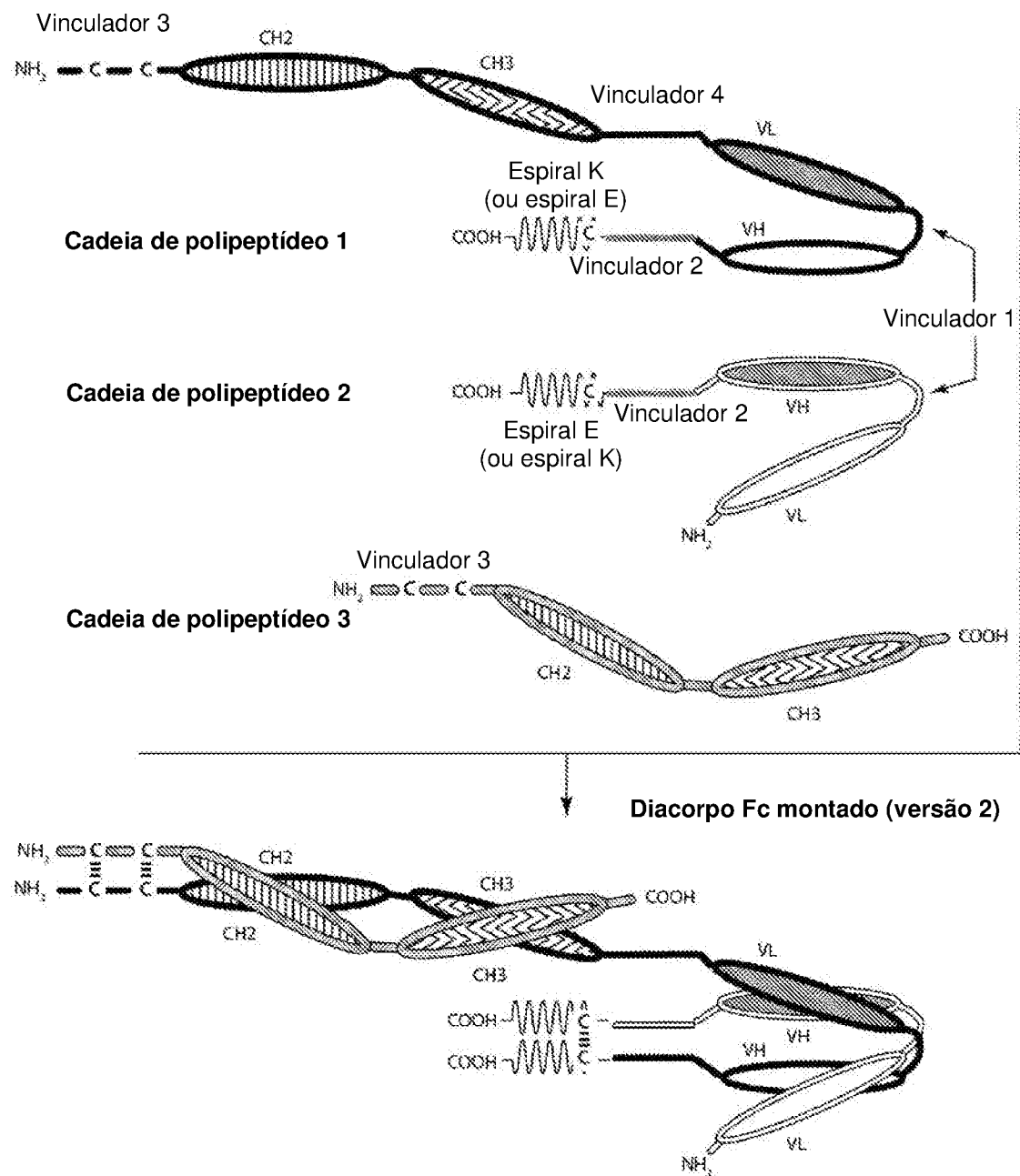
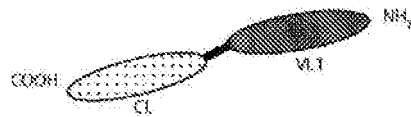
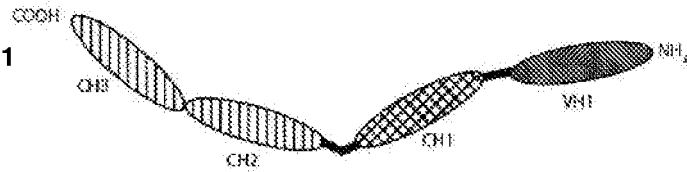


