



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

(21) BR 112019010604-9 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 0 6 0 4 A 2 *

(22) Data do Depósito: 22/11/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 17/12/2019

(54) Título: PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DA MEMBRANA PRÓSTATA-ESPECÍFICO

(51) Int. Cl.: C07K 16/18; C07K 16/28; C07K 16/30; C07K 16/46.

(30) Prioridade Unionista: 23/11/2016 US 62/426,086.

(71) Depositante(es): HARPOON THERAPEUTICS, INC..

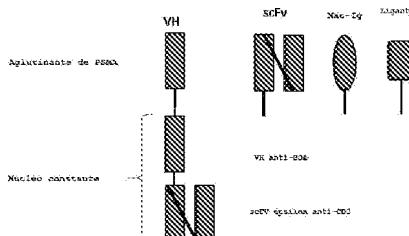
(72) Inventor(es): ROBERT DUBRIDGE; PUI SETO; PATRICK BAEUERLE; JEANMARIE GUENOT; HOLGER WESCHE; BRYAN D. LEMON; RICHARD J. AUSTIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2017063121 de 22/11/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/098354 de 31/05/2018

(85) Data da Fase Nacional: 23/05/2019

(57) Resumo: São aqui divulgadas proteínas de ligação a PSMA com afinidades de ligação melhoradas e perfis de agregação robustos. São também descritas proteínas de ligação multiespecíficas compreendendo uma proteína de ligação a PSMA de acordo com a presente descrição. As composições farmacêuticas compreendendo as proteínas de ligação aqui divulgadas e os métodos de utilização de tais formulações são ainda proporcionadas.



**PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DE MEMBRANA PRÓSTATA-
ESPECÍFICO**

REFERÊNCIA CRUZADA

[001] Esse pedido reivindica o benefício do Pedido U.S. Provisório N° 62/426.086 depositado em 23 de novembro de 2016, que é incorporado por referência nesse relatório descritivo em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é incorporada por meio deste por referência em sua totalidade. A referida cópia em ASCII, criada em 22 de novembro de 2017, é denominada 47517-707_601_SL.txt e tem 148.650 bytes de tamanho.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[003] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados nesse relatório descritivo são incorporados nesse relatório descritivo por referência na mesma extensão como cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência, e como se descritos em suas totalidades.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[004] A presente revelação fornece uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) que pode ser usada para o diagnóstico e tratamento de condições da próstata e outras indicações correlacionadas à expressão de PSMA.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] É fornecida nesse relatório descritivo, em uma

modalidade, uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), que compreende regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

(a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em RFMISX₁YX₂MH (ID. DE SEQ. N°: 1);

(b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG (ID. DE SEQ. N°: 2); e

(c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em DX₇YGY (ID. DE SEQ. N°: 3). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata compreende a seguinte fórmula: f₁-r₁-f₂-r₂-f₃-r₃-f₄, em que, r₁ é o ID. DE SEQ. N°: 1; r₂ é o ID. DE SEQ. N°: 2; e r₃ é o ID. DE SEQ. N°: 3; e em que f₁, f₂, f₃ e f₄ são resíduos estruturais (*framework*) selecionados de modo que a referida proteína seja pelo menos oitenta por cento idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, X₁ é prolina. Em algumas modalidades, X₂ é histidina. Em algumas modalidades, X₃ é ácido aspártico. Em algumas modalidades, X₄ é lisina. Em algumas modalidades, X₅ é glutamina. Em algumas modalidades, X₆ é tirosina. Em algumas modalidades, X₇ é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, X₁ é prolina. Em algumas modalidades, X₅ é glutamina. Em algumas modalidades, X₆ é tirosina. Em algumas modalidades, X₄ é lisina e X₇ é serina. Em algumas

modalidades, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é lisina e X₇ é serina. Em algumas modalidades, X₁ é prolina, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina. Em algumas modalidades, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₅ é glutamina e X₇ é serina. Em algumas modalidades, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₆ é tirosina e X₇ é serina. Em algumas modalidades, X₂ é histidina e X₇ é serina. Em algumas modalidades, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata ainda possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, r1 compreende o ID. DE SEQ. N°: 5, ID. DE SEQ. N°: 6, ou ID. DE SEQ. N°: 7. Em algumas modalidades, r2 compreende o ID. DE SEQ. N°: 8, ID. DE SEQ. N°: 9, ID. DE SEQ. N°: 10, ID. DE SEQ. N°: 11, ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 13, ou ID. DE SEQ. N°: 14. Em algumas modalidades, r3 compreende o ID. DE SEQ. N°: 15.

[006] Outra modalidade da invenção fornece uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende CDR1, CDR2 e CDR3, que compreende a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4, em que um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados das posições de aminoácido 31, 33, 50, 55, 56, 62 e 97 são substituídos. Em algumas

modalidades, a proteína de ligação comprehende uma ou mais substituições adicionais nas posições de aminoácido diferentes das posições 31, 33, 50, 55, 56, 62 e 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 31. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 33. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 50. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 55. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 56. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 62. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituição na posição 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituições nas posições de aminoácido 55 e 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituições nas posições de aminoácido 33 e 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação comprehende substituições nas posições de aminoácido 33, 50 e 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da

próstata possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende substituições nas posições de aminoácido 31, 33, 50 e 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende substituições nas posições de aminoácido 33, 50, 55 e 97. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende substituições nas posições de aminoácido 33, 50, 56 e 97. Em algumas modalidades, compreende substituições nas posições de aminoácido 33, 50, 62 e 97.

[007] Uma modalidade adicional fornece uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende a sequência como apresentada é o ID. DE SEQ. N°: 16. Uma modalidade fornece uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR2 compreende a sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17. Uma modalidade adicional fornece uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR3 compreende a sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18. Em uma modalidade, é fornecida uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende uma sequência que é pelo menos 80% idêntica à sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em uma modalidade, é fornecida uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 possui pelo menos 80% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 16, CDR2 possui pelo menos 85% de

identidade para o ID. DE SEQ. N°: 17, e CDR3 possui pelo menos 80% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 18.

[008] Outra modalidade fornece uma proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16, CDR2 compreende a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17, e CDR3 compreende a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata se liga a um ou a ambos do antígeno de membrana específico da próstata humano e antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus*. Em algumas modalidades, a proteína de ligação se liga um antígeno de membrana específico da próstata humano e antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* com afinidades de ligação comparáveis. Em algumas modalidades, a proteína de ligação se liga um antígeno de membrana específico da próstata humano com uma afinidade de ligação maior do que antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus*.

[009] Outra modalidade fornece um polinucleotídeo que codifica uma proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Uma modalidade adicional fornece um vetor que compreende o polinucleotídeo que codifica uma proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Em outra modalidade, é fornecida uma célula hospedeira que é transformada com o vetor. Em outra modalidade, é fornecida uma composição farmacêutica que compreende (i) uma proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação, o polinucleotídeo de acordo com a presente revelação, o vetor de acordo com a presente

revelação ou a célula hospedeira de acordo com a presente revelação, e (ii) um carreador farmaceuticamente aceitável. Outra modalidade fornece um processo para a produção de uma proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação, o referido processo compreendendo o cultivo de um hospedeiro transformado ou transfectado com um vetor que compreende uma sequência de ácidos nucléicos que codifica uma proteína de ligação à albumina-PSMA de acordo com a presente revelação sob condições que permitem a expressão da proteína de ligação ao PSMA e recuperação e purificação da proteína produzida da cultura. Em uma modalidade, é fornecido um método para o tratamento ou melhora de uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença enxerto-versus-hospedeiro ou uma doença hospedeiro-versus-enxerto, que compreende a administração da proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação, a um indivíduo que dela necessita. Em algumas modalidades, o indivíduo é humano. Em algumas modalidades, o método ainda compreende a administração de um agente em combinação com a proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação.

[010] Uma modalidade fornece uma proteína de ligação multiespecífica que compreende a proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Uma modalidade adicional fornece um anticorpo que compreende a proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Em uma modalidade, é fornecido um anticorpo multiespecífico, um anticorpo biespecífico, um sdAb, um domínio pesado variável, um

peptídeo ou um ligante, que compreende a proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Em uma modalidade, é fornecido um anticorpo que compreende a proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação, em que o referido anticorpo é um anticorpo de domínio único. Em algumas modalidades, o anticorpo de domínio único é derivado de uma região variável da cadeia pesada de IgG. Uma modalidade adicional fornece uma proteína de ligação multiespecífica ou anticorpo que compreende a proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Em uma modalidade, é fornecido um método para o tratamento ou melhora de uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença enxerto-versus-hospedeiro ou uma doença hospedeiro-versus-enxerto, que compreende a administração do anticorpo multiespecífico de acordo com a presente revelação, a um indivíduo que dela necessita. Em uma modalidade adicional, é fornecido um método para o tratamento ou melhora de uma condição da próstata, que compreende a administração do anticorpo multiespecífico de acordo com a presente revelação a um indivíduo que dela necessita. Outra modalidade fornece um método para o tratamento ou melhora de uma condição da próstata, que compreende a administração da proteína de ligação ao PSMA de acordo com qualquer uma das modalidades acima a um indivíduo que dela necessita. Uma modalidade adicional fornece um método para o tratamento ou melhora de uma condição da próstata, que compreende a administração da proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação, a um

indivíduo que dela necessita.

[011] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata comprehende qualquer combinação do seguinte: (i), em que X₁ é prolina; (ii), em que X₂ é histidina; (iii), em que X₃ é ácido aspártico; (iv) em que X₄ é lisina; (v), em que X₅ é glutamina; (vi), em que X₆ é tirosina; e (vii), em que X₇ é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata da modalidade acima possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a ligação ao antígeno de membrana específico da próstata comprehende qualquer combinação do seguinte: (i), em que X₁ é prolina; em que X₅ é glutamina; (ii), em que X₆ é tirosina; em que X₄ é lisina e X₇ é serina; (iii), em que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é lisina e X₇ é serina; (iv), em que X₁ é prolina, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina; (v), em que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₅ é glutamina e X₇ é serina; (vi), em que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é lisina e X₇ é serina; (vii), em que X₁ é prolina, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina; (viii), em que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₅ é glutamina e X₇ é serina; (ix), em que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₆ é tirosina e X₇ é serina; e (x), em que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina. Em alguns casos, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata da modalidade acima possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da

próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em alguns casos, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata da modalidade acima ainda possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata comprehende qualquer combinação do seguinte: (i) substituição na posição 31; (ii) substituição na posição 50; (iii) substituição na posição 55; substituição na posição 56; (iv) substituição na posição 62; (v) substituição na posição 97; (vi) substituições nas posições 55 e 97; (vii) substituições nas posições 33 e 97; (viii) substituições nas posições 33, 50 e 97; (ix) substituições nas posições 31, 33, 50 e 97; (x) substituições nas posições 33, 50, 55 e 97; (xi) substituições nas posições 33, 50, 56 e 97; e (xiii) substituições nas posições 33, 50, 62 e 97. Em alguns casos, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata da modalidade acima possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em alguns casos, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata da modalidade acima ainda possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

[012] Uma modalidade fornece um método para o tratamento

ou melhora de câncer de próstata, o método compreendendo a administração da proteína de ligação ao PSMA que compreende regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em RFMISX₁YX₂MH (ID. DE SEQ. N°: 1); (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em X₃INPAX₄X₅TDYAELEX₆VKG (ID. DE SEQ. N°: 2); e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em DX₇YGY (ID. DE SEQ. N°: 3), a um indivíduo que dela necessita.

[013] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um anticorpo de domínio único. Em algumas modalidades, o referido anticorpo de domínio único é parte de um anticorpo triespecífico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[014] As novas características da invenção são apresentadas com particularidade nas reivindicações em anexo. Uma melhor compreensão das características e vantagens da presente invenção será obtida por referência à descrição detalhada seguinte que apresenta modalidades ilustrativas, nas quais os princípios da invenção são utilizados, e os desenhos que a acompanham, dos quais:

[015] A **Figura 1** é uma representação esquemática de uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica direcionada ao PMSA exemplar, em que a proteína possui um elemento central constante que compreende um fragmento variável de cadeia única anti-CD3ε (scFv) e uma região variável da cadeia pesada anti-HSA; e um domínio de ligação ao PMSA que pode ser um VH, scFv, um aglutinante não-Ig ou ligante.

[016] As **Figuras 2A-B** comparam a habilidade de proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA exemplares (moléculas

TriTAC direcionadas ao PSMA) com afinidades diferentes por CD3 para induzir que células T matem células de câncer de próstata humano. A **Figura 2A** mostra a morte de moléculas TriTAC direcionadas ao PMSA diferentes no modelo de câncer de próstata LNCaP. **Figura 2B** mostra a morte de moléculas TriTAC direcionadas ao PMSA diferentes no modelo de câncer de próstata 22Rv1. **Figura 2C** mostra valores de EC50 para TriTAC direcionada ao PMSA em modelos de câncer de próstata LNCaP e 22Rv1.