Figura 4B

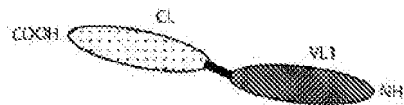
Cadeia de polipeptídeo 2



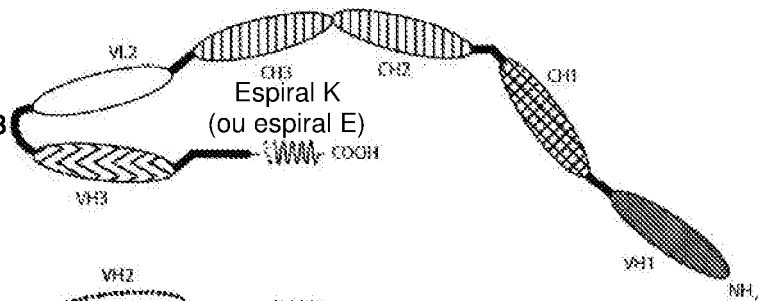
Cadeia de polipeptídeo 1



Cadeia de polipeptídeo 5



Cadeia de polipeptídeo 3



Cadeia de polipeptídeo 4

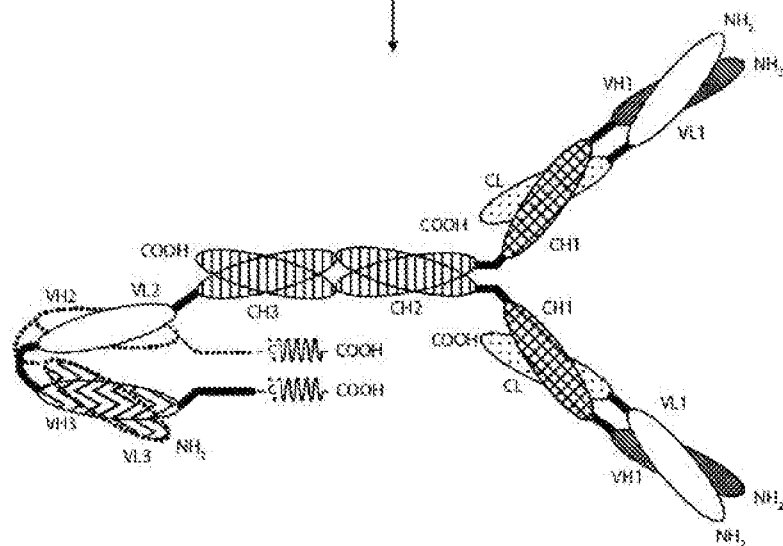
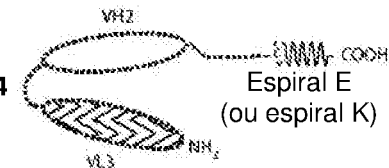