[017] A **Figura 3** mostra a concentração sérica de TriTAC direcionada ao PSMA C236 em macacos *Cynomolgus* após administração i.v. (100 µg/kg) ao longo de três semanas.

[018] A **Figura 4** mostra a concentração sérica de moléculas TriTAC direcionadas ao PSMA com afinidades por CD3 diferentes em macacos *Cynomolgus* após administração i.v. (100 µg/kg) ao longo de três semanas.

[019] As **Figuras 5A-C** mostram a habilidade de moléculas TriTAC direcionadas ao PSMA com afinidades diferentes por PSMA para induzir que células T matem a célula de linhagem de câncer de próstata humano LNCaP. A **Figura 5A** mostra o experimento realizado na ausência de albumina sérica humana com uma BiTE direcionada ao PSMA como controle positivo. A **Figura 5B** mostra o experimento realizado na presença de albumina sérica humana com uma BiTE direcionada ao PSMA como controle positivo. A **Figura 5C** mostra valores de EC50 para TriTAC direcionada ao PMSA na presença ou ausência de HSA com uma BiTE direcionada ao PSMA como um controle positivo em modelos de câncer de próstata LNCaP.

[020] A **Figura 6** demonstra a habilidade de moléculas TriTAC direcionadas ao PSMA para inibir o crescimento tumoral

de células de câncer de próstata humano em um experimento de xenoenxerto em camundongo.

[021] As **Figuras 7A-D** ilustram a especificidade de moléculas TriTAC em ensaios de morte de células com linhagens de células-alvo que expressam ou não a proteína-alvo. A **Figura 7A** mostra a expressão de EGFR e PSMA em linhagens de células LNCaP, KMS12BM e OVCAR8. **Figura 7B** mostra a morte de células tumorais LNCaP por PSMA, EGFR, e TriTACs de controle negativo. A **Figura 7C** mostra a morte de células tumorais KMS12BM por PSMA, EGFR, e TriTACs de controle negativo. A **Figura 7D** mostra a morte de células OVCAR8 por de PSMA, EGFR e TriTACs de controle negativo.

[022] As **Figuras 8A-D** retratam o impacto da pré-incubação a 37°C e ciclos de congelamento/descongelamento sobre a atividade de TriTAC. A **Figura 8A** mostra a atividade de PSMA TriTAC C235 após pré-incubação a 37°C ou ciclos de congelamento/descongelamento. **Figura 8B** mostra a atividade de PSMA TriTAC C359 após pré-incubação a 37°C ou ciclos de congelamento/descongelamento. **Figura 8C** mostra a atividade de PSMA TriTAC C360 após pré-incubação a 37°C ou ciclos de congelamento/descongelamento. **Figura 8D** mostra a atividade de PSMA TriTAC C361 após pré-incubação a 37°C ou ciclos de congelamento/descongelamento.

[023] As **Figuras 9A-B** retratam a atividade de uma molécula TriTAC direcionada ao PSMA dessa revelação na morte por célula T redirecionada em ensaios de citotoxicidade celular célula T-dependente (TDCC). A **Figura 9A** mostra o impacto da molécula TriTAC direcionada ao PSMA no redirecionamento de células mononucleares (PBMCs) do sangue periférico de *Cynomolgus*, de doador de macaco *Cynomolgus*

G322, na morte de células LNCaP. A **Figura 9B** mostra o impacto da molécula TriTAC direcionada ao PSMA no redirecionamento de PBMCs de *Cynomolgus*, de doador de macaco *Cynomolgus* D173, para matar células MDAPCa2b.

[024] A **Figura 10** retrata o impacto de uma molécula TriTAC direcionada ao PSMA dessa revelação sobre a expressão de marcadores de ativação de célula T CD25 e CD69.

[025] A **Figura 11** retrata a habilidade de uma molécula TriTAC direcionada ao PSMA dessa revelação para estimular a proliferação de células T na presença de células-alvo que expressam PSMA.

[026] A **Figura 12** retrata a morte por célula T redirecionada em células LnCaP pela molécula TriTAC direcionada ao PSMA PSMA Z2 TriTAC (ID. DE SEQ. N°: 156).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[027] Embora modalidades preferidas da presente invenção tenham sido mostradas e descritas nesse relatório descritivo, será óbvio para aqueles habilitados na técnica que essas modalidades são fornecidas apenas como exemplo. Diversas variações, alterações e substituições ocorrerão àqueles habilitados na técnica sem se afastar da invenção. Deve ser subentendido que várias alternativas às modalidades da invenção descritas nesse relatório descritivo podem ser empregadas na prática da invenção. Deseja-se que as reivindicações seguintes definam o escopo da invenção e que métodos e estruturas dentro do escopo dessas reivindicações e seus equivalentes sejam por elas englobados.

Algumas definições

[028] A terminologia usada nesse relatório descritivo tem o objetivo de descrever apenas casos particulares e não visa

ser limitante. Como usadas nesse relatório descritivo, as formas no singular "um", "o", "uma" e "a" visam incluir também as formas no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Além disso, na medida em que os termos "incluindo", "inclui", "que possui", "possui", "com", ou variantes destes são usados na descrição detalhada e/ou nas reivindicações, esses termos visam ser inclusivos de uma forma similar ao termo "que compreende".

[029] O termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de uma faixa de erro aceitável para o valor particular, como determinado por aqueles habilitados na técnica, o que dependerá, em parte de como o valor é medido ou determinado, por exemplo, das limitações do sistema de medição. Por exemplo, "cerca de" pode significar dentro de 1 ou mais de um 1 desvio-padrão, pela prática no certo valor. Quando valores particulares são descritos no pedido e nas reivindicações, salvo indicação em contrário, o termo "cerca de" deve ser presumido como significando uma faixa de erro aceitável para o valor particular.

[030] Os termos "indivíduo", "paciente" ou "indivíduo" são usados de forma intercambiável. Nenhum dos termos exige ou é limitado à situação caracterizada pela supervisão (por exemplo, constante ou intermitente) de um profissional de saúde (por exemplo, um médico, uma enfermeira registrada, uma auxiliar de enfermagem, um médico assistente, um servente de hospital ou o funcionário de uma casa de repouso).

[031] O termo "*Framework*" ou resíduos (ou regiões) "FR" se referem aos resíduos do domínio variável diferentes dos resíduos da CDR ou da região hipervariável, como definidos nesse relatório descritivo. Uma "*framework* de consenso

humana" é uma *framework* que representa os resíduo de aminoácido que ocorrem mais comumente em uma seleção de sequências *framework* da VL ou VH de imunoglobulina humana.

[032] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "região variável" ou "domínio variável" se refere ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem amplamente em sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada antícorpo particular por seu antígeno particular. No entanto, a variabilidade não é distribuída igualmente por todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos denominados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis tanto nos domínios variáveis da cadeia leve quanto da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são denominadas a *framework* (FR). Cada um dos domínios variáveis de cadeias pesadas e leves nativas compreende quatro regiões FR, que adotam em grande parte uma configuração de lâmina- β , conectadas por três CDRs, que formam alças que conectam e, em alguns casos, formam parte da estrutura de lâmina- β . As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas nas proximidades pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação ao antígeno de anticorpos (veja Kabat e cols., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, "National Institute of Health", Bethesda, Md. (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um antícorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, por exemplo, participação do antícorpo em toxicidade celular antícorpo-dependente. Os termos "numeração de resíduo do domínio

variável como em Kabat" ou "numeração da posição de aminoácido como em Kabat", e variações destes, se referem ao sistema de numeração usado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat e cols., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5^a Edição, "Public Health Service", "National Institutes of Health", Bethesda, Md. (1991). Usando esse sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais que correspondem a um encurtamento de, ou inserção em, uma FR ou CDR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir um único inserto de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b e 82c etc. de acordo com Kabat) após o resíduo 82 da FR da cadeia pesada. A numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para certo anticorpo por alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada por Kabat "padrão". Não se deseja que as CDRs da presente revelação correspondam necessariamente à convenção de numeração de Kabat.

[033] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "percentual (%) de identidade de sequência de aminoácidos", com relação a uma sequência, é definido como a percentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência específica, após alinhamento das sequências e introdução de lacunas (*gaps*), se necessário, para obter a identidade de sequência percentual máxima, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de

sequência. O alinhamento para fins de determinação da identidade percentual de sequência de aminoácidos pode ser obtido de várias formas que fazem parte dos conhecimentos na técnica, por exemplo, usando softwares de computador disponíveis publicamente como, por exemplo, EMBOSS MATCHER, EMBOSS WATER, EMBOSS STRETCHER, EMBOSS NEEDLE, EMBOSS LALIGN, BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR) software. Aqueles habilitados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medição de alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para obter alinhamento máximo ao longo do comprimento total das sequências que estão sendo comparadas.

[034] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "meia-vida de eliminação" é usado em seu sentido comum, como é descrito em "Goodman and Gillman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics" 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman e Alfred Gilman, eds., 6^a Edição, 1980). Resumidamente, o termo visa englobar uma medida quantitativa da evolução temporal da eliminação de fármaco. A eliminação da maioria dos fármacos é exponencial (ou seja, acompanha a cinética de primeira ordem), na medida em que as concentrações de fármacos normalmente não se aproximam daquelas necessárias para o processo de eliminação. A taxa de um processo exponencial pode ser expressa por sua constante de velocidade, k , que expressa a alteração fracionária por unidade de tempo, ou por sua meia-vida, $t_{1/2}$ o tempo necessário para 50% do término do processo. As unidades dessas duas constantes são tempo^{-1} e tempo, respectivamente. Uma constante de velocidade de primeira ordem e a meia-vida da reação estão relacionadas simplesmente

($k \times t_{1/2} = 0,693$) e podem ser intercambiadas de acordo. Como a cinética de eliminação de primeira ordem dita que uma fração constante de fármaco seja perdida por unidade de tempo, um gráfico do log da concentração de fármaco versus tempo é linear em todos os tempos após a fase de distribuição inicial (ou seja, após absorção e distribuição de fármaco estarem completas). A meia-vida para eliminação de fármaco pode ser determinada com precisão a partir de um gráfico desse tipo.

[035] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "afinidade de ligação" se refere à afinidade das proteínas descritas na revelação aos seus alvos de ligação, e é expressa numericamente usando valores da "Kd". Se duas ou mais proteínas são indicadas como tendo afinidades de ligação comparáveis para seus alvos de ligação, então os valores da Kd para ligação das respectivas proteínas para seus alvos de ligação estão dentro de ± 2 vezes entre elas. Se duas ou mais proteínas são indicadas como tendo afinidades de ligação comparáveis para um alvo de ligação único, então os valores da Kd para ligação das respectivas proteínas para o referido alvo de ligação único estão dentro de ± 2 vezes entre elas. Se uma proteína é indicada para se ligar a ou mais alvos com afinidades de ligação comparáveis, então os valores da Kd para ligação da referida proteína aos dois ou mais alvos estão dentro de ± 2 vezes entre elas. Em geral, um valor da Kd maior corresponde a uma ligação mais fraca. Em algumas modalidades, a "Kd" é medida por um ensaio de ligação a um antígeno radiomarcado (RIA) ou ensaios de ressonância de plásmon de superfície usando um aparelho BIAcore™-2000 ou BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Em certas

modalidades, uma "on-rate" ou "taxa de associação" ou "taxa de associação" ou "kon" e uma "off-rate" ou "taxa de dissociação" ou "taxa de dissociação" ou "koff" também são determinadas com a técnica de ressonância de plásmon de superfície usando um aparelho BIAcore™-2000 ou BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Em modalidades adicionais, a "Kd", "kon" e "koff" são medidas usando o OCTET® Systems (Pall Life Sciences). Em um método exemplar para medição da afinidade de ligação usando o OCTET® Systems, o ligante, por exemplo, PSMA humano ou de *Cynomolgus* biotinilado, é imobilizado na superfície da ponta do sensor capilar de estreptavidina de OCTET®, cujas pontas de estreptavidina são então ativadas de acordo com as instruções do fabricante usando cerca de 20-50 µg/ml de proteína PSMA humano ou de *Cynomolgus*. Uma solução de PBS/Caseína também é introduzida como um agente de bloqueio. Para medições da cinética de associação, as variantes da proteína de ligação ao PSMA são introduzidas em uma concentração que varia de cerca de 10 µg/ml até cerca de 1.000 µg/ml. A dissociação completa é observada em caso do controle negativo, tampão de ensaio sem as proteínas de ligação. Os parâmetros cinéticos das reações de ligação são então determinados usando uma ferramenta apropriada, por exemplo, o software ForteBio.