Figura 5



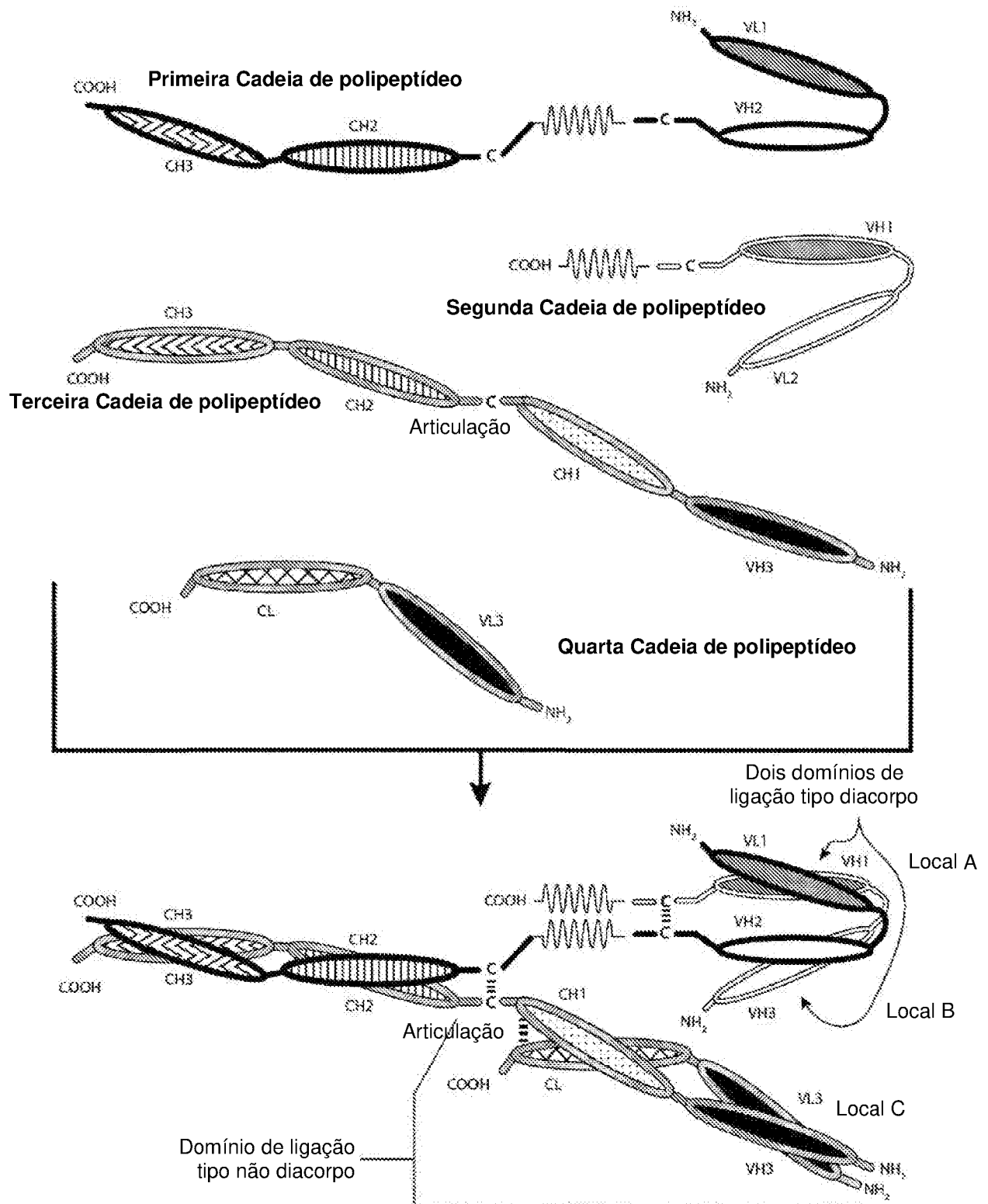


Figura 6A

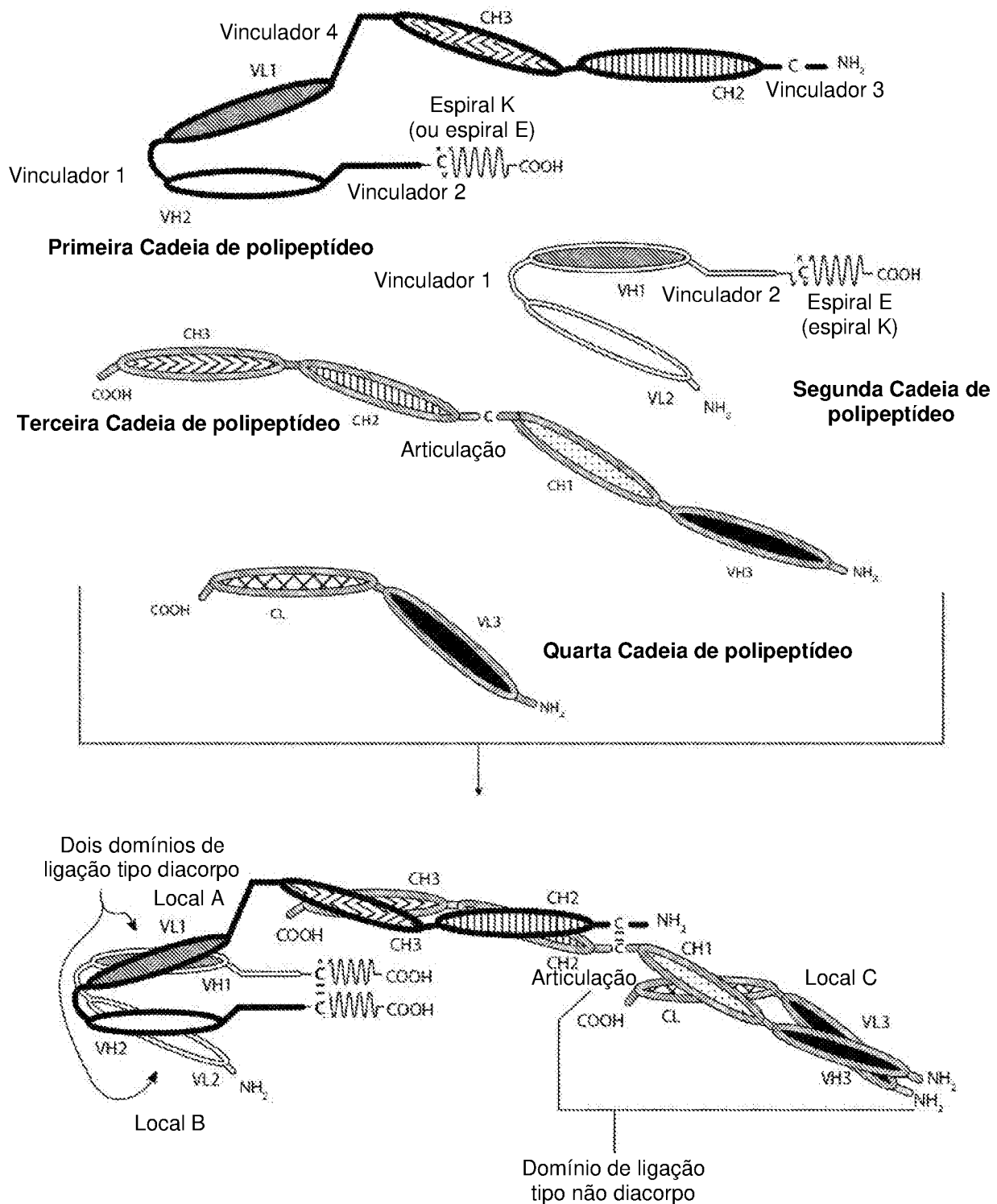


Figura 6B