[036] São descritas nesse relatório descritivo proteínas de ligação ao PSMA, composições farmacêuticas, bem como ácidos nucléicos, vetores de expressão recombinante e células hospedeiras para a produção dessas proteínas de ligação ao PSMA. Também são fornecidos métodos de utilização das proteínas de ligação ao PSMA reveladas na prevenção e/ou tratamento de doenças, condições e distúrbios. As proteínas

de ligação ao PSMA são capazes de se ligar especificamente ao PSMA. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação ao PSMA incluem domínios adicionais como, por exemplo, um domínio de ligação ao CD3.

Antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) e seu papel em condições da próstata

[037] São contempladas nesse relatório descritivo proteínas de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata. O antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), também conhecido como glutamato carboxipeptidase II, dipeptidase N-acetil- α -ligada ácida I [NAALAdase (NLD) I], ou folato hidrolase, é uma glicoproteína transmembrana do tipo II de 750 resíduos que é altamente expressa em células de câncer de próstata e na neovasculatura de tumor sólido não prostático e expressa em níveis menores em outros tecidos, incluindo próstata saudável, rim, fígado, intestino delgado, glândula salivar, mucosa duodenal, túbulos renais proximais e cérebro. O PSMA é um membro de uma superfamília de exopeptidases zinco-dependentes, que incluem carboxipeptidases com um sítio ativo de zinco mononuclear (por exemplo, carboxipeptidase A) e carbóxi- e aminopeptidases com um sítio ativo de zinco binuclear [por exemplo, carboxipeptidase G2 (CPG2), peptidases T e V (PepT e PepV), aminopeptidase de *Streptomyces griseus* (Sgap) e aminopeptidase de *Aeromonas proteolytica* (AAP)]. Além, de uma região de homologia limitada com essas exopeptidases zinco-dependentes solúveis de domínio único (por exemplo, AAP) ou de domínio duplo (por exemplo, CPG2), toda a sequência de PSMA é homóloga a pelo menos quatro outras proteínas humanas: NLDL (expressa no íleo; 35% de

identidade), NLD2 (expressa no ovário, testículo e cérebro; 67% de identidade), receptor de transferrina (TfR) 1 (TfR1; expresso na maioria dos tipos de células; 26% de identidade), e TfR2 (expressa predominantemente no fígado; 28% de identidade).

[038] Foi demonstrado que a estrutura cristal de PSMA comprehende um dímero simétrico com cada cadeia polipeptídica que contém três domínios análogos aos três domínios de TfR1: um domínio de protease, um domínio apical e um domínio helicoidal. Uma grande cavidade (aproximadamente 1.100 Å²) na interface entre os três domínios inclui um sítio de zinco binuclear e resíduos predominantemente polares (66% de 70 resíduos). A observação de dois íons zinco e a conservação de muitos dos resíduos formadores da cavidade entre ortólogos e homólogos de PSMA identificam a cavidade como o provável sítio de ligação ao substrato.

[039] Tipicamente, a expressão de PSMA aumenta com progressão e metástase da doença da próstata. A expressão de PSMA está aumentada no câncer de próstata, especialmente em carcinomas pouco diferenciados, metastáticos e hormônio-refratários. PSMA também é expresso em células endoteliais de vasos capilares em áreas peritumorais e endotumorais de certas malignidades, incluindo carcinomas de célula renal e carcinomas do cólon, mas não em vasos sanguíneos de tecidos normais. Além disso, há relatos de que PSMA está relacionado com a angiogênese tumoral. Foi demonstrado que PSMA é expresso em células endoteliais da neovasculatura associada ao tumor em carcinomas do cólon, mama, bexiga, pâncreas, rim e melanoma.

[040] Além de seu papel como um marcador tumoral, PSMA

contém um sítio de zinco binuclear e é ativo como uma glutamato carboxipeptidase, catalisando a clivagem enzimática de glutamatos α - ou γ -ligados de peptídeos ou pequenas moléculas. Seus substratos incluem folatos poli- γ -glutamatados, que são nutrientes essenciais, e a forma poli- γ -glutamatada do fármaco anticâncer metotrexato, quando então a clivagem o torna menos eficaz. A atividade enzimática de PSMA pode ser explorada para o design de pró-fármacos, em que uma forma glutamatada inativa do fármaco é clivada seletivamente e, dessa forma, ativada somente em células que expressam PSMA. PSMA também cliva e inativa o neuropeptídeo abundante N-acetil-l-aspartil-l-glutamato (α -NAAG), que é um inibidor do receptor ionotrópico NMDA e um agonista do receptor de glutamato metabotrópico do tipo II subtipo 3. Uma quebra da regulação da neurotransmissão glutamatérgica por α -NAAG está implicada na esquizofrenia, distúrbios convulsivos, doença de Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica. Dessa forma, a inibição de PSMA potencialmente confere neuroproteção tanto por redução de glutamato quanto por aumento de α -NAAG. Por exemplo, foi demonstrado que o inibidor subnanomolar ácido 2-(fosfonometil)pentanodióico fornece neuroproteção em cultura de células e/ou modelos animais de isquemia, neuropatia diabética, uso abusivo de fármacos, dor crônica e esclerose lateral amiotrófica.

[041] O câncer de próstata é o tipo mais prevalente de câncer e uma das causas principais de morte por câncer nos homens americanos. O número de homens diagnosticados com câncer de próstata vem crescendo regularmente como resultado da população crescente de homens mais velhos, bem como por

uma consciência maior da doença levando ao seu diagnóstico mais precoce. O risco de tempo de vida para homens que desenvolvem câncer de próstata é cerca de 1 em 5 para caucasianos, 1 em 6 para afro-americanos. Grupos de alto risco são representados por aqueles com uma história familiar positiva de câncer de próstata ou afro-americanos. Ao longo da vida, mais de dois terços dos homens diagnosticados com câncer de próstata morrem da doença. Além disso, muitos pacientes que não sucumbem ao câncer de próstata exigem tratamento contínuo para melhorar os sintomas como, por exemplo, dor, sangramento e obstrução urinária. Dessa forma, o câncer de próstata também representa uma causa importante de sofrimento e gastos aumentados com atenção médica. Quando o câncer de próstata está localizado e a expectativa de vida do paciente é de 10 anos ou mais, a prostatectomia radical oferece a melhor chance para erradicação da doença. Historicamente, a desvantagem desse procedimento é que a maioria dos cânceres se espalhou além dos limites da operação no momento em que são detectados. Pacientes com tumores de alto grau, volumosos, têm menor probabilidade de serem tratados com sucesso pela prostatectomia radical. A radioterapia também tem sido amplamente usada como uma alternativa à prostatectomia radical. Os pacientes geralmente tratados por radioterapia são aqueles mais velhos e menos saudáveis e aqueles com tumores de grau maior, clinicamente mais avançados. Procedimentos particularmente preferidos são a terapia com feixe externo, que envolve radioterapia confocal, tridimensional, em que o campo de radiação é projetado para se adaptar ao volume de tecido tratado; radioterapia intersticial, na qual sementes de

compostos radioativos são implantadas usando orientação por ultra-som; e uma combinação de terapia com feixe externo e radioterapia intersticial. Para o tratamento de pacientes com doença localmente avançada, a terapia hormonal, antes ou depois de prostatectomia radical ou radioterapia, tem sido utilizada. A terapia hormonal é a forma principal de tratamento de homens com câncer de próstata disseminado. A orquidectomia reduz as concentrações séricas de testosterona, enquanto o tratamento com estrogênio é similarmente benéfico. O dietilestilbestrol de estrogênio é outra terapia hormonal útil que possui a desvantagem de causar toxicidade cardiovascular. Quando agonistas do hormônio de liberação de gonadotropina são administrados, as concentrações de testosterona são, por fim, reduzidas. Flutamida e outros agentes antiandrogênio não esteroidais bloqueiam a ligação da testosterona aos seus receptores intracelulares. Como resultado, ela bloqueia o efeito da testosterona, aumentando as concentrações séricas de testosterona e permitindo que os pacientes permaneçam potentes – um problema significante após prostatectomia radical e tratamentos por radiação. A quimioterapia citotóxica é amplamente ineficaz no tratamento de câncer de próstata. Sua toxicidade torna essa terapia inadequada para pacientes idosos. Além disso, o câncer de próstata é relativamente resistente aos agentes citotóxicos. Doença recidivada ou mais avançada também é tratada com terapia com antiandrogênio. Infelizmente, quase todos os tumores se tornam hormônio-resistentes e progridem rapidamente na ausência de qualquer terapia eficaz. Consequentemente, há uma necessidade por terapêuticas eficazes para o câncer de

próstata que não sejam excessivamente tóxicas para os tecidos normais de um paciente, e que sejam eficazes na eliminação seletiva de células de câncer de próstata. A presente revelação fornece, em certas modalidades, proteínas de ligação ao PSMA que são úteis no tratamento de câncer de próstata. Em modalidades adicionais, a revelação fornece um método de tratamento de câncer de próstata por imunoterapia usando as proteínas de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo.

[042] O câncer de próstata também é difícil diagnóstico, pois o método de avaliação do antígeno de membrana específico da próstata está associado com muitos falso-positivos. Consequentemente, em algumas modalidades, a presente revelação fornece um método aprimorado de detecção de câncer de próstata usando as proteínas de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo.

Proteínas de ligação ao PSMA

[043] São fornecidas nesse relatório descritivo, em certas modalidades, proteínas de ligação, por exemplo, anticorpos ou variantes de anticorpo anti-PSMA, que se ligam a uma proteína PSMA. A proteína PSMA, em algumas modalidades, é um multímero. O termo "multímero de proteína PSMA", como usado nesse relatório descritivo, é um complexo de proteína de pelo menos duas proteínas PSMA ou fragmentos destas. Os multímeros de proteína PSMA podem ser compostos por várias combinações de proteínas PSMA de comprimento total (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 20), PSMA solúvel recombinante (rsPSMA, por exemplo, aminoácidos 44-750 do ID. DE SEQ. N°: 20) e fragmentos dos citados anteriormente que formam multímeros (ou seja, que retêm o domínio de proteína

necessário para a formação de dímeros e/ou multímeros de ordem superior de PSMA). Em algumas modalidades, pelo menos uma das proteínas PSMA que formam o multímero é um polipeptídeo PSMA solúvel recombinante (rsPSMA). Em algumas modalidades, multímeros de proteína PSMA são dímeros, por exemplo, aqueles formados por proteína PSMA solúvel recombinante. Em algumas modalidades, rsPSMA é um homodímero. Sem se prender a uma teoria em particular, acredita-se que os multímeros de proteína PSMA citados nesse relatório descritivo assumam uma conformação nativa e preferivelmente tenham essa conformação. As proteínas PSMA, em certas modalidades, são ligadas de forma não covalente juntas para formar o multímero de proteína PSMA. Por exemplo, foi descoberto que a proteína PSMA se associa de forma não covalente para formar dímeros sob condições não desnaturantes. Os multímeros de proteína PSMA podem reter, e preferivelmente o fazem, as atividades de PSMA. A atividade de uma proteína PSMA é, em certas modalidades, uma atividade enzimática, por exemplo, atividade de folato hidrolase, atividade de NAALADase, atividade de dipeptidil peptidase IV e atividade de γ -glutamil hidrolase. Métodos para testagem da atividade de multímeros de PSMA são conhecidos no campo (por exemplo, revisado por O'Keefe e cols. em: "Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics", L.W. K. Chung, W.B. Isaacs e J.W. Simons (eds.) Humana Press, Totowa, N.J., 2000, páginas 307-326).

[044] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação da presente revelação que se ligam a uma proteína PSMA ou a um multímero de proteína PSMA modulam a atividade enzimática da proteína PSMA ou do multímero de proteína PSMA. Em algumas

modalidades, a proteína de ligação ao PSMA inibe pelo menos uma atividade enzimática, por exemplo, atividade de NAALADase, atividade de folato hidrolase, atividade de dipeptidil dipeptidase IV, atividade de γ -glutamil hidrolase, ou combinações destas. Em outras modalidades, a proteína de ligação ao PSMA aumenta pelo menos uma atividade enzimática, por exemplo, atividade de NAALADase, atividade de folato hidrolase, atividade de dipeptidil dipeptidase IV, atividade de γ -glutamil hidrolase, ou combinações destas.

[045] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "variantes de anticorpo" se refere às variantes e derivados de um anticorpo descrito nesse relatório descritivo. Em certas modalidades, variantes de sequência de aminoácidos dos anticorpos anti-PSMA descritos nesse relatório descritivo são contempladas. Por exemplo, em certas modalidades, variantes de sequência de aminoácidos de anticorpos anti-PSMA descritos nesse relatório descritivo são contempladas para aumentar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas dos anticorpos. Métodos exemplares para a preparação de variantes de aminoácidos incluem, sem limitação, a introdução de modificações apropriadas na sequência de nucleotídeos que codifica o anticorpo, ou por síntese de peptídeo. Essas modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo.