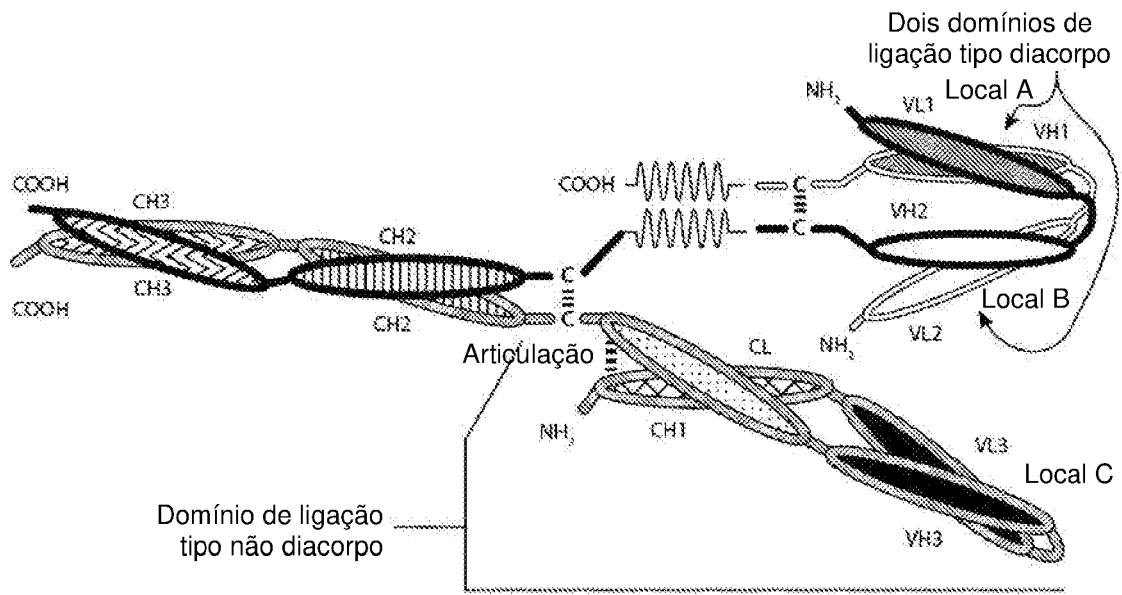


Figura 6C

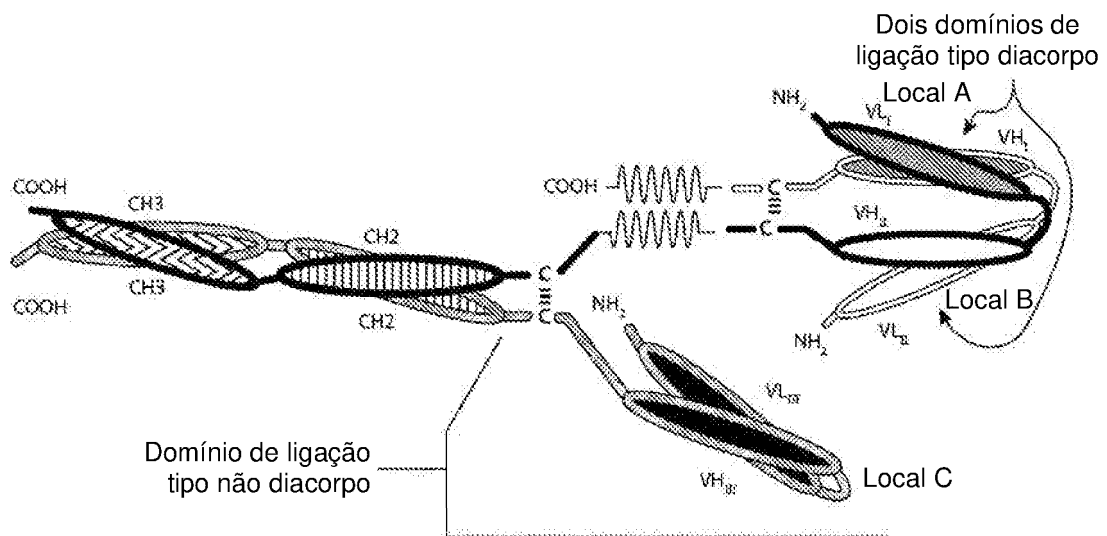


Figura 6D