[046] Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição pode ser feita para chegar na construção final, desde que a construção final possua as características desejadas, por exemplo, ligação ao antígeno. Em certas

modalidades, são fornecidas variantes de anticorpo que possuem uma ou mais substituições de aminoácidos. Sítios de interesse para mutagênese por substituição incluem as CDRs e regiões *framework*. Exemplos dessas substituições são descritos abaixo. Substituições de aminoácidos podem ser introduzidas em um anticorpo de interesse e os produtos avaliados quanto à uma atividade desejada, por exemplo, ligação ao antígeno retida/aumentada, imunogenicidade diminuída ou citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC) ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC) aumentadas. Substituições de aminoácidos tanto conservativas quanto não conservativas são contempladas para a preparação das variantes de anticorpo.

[047] Em outro exemplo de uma substituição para criar um anticorpo anti-PSMA variante, um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental são substituídos. Em geral, variantes são então selecionadas com base em aprimoramentos em propriedades desejadas, comparadas com um anticorpo parental, por exemplo, afinidade aumentada, afinidade reduzida, imunogenicidade reduzida, dependência de ligação do pH aumentada. Por exemplo, um anticorpo variante com afinidade amadurecida pode ser gerado, por exemplo, usando técnicas de maturação da afinidade baseadas em apresentação em fago (*phage display*), tais como aquelas descritas nesse relatório descritivo e conhecidas no campo.

[048] Substituições podem ser feitas em regiões hipervariáveis (HVR) de um anticorpo parental anti-PSMA para gerar variantes e as variantes são então selecionadas com base na afinidade de ligação, ou seja, por maturação da afinidade. Em algumas modalidades de maturação da afinidade,

é introduzida diversidade nos genes variáveis escolhidos para maturação por qualquer um de diversos métodos (por exemplo, PCR *error-prone*, embaralhamento de cadeias ou mutagênese oligonucleotídeo-dirigida). Uma biblioteca secundária é então criada. A biblioteca é então avaliada para identificar quaisquer variantes de anticorpo com a afinidade desejada. Outro método para introduzir diversidade envolve abordagens HVR-dirigidas, nas quais vários resíduos da HVR (por exemplo, 4-6 resíduos de cada vez) são randomizados. Os resíduos da HVR envolvidos na ligação ao antígeno podem ser especificamente identificados, por exemplo, usando mutagênese por varredura de alanina ou modelagem. Substituições pode ser em um, dois, três, quatro, ou mais sítios dentro de uma sequência de anticorpo parental.

[049] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo é um anticorpo de domínio único, por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada (VH), um domínio variável (VHH) de sdAb derivado de camelídeo, peptídeo, ligante ou entidade de pequena molécula específica para PSMA. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao PSMA da proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo é qualquer domínio que se liga ao PSMA incluindo, sem limitação, domínios de um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado. Em certas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um anticorpo de domínio único. Em outras modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um peptídeo. Em modalidades adicionais, a proteína de ligação ao PSMA é uma pequena molécula.

[050] Geralmente, deve ser observado que o termo

"anticorpo de domínio único", como usado nesse relatório descritivo em seu sentido mais amplo, não está limitado a uma fonte biológica específica ou a um método de preparação específico. Por exemplo, em algumas modalidades, os anticorpos de domínio único da revelação são obtidos: (1) por isolamento do domínio VHH de um anticorpo de cadeia pesada de ocorrência natural; (2) por expressão de uma sequência de nucleotídeos que codifica um domínio VHH de ocorrência natural; (3) por "humanização" de um domínio VHH de ocorrência natural ou por expressão de um ácido nucléico que codifica esse domínio VHH humanizado; (4) por "camelização" de um domínio VH de ocorrência natural de qualquer espécie animal e, em particular, de uma espécie de mamífero, por exemplo, de um ser humano, ou por expressão de um ácido nucléico que codifica esse domínio VH camelizado; (5) por "camelização" de um "anticorpo de domínio" ou "Dab", ou por expressão de um ácido nucléico que codifica esse domínio VH camelizado; (6) por utilização de técnicas sintéticas ou semi-sintéticas para a preparação de proteínas, polipeptídeos ou outras sequências de aminoácidos; (7) por preparação de um ácido nucléico que codifica um anticorpo de domínio único usando técnicas para síntese de ácido nucléico conhecidas no campo, seguido por expressão do ácido nucléico assim obtido; e/ou (8) por qualquer combinação de um ou mais dos citados anteriormente.

[051] Em uma modalidade, um anticorpo de domínio único corresponde aos domínios VHH de anticorpos de cadeia pesada de ocorrência natural dirigidos contra PSMA. Como ainda descrito nesse relatório descritivo, essas sequências de VHH podem geralmente ser geradas ou obtidas imunizando-se

adequadamente uma espécie de camelídeo com PSMA (ou seja, de modo a evocar uma resposta imune e/ou anticorpos de cadeia pesada dirigidos contra PSMA), por obtenção de uma amostra biológica adequada do referido camelídeo (por exemplo, uma amostra de sangue, amostra de soro ou amostra de células B), e por geração de sequências de VHH dirigidas contra PSMA, a partir da referida amostra, usando qualquer técnica adequada conhecida no campo.

[052] Em outra modalidade, esses domínios VHH de ocorrência natural contra PSMA são obtidos a partir de bibliotecas naïve de sequências de VHH de camelídeo, por exemplo, por avaliação dessa biblioteca usando PSMA, ou pelo menos uma parte, fragmento, determinante antigênico ou epítopo deste, usando uma ou mais técnicas de avaliação conhecidas no campo. Essas bibliotecas e técnicas são descritas, por exemplo, em WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 e WO 03/035694. Alternativamente, bibliotecas sintéticas ou semi-sintéticas aprimoradas derivadas de bibliotecas de VHH naïve são usadas, por exemplo, bibliotecas de VHH obtidas de bibliotecas de VHH naïve por técnicas como, por exemplo, mutagênese aleatória e/ou embaralhamento de CDR como, por exemplo, descritas em WO 00/43507.

[053] Em uma modalidade adicional, ainda outra técnica para obtenção de sequências de VHH dirigidas contra PSMA, envolve a imunização adequada de um mamífero transgênico que é capaz de expressar anticorpos de cadeia pesada (ou seja, de modo a evocar uma resposta imune e/ou anticorpos de cadeia pesada dirigidos contra PSMA), obtenção de uma amostra biológica adequada do referido mamífero transgênico (por exemplo, uma amostra de sangue, amostra de soro ou amostra

de células B), e depois a geração de sequências de VHH dirigidas contra PSMA, a partir da referida amostra, usando qualquer técnica adequada conhecida no campo. Por exemplo, para essa finalidade, ratos ou camundongos que expressam o anticorpo de cadeia pesada e os métodos e técnicas adicionais descritos em WO 02/085945 e em WO 04/049794 podem ser usados.

[054] Em algumas modalidades, um anticorpo de PSMA de domínio único, como descrito nesse relatório descritivo, compreende anticorpo de domínio único com uma sequência de aminoácidos que corresponde à sequência de aminoácidos de um domínio VHH de ocorrência natural, mas que foi "humanizado", ou seja, por substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos da referida sequência de VHH de ocorrência natural (e em particular, nas sequências *framework*) por um ou mais dos resíduos de aminoácidos que ocorrem na posição (ou posições) correspondente em um domínio VH de um anticorpo convencional de 4 cadeias de um ser humano (por exemplo, como indicado acima). Isso pode ser realizado de uma forma conhecida no campo, o que será evidente para aqueles habilitados na técnica, por exemplo, com base na descrição adicional nesse relatório descritivo. Novamente, deve ser observado que esses anticorpos humanizados anti-PSMA de domínio único da revelação são obtidos por qualquer forma conhecida por si (ou seja, como indicado sob os pontos (1)-(8) acima) e, dessa forma, não são estritamente limitados aos polipeptídeos que foram obtidos usando um polipeptídeo que compreende um domínio VHH de ocorrência natural como um material de partida. Em algumas modalidades adicionais, um anticorpo de PSMA de domínio único, como descrito nesse relatório descritivo,

compreende um anticorpo de domínio único com uma sequência de aminoácidos que corresponde à sequência de aminoácidos de um domínio VH de ocorrência natural, mas que foi "camelizado", ou seja, por substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VH de ocorrência natural de um anticorpo convencional de 4 cadeias por um ou mais dos resíduos de aminoácidos que ocorrem na posição (ou posições) correspondente em um domínio VHH de uma anticorpo de cadeia pesada. Essas substituições por "camelização" são preferivelmente inseridas nas posições de aminoácido que formam e/ou estão presentes na interface VH-VL, e/ou nos denominados resíduos inconfundíveis de *Camelidae* (veja, por exemplo, WO 94/04678 e Davies e Riechmann (1994 e 1996)). De preferência, a sequência de VH que é usada como um material de partida ou ponto de partida para a geração ou design do domínio único camelizado é preferivelmente uma sequência de VH de um mamífero, mais preferivelmente a sequência de VH de um ser humano, por exemplo, uma sequência de VH3. No entanto, deve ser observado que esses anticorpos de domínio único anti-PSMA camelizados da revelação, em certas modalidades, são obtidos por qualquer forma adequada conhecida no campo (ou seja, como indicado sob os pontos (1)-(8) acima) e, dessa forma, não estão estritamente limitados aos polipeptídeos que foram obtidos usando um polipeptídeo que comprehende um domínio VH de ocorrência natural como um material de partida. Por exemplo, como adicionalmente descrito nesse relatório descriptivo, tanto a "humanização" quanto a "camelização" é realizada por fornecimento de uma sequência de nucleotídeos que codifica um domínio VHH ou domínio VH de ocorrência natural,

respectivamente, e depois alterando-se um ou mais códons na referida sequência de nucleotídeos de tal forma que a nova sequência de nucleotídeos codifique um anticorpo de domínio único "humanizado" ou "camelizado", respectivamente. Esse ácido nucléico pode então ser expresso, de modo a fornecer o anticorpo de domínio único anti-PSMA desejado da revelação. Alternativamente, em outras modalidades, com base na sequência de aminoácidos de um domínio VHH ou domínio VH de ocorrência natural, respectivamente, a sequência de aminoácidos do anticorpo de domínio único anti-PSMA humanizado ou camelizado desejado da revelação, respectivamente, são projetados e depois sintetizados de novo usando técnicas conhecidas para síntese de peptídeo. Em algumas modalidades, com base na sequência de aminoácidos ou sequência de nucleotídeos de um domínio VHH ou domínio VH de ocorrência natural, respectivamente, uma sequência de nucleotídeos que codifica o anticorpo de domínio único anti-PSMA humanizado ou camelizado desejado da revelação, respectivamente, é projetado e depois sintetizado de novo usando técnicas conhecidas para síntese de ácido nucléico, e depois o ácido nucléico assim obtido é expresso usando técnicas de expressão conhecidas, de modo a fornecer o anticorpo de domínio único anti-PSMA desejado da revelação.

[055] Outros métodos e técnicas adequados para obtenção do anticorpo de domínio único anti-PSMA da revelação e/ou ácidos nucléicos que codificam o mesmo, partindo de sequências de VH ou sequências de VHH de ocorrência natural, por exemplo, compreende a combinação de uma ou mais partes de uma ou mais sequências de VH de ocorrência natural (por exemplo, uma ou mais sequências *framework* (FR) e/ou

sequências da região determinante de complementaridade (CDR)), uma ou mais partes de uma ou mais sequências de VHH de ocorrência natural (por exemplo, uma ou mais sequências FR ou sequências de CDR), e/ou uma ou mais sequências sintéticas ou semi-sintéticas, de uma forma adequada, de modo a fornecer um anticorpo de domínio único anti-PSMA da revelação ou uma sequência de nucleotídeos ou ácido nucléico que codifica o mesmo.

[056] É contemplado que, em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é razoavelmente pequena e tem no máximo 25 kD, no máximo 20 kD, no máximo 15 kD ou no máximo 10 kD em algumas modalidades. Em certos casos, a proteína de ligação ao PSMA tem 5 kD ou menos, caso seja um peptídeo ou entidade de pequena molécula.

[057] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um anticorpo anti-PSMA específico que compreende regiões determinantes de complementaridade variáveis de cadeia pesada (CDR), CDR1, uma CDR2 variável de cadeia pesada, uma CDR3 variável de cadeia pesada, uma CDR1 variável de cadeia leve, uma CDR2 variável de cadeia leve e uma CDR3 variável de cadeia leve. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende qualquer domínio que se liga ao PSMA incluindo, sem limitação, domínios de um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, ou fragmentos de ligação ao antígeno como, por exemplo, anticorpos de domínio único (sdAb), fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂ e Fv, fragmentos compostos por uma ou mais CDRs, anticorpos de cadeia única (por exemplo, fragmentos Fv de cadeia única (scFv)), fragmentos Fv estabilizados com

dissulfeto (dsFv), anticorpos de heteroconjugado (por exemplo, anticorpos biespecíficos), fragmentos pFv, monômeros ou dímeros de cadeia pesada, monômeros ou dímeros de cadeia leve, e dímeros que consistem em uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Em alguns casos, é benéfico que o domínio de ligação ao PSMA seja derivado da mesma espécie na qual a proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo será por fim usada. Por exemplo, para uso em humanos, pode ser benéfico que o domínio de ligação ao PSMA da proteína de ligação ao PSMA compreenda resíduos humanos ou humanizados do domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é uma proteína de ligação anti-PSMA específica que comprehende uma CDR1 variável de cadeia pesada, uma CDR2 variável de cadeia pesada e uma CDR3 variável de cadeia pesada. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um anticorpo de domínio único anti-PSMA que comprehende uma CDR1 variável de cadeia pesada, uma CDR2 variável de cadeia pesada e uma CDR3 variável de cadeia pesada.