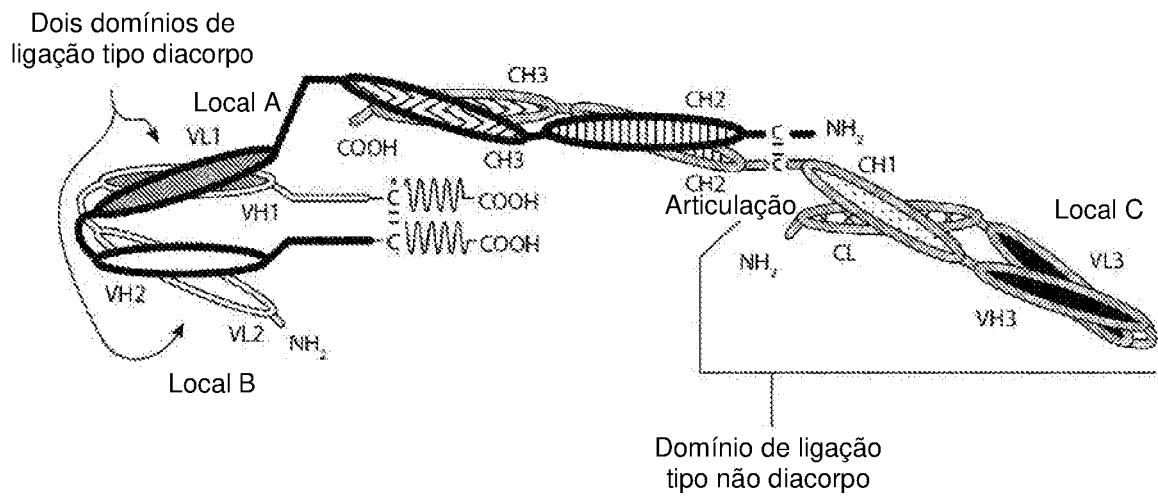


Figura 6E

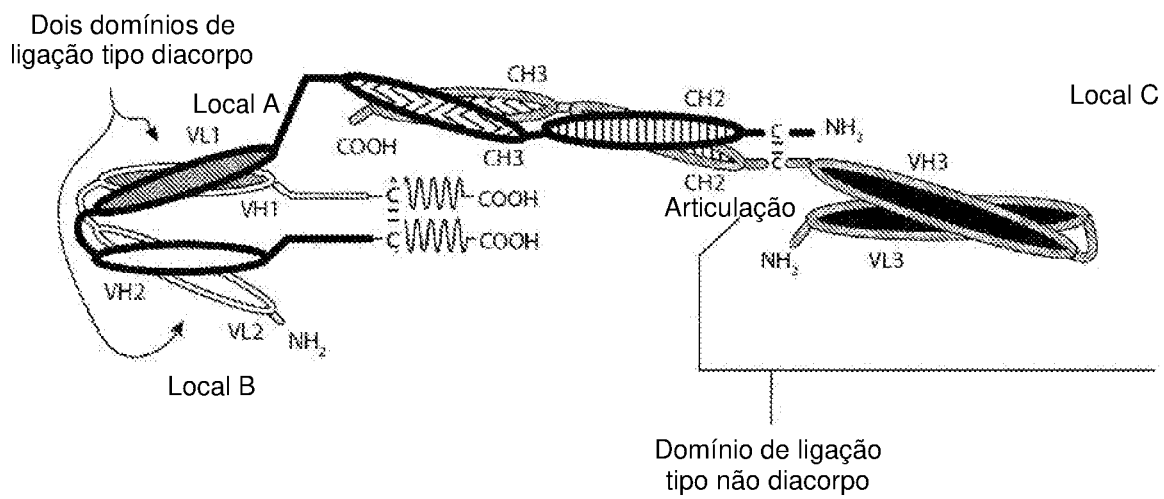


Figura 6F