[058] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é um polipeptídeo que comprehende uma sequência de aminoácidos que é composta por quatro regiões/sequências *framework* (f1-f4) interrompidas por três regiões/sequências determinantes de complementaridade, como representadas pela fórmula: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, em que r1, r2 e r3 são regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, e f1, f2, f3 e f4 são resíduos estruturais. Os resíduos estruturais da proteína de ligação ao PSMA da presente revelação comprehendem, por exemplo, 75,

76, 77, 78, 79, 80, 81 resíduos de aminoácidos, e as regiões determinantes de complementaridade compreendem, por exemplo, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 resíduos de aminoácidos. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4 que compreende resíduos estruturais e CDR1, uma CDR2, e uma CDR3, em que (a) a CDR1 compreende a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 16, (b) a CDR2 compreende uma sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 17, e (c) a CDR3 compreende uma sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 18.

[059] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 19 que compreende resíduos estruturais e CDR1, uma CDR2, e uma CDR3, em que (a) a CDR1 compreende a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 16, (b) a CDR2 compreende uma sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 17, e (c) a CDR3 compreende uma sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 18.

[060] Em modalidades nas quais a CDR1 da proteína de ligação ao PSMA compreende a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 16, essas substituições incluem, por exemplo, prolina, histidina. Em modalidades nas quais a CDR2 da proteína de ligação ao PSMA compreende a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 17, essas substituições incluem, por exemplo, ácido aspártico, lisina, glutamina, tirosina.

[061] Em modalidades nas quais a CDR3 da proteína de ligação ao PSMA compreende a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18 ou uma variante que possui uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos no ID. DE SEQ. N°: 18, essas substituições incluem, por exemplo, serina.

[062] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende a seguinte fórmula: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, em que r1, r2 e r3 são regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, e f1, f2, f3 e f4 são resíduos estruturais, e em que r1 compreende o ID. DE SEQ. N°: 5, ID. DE SEQ. N°: 6, ou ID. DE SEQ. N°: 7, r2 compreende o ID. DE SEQ. N°: 8, ID. DE SEQ. N°: 9, ID. DE SEQ. N°: 10, ID. DE SEQ. N°: 11, ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 13, ou ID. DE SEQ. N°: 14, e r3 compreende o ID. DE SEQ. N°: 15. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é um anticorpo de domínio único que compreende a

seguinte fórmula: $f_1-r_1-f_2-r_2-f_3-r_3-f_4$, em que r_1 , r_2 e r_3 são regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, e f_1 , f_2 , f_3 e f_4 são resíduos estruturais, e em que r_1 é o ID. DE SEQ. N°: 5, ID. DE SEQ. N°: 6, ou ID. DE SEQ. N°: 7, r_2 é o ID. DE SEQ. N°: 8, ID. DE SEQ. N°: 9, ID. DE SEQ. N°: 10, ID. DE SEQ. N°: 11, ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 13, ou ID. DE SEQ. N°: 14, e r_3 é o ID. DE SEQ. N°: 15.

[063] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 17, e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 16, (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 16, (b) a sequência

de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 17, e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 17, e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA comprehende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 16, (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY).

[064] Em algumas modalidades, os resíduos de aminoácidos X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ e X₇ são selecionados independentemente de ácido glutâmico, prolina, serina, histidina, treonina, ácido aspártico, glicina, lisina, treonina, glutamina e tirosina. Em algumas modalidades, X₁ é prolina. Em algumas modalidades, X₂ é histidina. Em algumas modalidades, X₃ é ácido aspártico. Em algumas modalidades, X₄ é lisina. Em algumas modalidades, X₅ é glutamina. Em algumas modalidades,

X_6 é tirosina. Em algumas modalidades, X_7 é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X_1 é ácido glutâmico, X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_4 é glicina, X_5 é treonina, X_6 é serina e X_7 é serina.

[065] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY), em que X_1 é prolina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY), em que X_5 é glutamina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 (X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX₇YGY), em que X_6 é tirosina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a

sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 ($X_3INPAX_4X_5TDYAEVKG$), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX_7YGY), em que X_4 é lisina e X_7 é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 ($X_3INPAX_4X_5TDYAEVKG$), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX_7YGY), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_4 é lisina e X_7 é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 ($X_3INPAX_4X_5TDYAEVKG$), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX_7YGY), em que X_1 é prolina, X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 ($X_3INPAX_4X_5TDYAEVKG$), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX_7YGY), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_5 é glutamina e X_7 é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH),

(b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 ($X_3INPAX_4X_5TDYAX_6VKG$), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX_7YGY), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_6 é tirosina e X_7 é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que (a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 1 (RFMISX₁YX₂MH), (b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 2 ($X_3INPAX_4X_5TDYAX_6VKG$), e (c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em ID. DE SEQ. N°: 3 (DX_7YGY), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina.

[066] A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X_1 é ácido glutâmico, X_2 é histidina, X_3 é treonina, X_4 é glicina, X_5 é treonina, X_6 é serina e X_7 é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X_1 é ácido glutâmico, X_2 é histidina, X_3 é treonina, X_4 é glicina, X_5 é treonina, X_6 é serina e X_7 é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X_1 é ácido glutâmico, X_2 é serina, X_3 é treonina, X_4 é lisina, X_5 é treonina, X_6 é serina e X_7 é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X_1 é prolina, X_2 é serina, X_3 é treonina, X_4 é glicina, X_5 é treonina, X_6 é serina e X_7 é glicina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e

CDR3 nas quais X₁ é ácido glutâmico, X₂ é serina, X₃ é treonina, X₄ é glicina, X₅ é glutamina, X₆ é serina e X₇ é glicina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X₁ é ácido glutâmico, X₂ é serina, X₃ é treonina, X₄ é glicina, X₅ é treonina, X₆ é tirosina e X₇ é glicina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X₁ é ácido glutâmico, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é lisina, X₅ é treonina, X₆ é serina e X₇ é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X₁ é prolina, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é glicina, X₅ é treonina, X₆ é serina e X₇ é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X₁ é ácido glutâmico, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é glutamina, X₅ é treonina, X₆ é serina e X₇ é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X₁ é ácido glutâmico, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é glicina, X₅ é treonina, X₆ é tirosina e X₇ é serina. A proteína de ligação ao PSMA da presente revelação pode, em algumas modalidades, compreender sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 nas quais X₂ é histidina e X₇ é serina. Sequências *framework* exemplares são reveladas como ID. DE SEQ. N°: 165-168.

[067] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata compreende qualquer combinação do seguinte: (i), em que X₁ é prolina;

(ii), em que X_2 é histidina; (iii), em que X_3 é ácido aspártico; (iv) em que X_4 é lisina; (v), em que X_5 é glutamina; (vi), em que X_6 é tirosina; e (vii), em que X_7 é serina. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata da modalidade acima possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a ligação ao antígeno de membrana específico da próstata compreende qualquer combinação do seguinte: (i), em que X_1 é prolina; em que X_5 é glutamina; (ii), em que X_6 é tirosina; em que X_4 é lisina e X_7 é serina; (iii), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_4 é lisina e X_7 é serina; (iv), em que X_1 é prolina, X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina; (v), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_5 é glutamina e X_7 é serina; (vi), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_4 é lisina e X_7 é serina; (vii), em que X_1 é prolina, X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina; (viii), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_5 é glutamina e X_7 é serina; (ix), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_6 é tirosina e X_7 é serina; e (x), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina.

[068] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4 em que uma ou mais posições de aminoácido são substituídas. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições de aminoácido 19, 86, 87 e 106 do ID.

DE SEQ. N°: 4 são substituídas. Substituições exemplares nas posições de aminoácido 19, 86, 87 e 106 incluem, sem limitação, T19R, K86R, P87A e Q106L. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições de aminoácido 31, 33, 50, 55, 56, 62 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são substituídas. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 31 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como E31P. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 33 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como S33H. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 50 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como T50D. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 55 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como G55K. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 56 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como T56Q. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 62 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como S62Y. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como G97S. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 33 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como S33H. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 31 é combinada com substituições nas posições 50 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 31, 50 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como E31P, T50D e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições na posição 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como S33H e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50 e 97. Em algumas modalidades, as posições de

aminoácido 33, 50 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50, 55 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33, 50, 55 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D, G55K e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 31, 50 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 31, 33, 50 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como E31P, S33H, T50D e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50, 56 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33, 50, 56 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D, T56Q e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50, 62 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33, 50, 62 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D, S62Y e G97S.

[069] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 19. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 19, em que uma ou mais posições de aminoácido são substituídas. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições de aminoácido 31, 33, 50, 55, 56, 62 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são substituídas. Em algumas

modalidades, a posição de aminoácido 31 do ID. DE SEQ. N°: 4 é substituída como E31P. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 33 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como S33H. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 50 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como T50D. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 55 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como G55K. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 56 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como T56Q. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 62 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como S62Y. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como G97S. Em algumas modalidades, a posição de aminoácido 33 do ID. DE SEQ. N°: 19 é substituída como S33H. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 19 na posição 31 é combinada com substituições nas posições 50 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 31, 50 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são, respectivamente, substituídas como E31P, T50D e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 19 na posição 33 é combinada com substituições na posição 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são, respectivamente, substituídas como S33H e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 19 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33, 50 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 19 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50, 55 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33,

50, 55 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D, G55K e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 19 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 31, 50 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 31, 33, 50 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são, respectivamente, substituídas como E31P, S33H, T50D e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 19 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50, 56 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33, 50, 56 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 19 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D, T56Q e G97S. Em algumas modalidades, a substituição do ID. DE SEQ. N°: 4 na posição 33 é combinada com substituições nas posições 50, 62 e 97. Em algumas modalidades, as posições de aminoácido 33, 50, 62 e 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 são, respectivamente, substituídas como S33H, T50D, S62Y e G97S.

[070] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata compreende qualquer combinação do seguinte: (i) substituição na posição 31; (ii) substituição na posição 50; (iii) substituição na posição 55; substituição na posição 56; (iv) substituição na posição 62; (v) substituição na posição 97; (vi) substituições nas posições 55 e 97; (vii) substituições nas posições 33 e 97; (viii) substituições nas posições 33, 50 e 97; (ix) substituições nas posições 31, 33, 50 e 97; (x) substituições nas posições 33, 50, 55 e 97; (xi) substituições nas posições 33, 50, 56 e 97; e (xiii) substituições nas posições 33, 50, 62 e 97.

[071] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao

PSMA é reage de forma cruzada com PSMA humano e de *Cynomolgus*. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é específica para PSMA humano. Em várias modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é pelo menos cerca de 75%, cerca de 76%, cerca de 77%, cerca de 78%, cerca de 79%, cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

[072] Em várias modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é pelo menos cerca de 75%, cerca de 76%, cerca de 77%, cerca de 78%, cerca de 79%, cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 19.

[073] Em várias modalidades, uma região determinante de complementaridade da proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é pelo menos cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16.

[074] Em várias modalidades, uma região determinante de complementaridade da proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é pelo menos cerca de 75%, cerca de 76%, cerca de 77%, cerca de 78%, cerca de 79%, cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17.

[075] Em várias modalidades, uma região determinante de complementaridade da proteína de ligação ao PSMA da presente revelação é pelo menos cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18.

Humanização e maturação da afinidade

[076] No design de proteínas de ligação para aplicações terapêuticas, é desejável criar proteínas que, por exemplo, modulem uma atividade funcional de um alvo, e/ou proteínas de ligação aprimoradas como, por exemplo, proteínas de ligação com especificidade e/ou afinidade maior e/ou proteínas de ligação que sejam mais biodisponíveis, ou estáveis ou solúveis, em particular, em ambientes celulares ou teciduais.