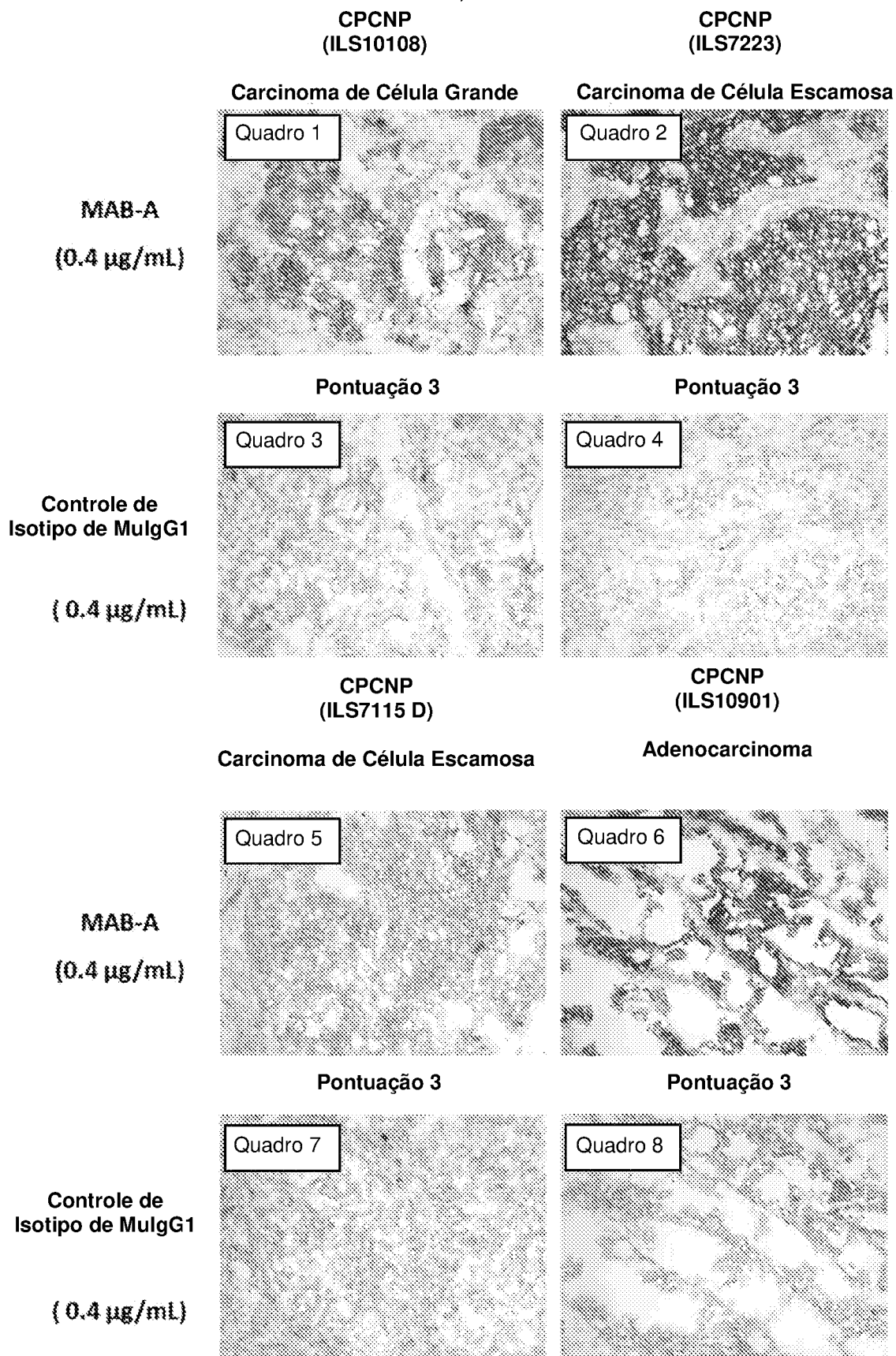
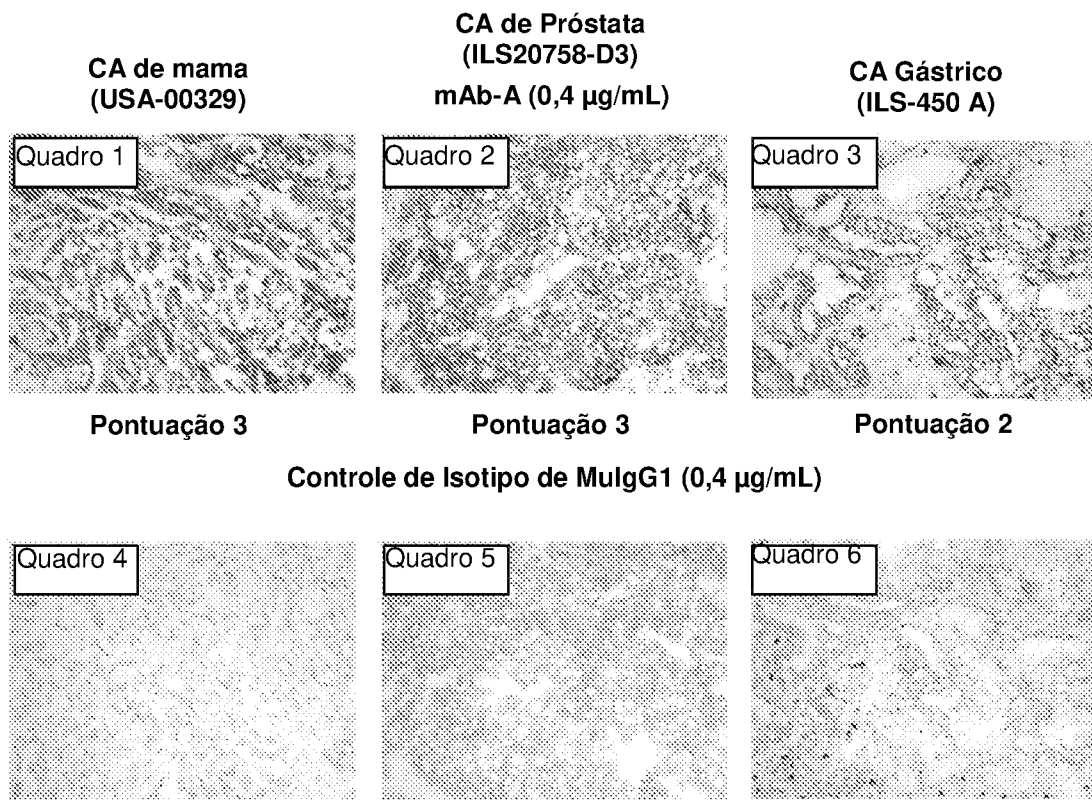
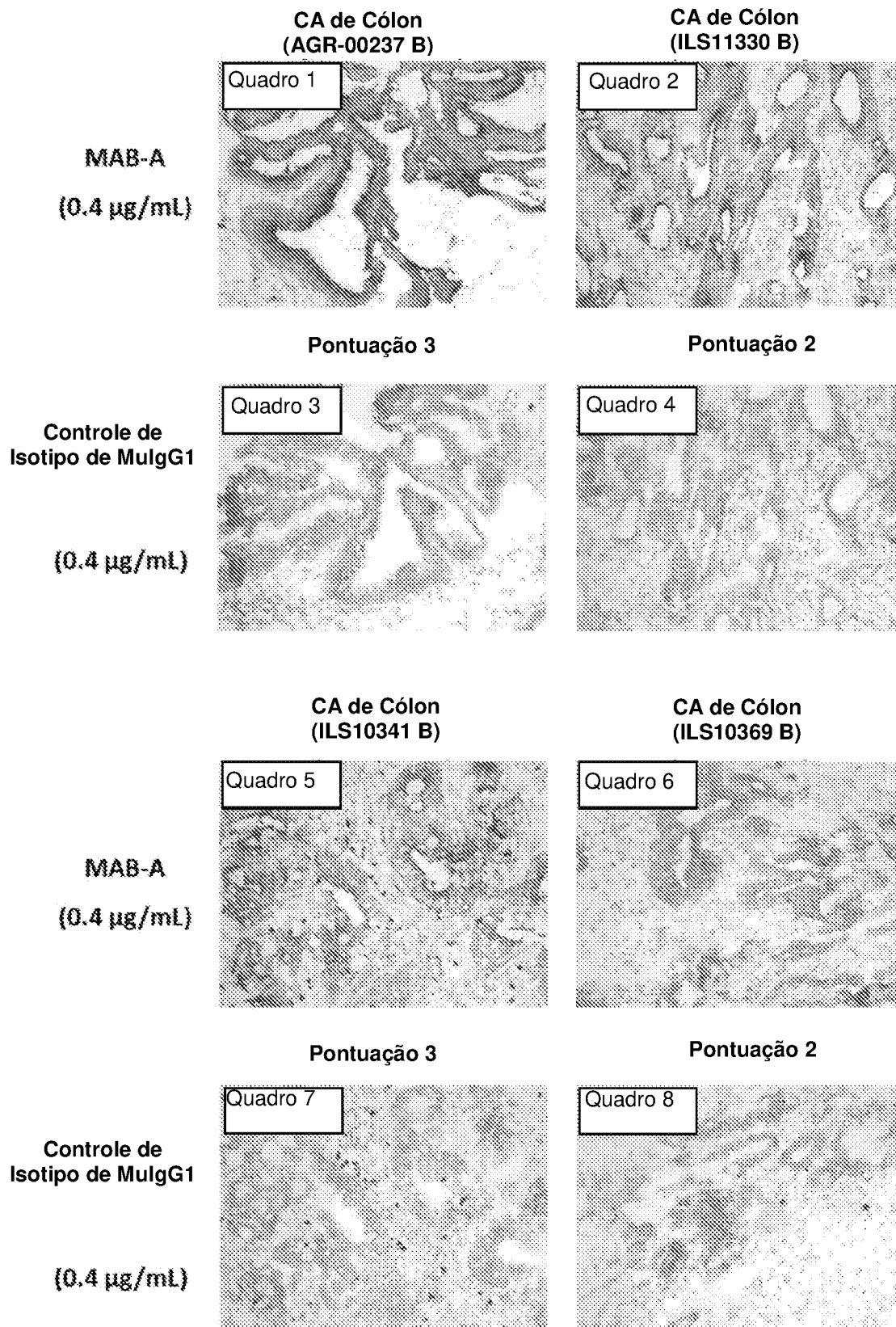


Figura 7A



**Figura 7B**



**Figura 7C**

293-FT

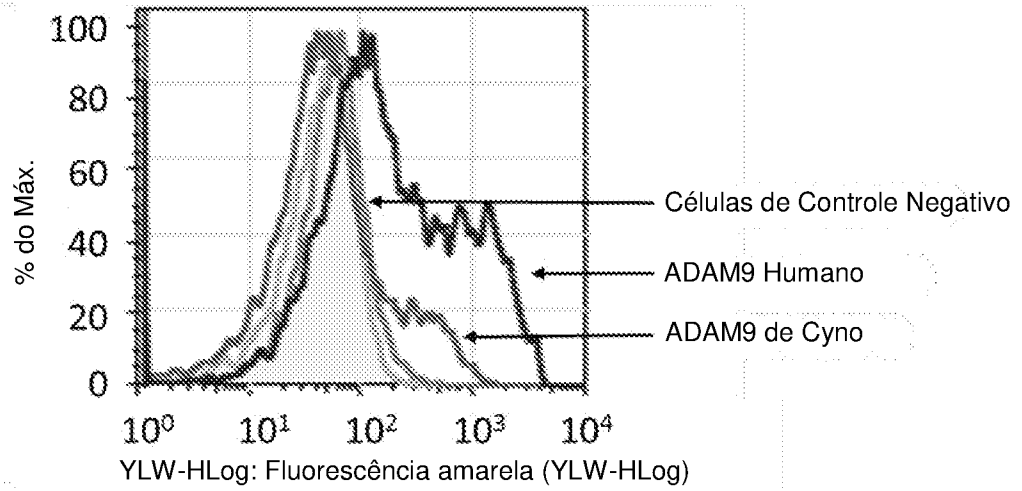


Figura 8A

CHO-K

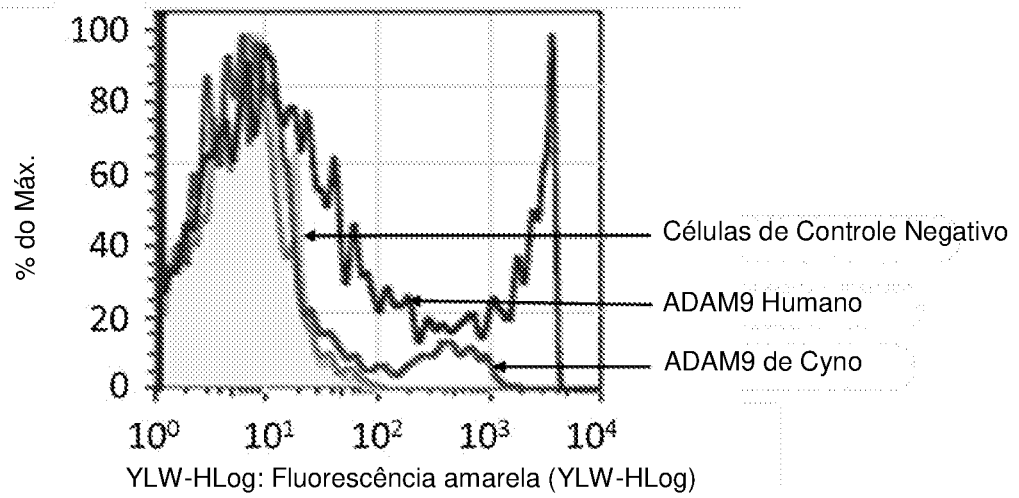


Figura 8b



		FR1	CDR1
VH de MAB-A Murino	SEQ ID NO: 7	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT	SYWMH
VH de hMAB-A(1)	SEQ ID NO: 16	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
VH de hMAB-A(2)	SEQ ID NO: 17	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
VH de hMAB-A(3)	SEQ ID NO: 18	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
VH de hMAB-A(4)	SEQ ID NO: 19	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	...I.
VH de hMAB-A(2B)	SEQ ID NO: 21	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
VH de hMAB-A(2C)	SEQ ID NO: 22	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
VH de hMAB-A(2D)	SEQ ID NO: 23	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
VH de hMAB-A(2I)	SEQ ID NO: 28	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
FR2	CDR2	FR3	
WVKQRPGQGLEWIG	ETIPINGHTNYNEKFKS	KATLTLDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAR	
..R.A..K...V.	.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
..R.A..K...V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
CDR3	FR4		
GGYYYYGSRDYFDY	WGQGTTLTVSS		
.....	.....V.....		
.....	.....V.....		
.....	.....V.....		
.....	.....V.....		
.....IGKGVL..	.....V.....		
.....PRFGWL..	.....V.....		
.....TGKGVL..	.....V.....		
.....PRQGFL..	.....V.....		

Figura 9A

		FR1	CDR1			
VL de MAB-A Murino	SEQ ID NO:11	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	KASQSVDYDGDSYMN			
VL de hMAB-A(1)	SEQ ID NO:54	...M...D.....E.....	.....			
VL de hMAB-A(2)	SEQ ID NO:55	...M...D.....E.....	.....S.....			
VL de hMAB-A(3)	SEQ ID NO:56	...M...D.....E.....	R.....S.....			
VL de hMAB-A(4)	SEQ ID NO:57	...M...D.....E.....	R.....S....L.			
		FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
WYQQIPGQPPKLLIY		AASDLES	GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	QQSHEDPFT	FGGGTKLEIK	
....K.....	.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....	.....	.....
....K.....	.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....	.....	.....
....K.....	.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....	.....	.....
....K.....	.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	...YST...	.....	.....