[077] As proteínas de ligação ao PSMA descritas na presente revelação exibem as afinidades de ligação aumentadas para o domínio de ligação-alvo, que é PSMA. A

presente revelação identifica substituições de aminoácidos nas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) das proteínas de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo que levam a uma afinidade de ligação maior para um ou ambos de PSMA humano e de cíno. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um anticorpo. Em certas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA é um anticorpo humanizado. Geralmente, um anticorpo humanizado compreende um ou mais domínios variáveis nos quais CDRs ou porções de CDRs são derivadas de um anticorpo não humano, e regiões framework ou porções de regiões framework são derivadas de sequências de anticorpo humano. Opcionalmente, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos uma porção de uma região constante humana. Em algumas modalidades, resíduos estruturais selecionados são substituídos com resíduos correspondentes de um anticorpo não humano (por exemplo, o anticorpo do qual as CDRs são derivadas), por exemplo, para restaurar ou aumentar a especificidade, afinidade, ou dependência de pH do anticorpo. Regiões framework humanas que podem ser usadas para humanização incluem, sem limitação, regiões framework selecionadas usando um método de melhor ajuste (por exemplo, Sims e cols. *J. Immunol.* 151: 2.296, 1993); regiões framework derivadas da sequência de consenso de anticorpos humanos de um subgrupo particular de regiões variáveis de cadeia leve ou pesada (por exemplo, Carter e cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4.285, 1992; e Presta e cols., *J. Immunol.*, 151: 2.623, 1993); regiões framework maduras humanas (somaticamente mutadas) ou regiões framework da linhagem germinativa humana (por exemplo, Almagro e Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1.619-1.633, 2008); e regiões

framework derivadas da avaliação de bibliotecas *framework* (por exemplo, Baca e cols., *J. Biol. Chem.* 272: 10.678-10.684, 1997; e Rosok e cols., *J. Biol. Chem.* 271: 22.611-22.618, 1996)). Dessa forma, em um aspecto, a proteína de ligação ao PSMA comprehende um anticorpo humanizado ou humano ou um fragmento de anticorpo. Em uma modalidade, a proteína de ligação anti-PSMA humanizada ou humana comprehende uma ou mais (por exemplo, todas as três) da região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LC CDR1), região determinante de complementaridade de cadeia leve 2 (LC CDR2) e região determinante de complementaridade de cadeia leve 3 (LC CDR3) de um domínio de ligação anti-PSMA humanizado ou humano descrito nesse relatório descritivo, e/ou uma ou mais (por exemplo, todas as três) da região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HC CDR1), região determinante de complementaridade de cadeia pesada 2 (HC CDR2) e região determinante de complementaridade de cadeia pesada 3 (HC CDR3) de um domínio de ligação anti-PSMA humanizado ou humano descrito nesse relatório descritivo, por exemplo, um domínio de ligação anti-PSMA humanizado ou humano que comprehende uma ou mais, por exemplo, todas as três, LC CDRs e uma ou mais, por exemplo, todas as três, HC CDRs. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-PSMA humanizado ou humano comprehende uma região variável da cadeia leve humanizada ou humana específica para PSMA, em que a região variável da cadeia leve específica para PSMA comprehende CDRs de cadeia leve humanas ou não humanas em uma região *framework* de cadeia leve humana. Em certos casos, a região *framework* de cadeia leve é uma *framework* de cadeia leve λ (lambda). Em outros casos, a região *framework* de

cadeia leve é uma *framework* de cadeia leve κ (kappa). Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-PSMA humanizado ou humano compreende uma região variável da cadeia pesada humanizada ou humana específica para PSMA, em que a região variável da cadeia pesada específica para PSMA compreende CDRs de cadeia pesada humanas ou não humanas em uma região *framework* de cadeia pesada humana. Em certos casos, as regiões determinantes complementares da cadeia pesada e/ou da cadeia leve são derivadas de anticorpos anti-PSMA conhecidos como, por exemplo, 7E11, EPR6253, 107.1A4, GCP-05, EP3253, BV9, SP29, anticorpo PSMA humano/FOLH1/NAALADase I.

[078] As proteínas de ligação ao PSMA da presente revelação são, em algumas modalidades, de afinidade amadurecida para aumentar sua afinidade de ligação para o domínio de ligação-alvo. Quando se deseja aumentar a afinidade das proteínas de ligação ao PSMA da revelação, por exemplo, anticorpos anti-PSMA que contêm uma ou mais das CDRs mencionada acima, esses anticorpos com afinidade aumentada podem ser obtidos por diversos protocolos de maturação da afinidade incluindo, sem limitação, manutenção das CDRs, embaralhamento de cadeias, uso de cepas de mutação de *E. coli*, embaralhamento de DNA, apresentação em fago e sexual. Os métodos exemplares de maturação da afinidade acima são discutidos por Vaughan e cols. (*Nature Biotechnology*, 16, 535–539, 1998). Dessa forma, além das variantes da proteína de ligação ao PSMA discutidas nas seções precedentes, a revelação fornece variantes de sequência adicionais que aumentam a afinidade da proteína de ligação para seu alvo, ou seja, PSMA. Em certas modalidades, essas

variantes de sequência compreendem uma ou mais substituições semiconservativas ou conservativas dentro das sequências da proteína de ligação ao PSMA e essas substituições preferivelmente não afetam significantemente a atividade desejada da proteína de ligação. Substituições podem ser de ocorrência natural ou podem ser introduzidas, por exemplo, usando mutagênese (por exemplo, Hutchinson e cols., 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 6.551). Por exemplo, os aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina podem frequentemente ser substituídos uns pelos outros (aminoácidos que possuem cadeias laterais alifáticas). Dessas possíveis substituições, tipicamente glicina e alanina são usadas para substituição entre elas, na medida em que têm cadeias laterais relativamente curtas, e valina, leucina e isoleucina são usadas para substituição entre elas, na medida em que possuem cadeias laterais alifáticas maiores que são hidrofóbicas. Outros aminoácidos que podem ser frequentemente substituídos entre eles incluem, sem limitação: fenilalanina, tirosina e triptofano (aminoácidos que possuem cadeias laterais aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que possuem cadeias laterais básicas); aspartato e glutamato (aminoácidos que possuem cadeias laterais ácidas); asparagina e glutamina (aminoácidos que possuem cadeias laterais de amida); e cisteína e metionina (aminoácidos que possuem cadeias laterais que contêm enxofre).

[079] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação ao PSMA são isoladas por avaliação de bibliotecas combinatórias, por exemplo, por geração de bibliotecas de apresentação em fago e avaliação dessas bibliotecas para anticorpos que

possuem as características de ligação desejadas. Além disso, a afinidade de ligação da proteína de ligação ao PSMA para seu alvo de ligação pode ser selecionada de modo a visar uma meia-vida de eliminação específica em uma proteína de ligação à albumina-PSMA particular. Dessa forma, em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma afinidade de ligação elevada para seu alvo de ligação. Em outras modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma afinidade de ligação média para seu alvo de ligação. Ainda em outras modalidades, a proteína de ligação ao PSMA possui uma afinidade de ligação baixa ou marginal para seu alvo de ligação. Afinidades de ligação exemplares incluem Kd de 10 nM ou menos (alta), entre 10 nM e 100 nM (média) e mais do que 100 nM (baixa). A afinidade para se ligar à PSMA pode ser determinada, por exemplo, pela habilidade da própria proteína de ligação ou seu domínio de ligação ao PSMA para se ligar ao PSMA revestido em uma placa de ensaio; exibido na superfície de uma célula microbiana; em solução; etc. A atividade de ligação da proteína da presente revelação ao PSMA também pode ser testada por imobilização do ligante (por exemplo, PSMA) ou da referida própria proteína de ligação ou seu domínio de ligação ao PSMA, a um glóbulo, substrato, célula etc. Em algumas modalidades, a ligação entre a própria proteína de ligação ao PSMA, ou seu domínio de ligação ao PSMA, e um ligante-alvo (por exemplo, PSMA) é determinada, por exemplo, por um ensaio de cinética de ligação. O ensaio de cinética de ligação, em certas modalidades, é realizado usando um sistema OCTET®. Nessas modalidades, uma primeira etapa compreende a imobilização de um ligante (por exemplo, PSMA biotinilado) sobre a superfície

de um biossensor (por exemplo, um biossensor de estreptavidina) em uma densidade de carga ótima, seguida por uma lavagem com um tampão de ensaio para remover ligantes não ligados, que é seguida por associação do analito, ou seja, a própria proteína de ligação ao PSMA ou seu domínio de ligação ao PSMA com o ligante, que é seguida por exposição do biossensor a um tampão que não contém o analito resultando, dessa forma, em dissociação da própria proteína de ligação ao PSMA ou de seu domínio de ligação ao PSMA do ligante. Agentes de bloqueio adequados, por exemplo, BSA, Caseína, Tween-20, PEG, gelatina, são usados para bloquear os sítios de ligação não específicos no biossensor. Os dados da cinética de ligação são subsequentemente analisados usando um software apropriado (por exemplo, software Octet de ForteBio) para determinar as constantes da taxa de associação e de dissociação para interação de ligação entre a própria proteína de ligação ao PSMA ou seu domínio de ligação ao PSMA e um ligante.

[080] Em certas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA revelada nesse relatório descritivo se liga ao PSMA humano com uma Kd humana (hKd). Em certas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA revelada nesse relatório descritivo se liga ao PSMA de *Cynomolgus* com uma Kd de cino (cKd). Em certas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA revelada nesse relatório descritivo se liga ao PSMA de *Cynomolgus* com uma Kd de cino (cKd) e ao PSMA humano com uma Kd humana (hKd). Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 500 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 450 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam

de cerca de 0,1 nM até cerca de 400 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 350 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 300 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 250 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 200 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 150 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 100 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,1 nM até cerca de 90 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,2 nM até cerca de 80 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,3 nM até cerca de 70 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,4 nM até cerca de 50 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,5 nM até cerca de 30 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,6 nM até cerca de 10 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,7 nM até cerca de 8 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,8 nM até cerca de 6 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 0,9 nM até cerca de 4 nM. Em algumas modalidades, a hKd e a cKd variam de cerca de 1 nM até cerca de 2 nM. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA se liga ao PSMA humano e de *Cynomolgus* com afinidade de ligação comparável (Kd) .

[081] Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende a sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4 e possui uma hKd de cerca

de 10 nM até cerca de 20 nM. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende uma mutação de ácido glutâmico para prolina na posição de aminoácido 31 do ID. DE SEQ. N°: 4 e possui uma hKd de cerca de 5 nM até cerca de 10 nM. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende uma mutação de treonina para glutamina na posição de aminoácido 56 do ID. DE SEQ. N°: 4 e possui uma hKd de cerca de 1 nM até cerca de 7 nM. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende uma mutação de glicina para lisina na posição de aminoácido 55 do ID. DE SEQ. N°: 4 e possui uma hKd de cerca de 0,5 nM até cerca de 5 nM. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende uma mutação de serina para histidina na posição de aminoácido 33, de treonina para ácido aspártico na posição de aminoácido 50 e substituição de glicina para serina na posição de aminoácido 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 e possui uma hKd de cerca de 5 nM até cerca de 10 nM. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA da presente revelação compreende uma mutação de serina para histidina na posição de aminoácido 33 e substituição de glicina para serina na posição de aminoácido 97 do ID. DE SEQ. N°: 4 e possui uma hKd de cerca de 0,05 nM até cerca de 2 nM. Dessa forma, em várias modalidades, as proteínas de ligação ao PSMA que compreendem uma ou mais substituições comparada com a sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4 possuem afinidades de ligação para PSMA humano que são 1,5 vez até cerca de 300 vezes maiores do que de uma proteína que compreende a sequência do ID. DE SEQ. N°: 4, sem nenhuma substituição. Por exemplo, a afinidade de ligação é cerca de

1,5 vez até cerca de 3 vezes maior quando a substituição (ou substituições) do ID. DE SEQ. N°: 4 compreende E31P; cerca de 2 vezes até cerca de 15 vezes maior quando a substituição (ou substituições) do ID. DE SEQ. N°: 4 compreende T56Q; cerca de 3 vezes até cerca de 30 vezes maior quando a substituição (ou substituições) do ID. DE SEQ. N°: 4 compreende G55K; cerca de 2 vezes até cerca de 3 vezes maior quando a substituição (ou substituições) do ID. DE SEQ. N°: 4 compreende S33H T50D G97S; e cerca de 5 vezes até cerca de 300 vezes maior quando a substituição (ou substituições) do ID. DE SEQ. N°: 4 compreende S33H G97S. Em algumas modalidades, as (uma ou mais) substituições de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 4, como descrito acima, leva à afinidade de ligação aumentada tanto para PSMA humano quanto de *Cynomolgus*, por exemplo, uma proteína de ligação ao PSMA da presente revelação que compreende substituições de aminoácidos S33H e G97S no ID. DE SEQ. N°: 4 mostra afinidade aumentada para PSMA humano e de *Cynomolgus* comparada com uma proteína que compreende a sequência do ID. DE SEQ. N°: 4 sem nenhuma substituição. Um exemplo adicional desse aumento de afinidade dupla é observado em caso de uma proteína de ligação ao PSMA que compreende substituições de aminoácidos S33H, T50D e G97S no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, qualquer uma das proteínas de ligação ao PSMA citadas anteriormente (por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA dos IDS. DE SEQ. N°s 21-32) são peptídeo com tag de afinidade para facilitar a purificação. Em algumas modalidades, o tag de afinidade de peptídeo consiste em seis resíduos de histidina consecutivos, também denominado 6his (ID. DE SEQ. N°: 33).