Figura 9B

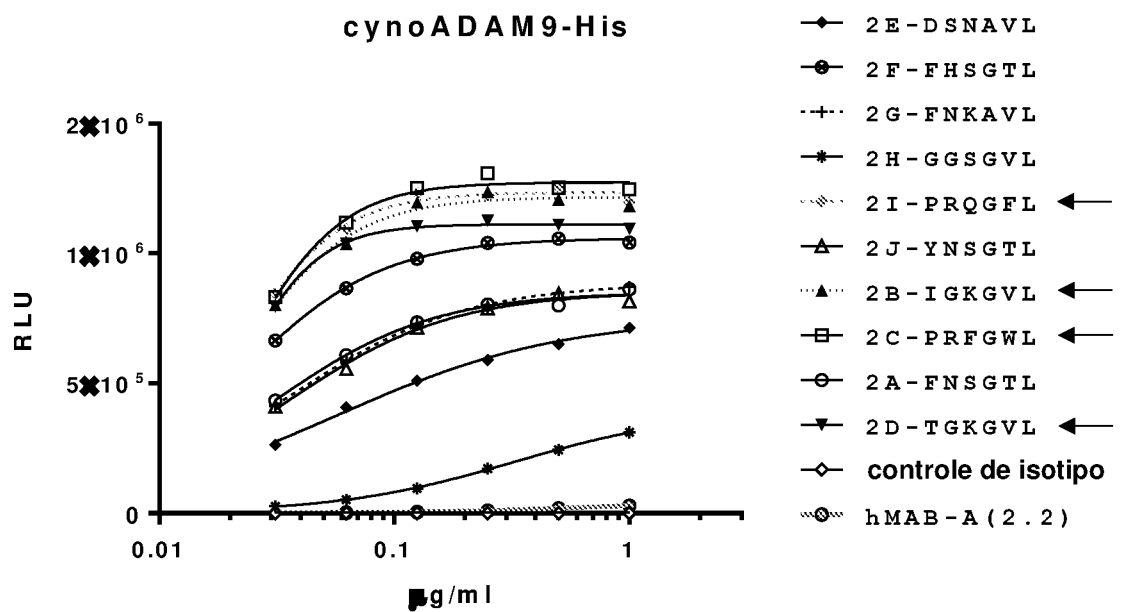


Figura 10A

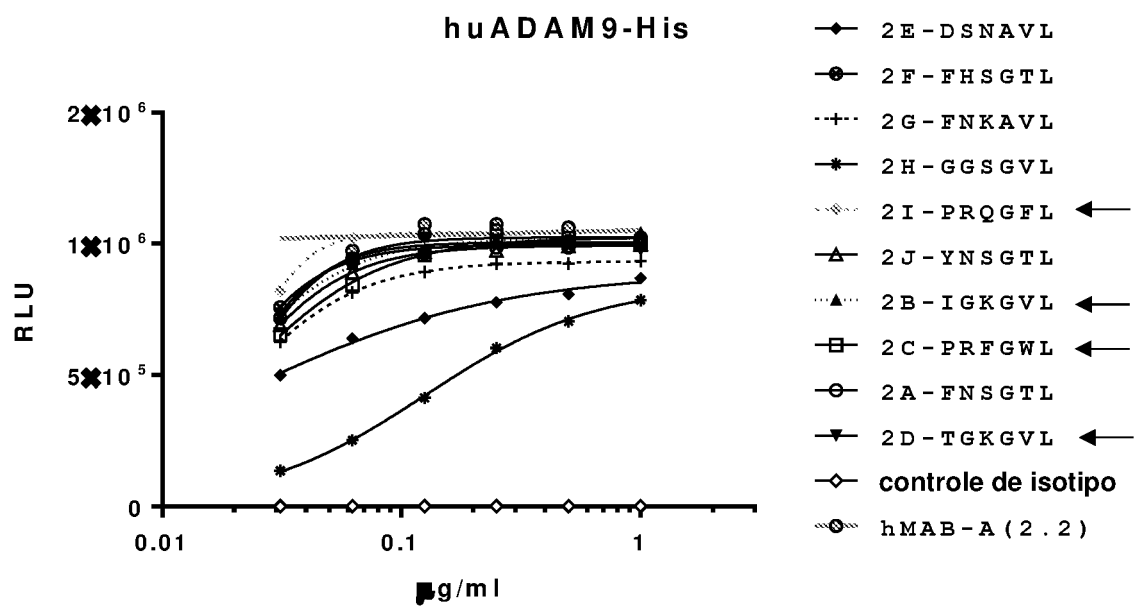


Figura 10B

RESUMO

MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ADAM9 E MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO ASSOCIADA OU CARACTERIZADA PELA EXPRESSÃO DE ADAM9 EM UM INDIVÍDUO

A presente invenção é direcionada a moléculas, como anticorpos monoespecíficos e moléculas de ligação bi, tri ou multiespecíficas, incluindo diacorpos, BiTEs, e anticorpos que sejam capazes de ligação de maneira específica a "Proteína contendo Domínio de Desintegrina e Metaloproteinase 9" ("ADAM9"). A invenção particularmente se refere a essas moléculas de ligação que são capazes de apresentar ligação de alta afinidade a ADAM9 humano e não humano. A invenção ainda se refere particularmente a essas moléculas que são, portanto, reativas de maneira cruzada a ADAM9 humano e a ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco *cynomolgus*). A invenção adicionalmente pertence a todas essas moléculas de ligação a ADAM9 que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado, de modo a apresentar imunogenicidade reduzida mediante a administração dessa molécula de ligação a ADAM9 a um indivíduo receptor. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9, e a métodos envolvendo o uso de quaisquer dessas moléculas de ligação a ADAM9 no tratamento de câncer e outras doenças e condições.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: IPI6447\_Listagem de Sequência\_IAF.txt
- Data de Geração do Código: 12/08/2019
- Hora de Geração do Código: 15:08:48
- Código de Controle:
  - Campo 1: 5E2F116548702CD7
  - Campo 2: 086B8429EF53F1EC