[082] A afinidade de ligação de proteínas de ligação ao PSMA, por exemplo, um anticorpo de domínio único anti-PSMA da presente revelação, também pode ser descrita em termos relativos ou comparada com a afinidade de ligação de uma segunda proteína de ligação que também se liga especificamente ao PSMA (por exemplo, um segundo anticorpo de domínio único anti-PSMA que é PSMA-específico, que pode ser referido nesse relatório descritivo como um "segundo anticorpo PSMA-específico". Em algumas modalidades, o segundo anticorpo PSMA-específico é qualquer uma das variantes da proteína de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo, por exemplo, as proteínas de ligação definidas pelos IDS. DE SEQ. N^os 21-32. Consequentemente, certas modalidades da presente revelação estão relacionadas a um anticorpo de domínio único anti-PSMA que se liga ao PSMA humano e/ou PSMA de *Cynomolgus* com maior afinidade do que a proteína de ligação do ID. DE SEQ. N^o: 4, ou com uma Kd que é menor do que a Kd da proteína de ligação do ID. DE SEQ. N^o: 4. Além disso, modalidades adicionais da presente revelação estão relacionadas a um anticorpo de domínio único anti-PSMA que se liga ao PSMA humano e/ou PSMA de *Cynomolgus* com maior afinidade do que a proteína de ligação do ID. DE SEQ. N^o: 19, ou com uma Kd que é menor do que a Kd da proteína de ligação do ID. DE SEQ. N^o: 19.

Domínio de ligação ao CD3

[083] A especificidade da resposta de células T é mediada pelo reconhecimento de antígeno (exibido no contexto de um complexo de histocompatibilidade principal, MHC) pelo complexo receptor de célula T. Como parte do complexo receptor de célula T, CD3 é um complexo de proteína que

inclui uma cadeia CD3 γ (gama), uma cadeia CD3 δ (delta) e duas cadeias CD3 ϵ (épsilon), que estão presentes na superfície celular. CD3 se associa com as cadeias α (alfa) e β (beta) do receptor de célula T (TCR) e também CD3 ζ (zeta) em conjunto para compreender o complexo receptor de célula T. O agrupamento de CD3 em células T, por exemplo, por anticorpos anti-CD3 immobilizados, leva à ativação de célula T similar ao engajamento do receptor de célula T, mas independentemente de sua especificidade-clone típica.

[084] Em um aspecto, é descrita nesse relatório descritivo uma proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente ao CD3. Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente ao CD3 γ . Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente ao CD3 δ . Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente ao CD3 ϵ .

[085] Em modalidades adicionais, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente ao receptor de célula T (TCR). Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente à cadeia α do TCR. Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica ainda compreende um domínio que se liga especificamente à cadeia β do TCR.

[086] Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica

ainda compreende um domínio que se liga especificamente a uma proteína sérica volumosa, por exemplo, albumina sérica humana (HSA). Em algumas modalidades, o domínio de ligação à HSA compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 123-146.

[087] Em algumas modalidades, a proteína multiespecífica é uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica que visa PSMA, também referida nesse relatório descritivo uma molécula TritAC direcionada ao PSMA ou molécula triespecífica para PSMA ou molécula triespecífica.

[088] Em certas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 da proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo exibe não apenas potentes afinidades de ligação ao CD3 com CD3 humano, mas também exibem excelente reatividade cruzada com as respectivas proteínas CD3 de macaco *Cynomolgus*. Em alguns casos, o domínio de ligação ao CD3 das proteínas multiespecíficas reage de forma cruzada com CD3 de macaco *Cynomolgus*.

[089] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 da proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo pode ser qualquer domínio que se liga ao CD3 incluindo, sem limitação, domínios de um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos anticorpos de ligação ao CD3, por exemplo, anticorpos de domínio único (sdAb), fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂ e Fv, fragmentos compostos por uma ou mais CDRs, anticorpos de cadeia única (por exemplo, fragmentos Fv de cadeia única

(scFv)), fragmentos Fv estabilizados com dissulfeto (dsFv), anticorpos de heteroconjugado (por exemplo, anticorpos biespecíficos), fragmentos pFv, monômeros ou dímeros de cadeia pesada, monômeros ou dímeros de cadeia leve, e dímeros que consistem em uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Em alguns casos, é benéfico que o domínio de ligação ao CD3 seja derivado da mesma espécie na qual a proteína multiespecífica que compreende uma única proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo na qual será, por fim, usada. Por exemplo, para uso em humanos, pode ser benéfico que o domínio de ligação ao CD3 da proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo compreenda resíduos humanos ou humanizados do domínio de ligação ao PSMA de um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

[090] Dessa forma, em um aspecto, o domínio de ligação ao CD3 da proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA compreende um anticorpo humanizado ou humano ou um fragmento de anticorpo, ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo murídeo. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano compreende uma ou mais (por exemplo, todas as três) regiões determinantes complementares de cadeia leve, região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LC CDR1), região determinante de complementaridade de cadeia leve 2 (LC CDR2) e região determinante de complementaridade de cadeia leve 3 (LC CDR3) de um domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano descrito nesse relatório descritivo, e/ou uma ou mais (por exemplo, todas as três) regiões determinantes complementares de cadeia pesada, região

determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HC CDR1), região determinante de complementaridade de cadeia pesada 2 (HC CDR2) e região determinante de complementaridade de cadeia pesada 3 (HC CDR3) de um domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano descrito nesse relatório descritivo, por exemplo, um domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano que compreende uma ou mais, por exemplo, todas as três, LC CDRs e uma ou mais, por exemplo, todas as três, HC CDRs.

[091] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano compreende uma região variável da cadeia leve humanizada ou humana específica para CD3, em que a região variável da cadeia leve específica para CD3 compreende CDRs de cadeia leve humanas ou não humanas em uma região *framework* de cadeia leve humana. Em certos casos, a região *framework* de cadeia leve é uma *framework* de cadeia leve λ (lambda). Em outros casos, a região *framework* de cadeia leve é uma *framework* de cadeia leve κ (kappa).

[092] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano compreende uma região variável da cadeia pesada humanizada ou humana específica para CD3, em que a região variável da cadeia pesada específica para CD3 compreende CDRs de cadeia pesada humanas ou não humanas em uma região *framework* de cadeia pesada humana.

[093] Em certos casos, as regiões determinantes complementares da cadeia pesada e/ou da cadeia leve são derivadas de anticorpos anti-CD3 conhecidos como, por exemplo, muromonab-CD3 (OKT3), otelixizumab (TRX4), teplizumab (MGA031), visilizumab (Nuvion), SP34, TR-66 or X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5,

F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-1 e WT-31.

[094] Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD3 é um fragmento variável de cadeia única (scFv) que comprehende uma cadeia leve e uma cadeia pesada de uma sequência de aminoácidos fornecida nesse relatório descritivo. Como usado nesse relatório descritivo, o termo "fragmento variável de cadeia única" ou "scFv" se refere a um fragmento de anticorpo que comprehende uma região variável de uma cadeia leve e pelo menos um fragmento de anticorpo que comprehende uma região variável de uma cadeia pesada, em que as regiões variáveis da cadeia leve e pesada estão ligadas contiguamente por meio de um vinculador polipeptídico flexível curto, e capaz de ser expresso como uma cadeia polipeptídica única, e em que o scFv retém a especificidade do anticorpo intacto do qual é derivado. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD3 comprehende: uma região variável da cadeia leve que comprehende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos uma, duas ou três modificações (por exemplo, substituições), mas no máximo 30, 20 ou 10 modificações (por exemplo, substituições) de uma sequência de aminoácidos de uma região variável da cadeia leve fornecida nesse relatório descritivo, ou uma sequência com 95-99% de identidade com uma sequência de aminoácidos fornecida nesse relatório descritivo; e/ou uma região variável da cadeia pesada que comprehende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos uma, duas ou três modificações (por exemplo, substituições), mas no máximo 30, 20 ou 10 modificações (por exemplo, substituições) de uma sequência de aminoácidos de uma região variável da cadeia

pesada fornecida nesse relatório descritivo, ou uma sequência com 95-99% de identidade para uma sequência de aminoácidos fornecida nesse relatório descritivo. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD3 humanizado ou humano é um scFv, e uma região variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos descrita nesse relatório descritivo está anexada a uma região variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos descrita nesse relatório descritivo, por meio de um vinculador de scFv. A região variável da cadeia leve e região variável da cadeia pesada de um scFv podem estar, por exemplo, em qualquer uma das seguintes orientações: região variável da cadeia leve-vinculador de scFv-região variável da cadeia pesada ou região variável da cadeia pesada-vinculador de scFv-região variável da cadeia leve.

[095] Em alguns casos, scFvs que se ligam ao CD3 são preparados de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, moléculas de scFv podem ser produzidas por ligação de regiões VH e VL juntas usando vinculadores polipeptídicos flexíveis. As moléculas de scFv compreendem um vinculador de scFv (por exemplo, um vinculador de Ser-Gly) com um comprimento e/ou composição de aminoácidos otimizados. Consequentemente, em algumas modalidades, o comprimento do vinculador de scFv é tal que o domínio VH ou VL pode se associar intermolecularmente com o outro domínio variável para formar o sítio de ligação ao CD3. Em certas modalidades, esses vinculadores de scFv são "curtos", ou seja, consistem em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 resíduos de aminoácidos. Dessa forma, em certos casos, os vinculadores de scFv consistem em cerca de 12 ou menos resíduos de

aminoácidos. No caso de 0 resíduo de aminoácidos, o vinculador de scFv é uma ligação peptídica. Em algumas modalidades, esses vinculadores de scFv consistem em cerca de 3 até cerca de 15, por exemplo, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos contíguos. Em relação à composição de aminoácidos dos vinculadores de scFv, são selecionados peptídeos que conferem flexibilidade, não interferem com os domínios variáveis, bem como permitem enovelamento intercadeias para colocar os dois domínios variáveis juntos para formar um sítio de ligação ao CD3 funcional. Por exemplo, vinculadores de scFv que compreendem resíduos de glicina e serina geralmente fornecem resistência à protease. Em algumas modalidades, vinculadores em um scFv compreendem resíduos de glicina e serina. A sequência de aminoácidos dos vinculadores de scFv pode ser otimizada, por exemplo, por métodos de apresentação em fago, para aumentar a ligação ao CD3 e o rendimento de produção do scFv. Exemplos de vinculadores de scFv peptídicos adequados para ligação de um domínio variável de cadeia leve e um domínio variável de cadeia pesada em um scFv incluem, sem limitação, $(GS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 157), $(GGS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 158), $(GGGS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 159), $(GGSG)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 160), $(GGSGG)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 161) ou $(GGGGS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 162), em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade, o vinculador de scFv pode ser $(GGGGS)_4$ (ID. DE SEQ. N°: 163) ou $(GGGGS)_3$ (ID. DE SEQ. N°: 164). A variação no comprimento do vinculador pode reter ou aumentar a atividade, dando origem a uma eficácia superior em estudos de atividade.

[096] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA

possui uma afinidade por CD3 em células que expressam CD3 com uma K_D de 1.000 nM ou menos, 500 nM ou menos, 200 nM ou menos, 100 nM ou menos, 80 nM ou menos, 50 nM ou menos, 20 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 1 nM ou menos, ou 0,5 nM ou menos. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA possui uma afinidade por CD3 ε , γ ou δ com uma K_D de 1.000 nM ou menos, 500 nM ou menos, 200 nM ou menos, 100 nM ou menos, 80 nM ou menos, 50 nM ou menos, 20 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 1 nM ou menos, ou 0,5 nM ou menos. Em modalidades adicionais, o domínio de ligação ao CD3 da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA possui afinidade baixa para CD3, ou seja, cerca de 100 nM ou maior.

[097] A afinidade para se ligar ao CD3 pode ser determinada, por exemplo, pela habilidade da própria proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA ou de seu domínio de ligação ao CD3 para se ligar ao CD3 revestido em uma placa de ensaio; exibido na superfície de uma célula microbiana; em solução; etc. A atividade de ligação da própria proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA ou de seu domínio de ligação ao CD3 da presente revelação pode ser testada por imobilização do ligante (por exemplo, CD3) ou da própria proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA ou de seu domínio de ligação ao CD3, a um glóbulo, substrato, célula etc. Agentes podem ser adicionados em um tampão apropriado e os parceiros de ligação incubados por um período de tempo em uma certa temperatura. Após lavagem para remover material não ligado, a proteína ligada pode ser liberada com, por exemplo, SDS,

tampões com um pH elevado e semelhantes, e analisada, por exemplo, por ressonância de plásmon de superfície (SPR).

[098] Em algumas modalidades, os domínios de ligação ao CD3 descritos nesse relatório descriptivo compreendem um polipeptídeo que possui uma sequência descrita na Tabela 7 (ID. DE SEQ. N°: 34-88) e subsequências desta. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um polipeptídeo que possui pelo menos 70%-95% ou mais de homologia para uma sequência descrita na Tabela 7 (ID. DE SEQ. N°: 34-122). Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um polipeptídeo que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais de homologia para uma sequência descrita na Tabela 7 (ID. DE SEQ. N°: 34-122). Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 possui uma sequência que compreende pelo menos uma porção de uma sequência descrita na Tabela 7 (ID. DE SEQ. N°: 34-122). Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um polipeptídeo que compreende uma ou mais das sequências descritas na Tabela 7 (ID. DE SEQ. N°: 34-122).

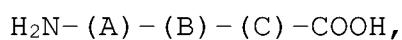
[099] Em certas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um scFv com uma CDR1 da cadeia pesada que compreende o ID. DE SEQ. N°: 49, e 56-67. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um scFv com uma CDR2 da cadeia pesada que compreende o ID. DE SEQ. N°: 50, e 68-77. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um scFv com uma CDR3 da cadeia pesada que compreende o ID. DE SEQ. N°: 51, e 78-87. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um scFv com uma CDR1 da cadeia leve que compreende o ID. DE SEQ. N°: 53, e 88-100. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao

CD3 compreende um scFv com uma CDR2 da cadeia leve que compreende o ID. DE SEQ. Nº: 54, e 101-113. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao CD3 compreende um scFv com uma CDR3 da cadeia leve que compreende o ID. DE SEQ. Nº: 55, e 114-120.

[100] A afinidade para se ligar ao CD3 pode ser determinada, por exemplo, pela habilidade da proteína multiespecífica que compreende uma própria proteína de ligação ao PSMA ou seu domínio de ligação ao CD3 para se ligar ao CD3 revestido em uma placa de ensaio; exibido na superfície de uma célula microbiana; em solução; etc. A atividade de ligação de proteína multiespecífica que compreende uma própria proteína de ligação ao PSMA ou seu domínio de ligação ao CD3 de acordo com a presente revelação ao CD3 pode ser testada por imobilização do ligante (por exemplo, CD3) ou da referida própria proteína multiespecífica ou seu de domínio de ligação ao CD3, a um glóbulo, substrato, célula etc. A atividade de ligação da proteína multiespecífica que compreende uma própria proteína de ligação ao PSMA ou seu domínio de ligação ao CD3 para se ligar ao CD3 pode ser determinada por imobilização do ligante (por exemplo, CD3) ou da referida própria proteína multiespecífica ou seu de domínio de ligação ao PSMA, a um glóbulo, substrato, célula etc. Em algumas modalidades, a ligação entre a proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA e um ligante-alvo (por exemplo, CD3) é determinada, por exemplo, por um ensaio de cinética de ligação. O ensaio de cinética de ligação, em certas modalidades, é realizado usando um sistema OCTET®. Nessas modalidades, uma primeira etapa compreende a imobilização de

um ligante (por exemplo, CD3 biotinilado) sobre a superfície de um biossensor (por exemplo, um biossensor de estreptavidina) em uma densidade de carga ótima, seguida por uma lavagem com um tampão de ensaio para remover ligantes não ligados; que é seguida por associação do analito, por exemplo, a proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA com o ligante; o que é seguido por exposição do biossensor a um tampão que não contém o analito resultando, dessa forma, na dissociação da proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA do ligante. Agentes de bloqueio adequados, por exemplo, BSA, Caseína, Tween-20, PEG, gelatina, são usados para bloquear os sítios de ligação não específicos no biossensor, durante o ensaio de cinética. Os dados da cinética de ligação são subsequentemente analisados usando um software apropriado (por exemplo, software Octet de ForteBio) para determinar as constantes da taxa de associação e de dissociação para interação de ligação entre a proteína multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA e um ligante.

[101] Em um aspecto, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA compreendem um domínio (A) que se liga especificamente ao CD3, um domínio (B) que se liga especificamente à albumina sérica humana (HSA) e um domínio (C) que se liga especificamente ao PSMA. Os três domínios em proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA estão dispostos em qualquer ordem. Dessa forma, é contemplado que as ordens de domínios das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA são:



$\text{H}_2\text{N}-\text{(A)}-\text{(C)}-\text{(B)}-\text{COOH}$,

$\text{H}_2\text{N}-\text{(B)}-\text{(A)}-\text{(C)}-\text{COOH}$,

$\text{H}_2\text{N}-\text{(B)}-\text{(C)}-\text{(A)}-\text{COOH}$,

$\text{H}_2\text{N}-\text{(C)}-\text{(B)}-\text{(A)}-\text{COOH}$, ou

$\text{H}_2\text{N}-\text{(C)}-\text{(A)}-\text{(B)}-\text{COOH}$.

[102] Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem uma ordem de domínio de $\text{H}_2\text{N}-\text{(A)}-\text{(B)}-\text{(C)}-\text{COOH}$. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem uma ordem de domínio de $\text{H}_2\text{N}-\text{(A)}-\text{(C)}-\text{(B)}-\text{COOH}$. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem uma ordem de domínio de $\text{H}_2\text{N}-\text{(B)}-\text{(A)}-\text{(C)}-\text{COOH}$. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem uma ordem de domínio de $\text{H}_2\text{N}-\text{(B)}-\text{(C)}-\text{(A)}-\text{COOH}$. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem uma ordem de domínio de $\text{H}_2\text{N}-\text{(C)}-\text{(B)}-\text{(A)}-\text{COOH}$. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem uma ordem de domínio de $\text{H}_2\text{N}-\text{(C)}-\text{(A)}-\text{(B)}-\text{COOH}$.

[103] Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA possuem o domínio de ligação à HSA como o domínio do meio, de modo que a ordem de domínio é $\text{H}_2\text{N}-\text{(A)}-\text{(B)}-\text{(C)}-\text{COOH}$ ou $\text{H}_2\text{N}-\text{(C)}-\text{(B)}-\text{(A)}-\text{COOH}$. É contemplado que nessas modalidades nas quais o domínio de ligação à HSA é o domínio do meio, os domínios de ligação ao CD3 e PSMA recebem flexibilidade adicional para se ligar aos seus respectivos alvos.

[104] Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo compreendem um polipeptídeo que possui

uma sequência descrita na Tabela 10 (ID. DE SEQ. N°: 147-156) e subsequências desta. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica compreende um polipeptídeo que possui pelo menos 70%-95% ou mais de homologia para uma sequência descrita na Tabela 10 (ID. DE SEQ. N°: 147-156). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica compreende um polipeptídeo que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais de homologia para uma sequência descrita na Tabela 10 (ID. DE SEQ. N°: 1470-156). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica possui uma sequência que compreende pelo menos uma porção de uma sequência descrita na Tabela 10 (ID. DE SEQ. N°: 147-156). Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA compreende um polipeptídeo que compreende uma ou mais das sequências descritas na Tabela 10 (ID. DE SEQ. N°: 147-156). Em modalidades adicionais, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA compreende uma ou mais CDRs como descritas nas sequências na Tabela 10 (ID. DE SEQ. N°: 147-156).

[105] As proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descriptivo são projetadas para visar especificamente células que expressam PSMA por recrutamento de células T citotóxicas. Isso aumenta a eficácia comparada com ADCC (citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente), que é a utilização de anticorpos de comprimento total dirigidos para um único antígeno e não é capaz de recrutar diretamente células T citotóxicas. Em contraste, por engajamento de moléculas de CD3 expressas especificamente nessas células, as proteínas

triespecíficas direcionadas ao PSMA podem reticular células T citotóxicas com células que expressam PSMA de uma forma altamente específica direcionando, dessa forma, o potencial citotóxico da célula T em direção à célula-alvo. As proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo engajam células T citotóxicas por meio de ligação às proteínas CD3 expressas na superfície, que formam parte do TCR. A ligação simultânea de várias proteínas de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA ao CD3 e ao PSMA expressos na superfície de células particulares causa ativação de célula T e medeia a lise subsequente da célula que expressa PSMA em particular. Dessa forma, é contemplado que proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA exibem morte de célula-alvo potente, específica e eficiente. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo estimulam a morte de célula-alvo por células T citotóxicas para eliminar células patogênicas (por exemplo, células tumorais que expressam PSMA). Em algumas dessas modalidades, as células são eliminadas seletivamente reduzindo, dessa forma, o potencial para efeitos colaterais tóxicos.

[106] As proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo conferem vantagens terapêuticas adicionais em relação aos anticorpos monoclonais tradicionais e outras moléculas biespecíficas menores. Geralmente, a eficácia de produtos farmacêuticos de proteína recombinante depende, em grande parte, da farmacocinética intrínseca da própria proteína. Um desses benefícios aqui é que as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo

possuem meia-vida de eliminação farmacocinética estendida em função de terem um domínio de extensão da meia-vida como, por exemplo, um domínio específico para HSA. A esse respeito, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo possuem uma meia-vida de eliminação sérica estendida de cerca de dois, três, cerca de cinco, cerca de sete, cerca de 10, cerca de 12 ou cerca de 14 dias, em algumas modalidades. Isso contrasta com outras proteínas de ligação como, por exemplo, moléculas BiTE ou DART, que possuem meias-vidas de eliminação relativamente bem mais curtas. Por exemplo, a molécula de fusão scFv-scFv biespecífica CD19 x CD3 BiTE exige liberação do fármaco por infusão intravenosa (i.v.) contínua em função de sua meia-vida de eliminação curta. As meias-vidas intrínsecas mais longas das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA solucionam essa questão permitindo, dessa forma, potencial terapêutico aumentado como, por exemplo, formulações farmacêuticas de baixa dose, administração periódica diminuída e/ou novas composições farmacêuticas.

[107] As proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo também possuem um tamanho ótimo para penetração no tecido e distribuição no tecido aumentadas. Tamanhos grandes limitam ou evitam a penetração ou distribuição da proteína nos tecidos-alvo. As proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo evitam isso por terem um pequeno tamanho que permite a penetração e distribuição no tecido aumentadas. Consequentemente, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo, em algumas modalidades, possuem um tamanho de cerca de 50 kD

até cerca de 80 kD, cerca de 50 kD até cerca de 75 kD, cerca de 50 kD até cerca de 70 kD ou cerca de 50 kD até cerca de 65 kD. Dessa forma, o tamanho das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA é vantajoso em relação aos anticorpos IgG que têm cerca de 150 kD e as moléculas de *diobody* BiTE e DART, que têm cerca de 55 kD, mas não têm meia-vida estendida e, portanto, são depuradas rapidamente através do rim.

[108] Em modalidades adicionais, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo possuem um tamanho ótimo para penetração e distribuição aumentadas no tecido. Nessas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA são construídas para serem tão pequenas quanto possível retendo, ao mesmo tempo, a especificidade para seus alvos. Consequentemente, nessas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo possuem um tamanho de cerca de 20 kD até cerca de 40 kD ou cerca de 25 kD até cerca de 35 kD até cerca de 40 kD, até cerca de 45 kD, até cerca de 50 kD, até cerca de 55 kD, até cerca de 60 kD, até cerca de 65 kD. Em algumas modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo possuem um tamanho de cerca de 50 kD, 49, kD, 48 kD, 47 kD, 46 kD, 45 kD, 44 kD, 43 kD, 42 kD, 41 kD, 40 kD, cerca de 39 kD, cerca de 38 kD, cerca de 37 kD, cerca de 36 kD, cerca de 35 kD, cerca de 34 kD, cerca de 33 kD, cerca de 32 kD, cerca de 31 kD, cerca de 30 kD, cerca de 29 kD, cerca de 28 kD, cerca de 27 kD, cerca de 26 kD, cerca de 25 kD, cerca de 24 kD, cerca de 23 kD, cerca de 22 kD, cerca de 21 kD ou cerca

de 20 kD. Uma abordagem exemplar para o pequeno tamanho é por meio do uso de fragmentos de anticorpo de domínio único (sdAb) para cada um dos domínios. Por exemplo, uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA particular possui um sdAb anti-CD3, sdAb anti-HSA e um sdAb para PSMA. Isso reduz o tamanho da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar para abaixo de 40 kD. Dessa forma, em algumas modalidades, os domínios das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA são todos fragmentos de anticorpo de domínio único (sdAb). Em outras modalidades, as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo compreendem aglutinantes de entidade de pequena molécula (SME) para HSA e/ou o PSMA. Aglutinantes de SME são pequenas moléculas com média de cerca de 500 a 2.000 Da de tamanho e são anexados às proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA por métodos conhecidos, por exemplo, ligação ou conjugação de sortase. Nesses casos, um dos domínios da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA é uma sequência de reconhecimento de sortase, por exemplo, LPETG (ID. DE SEQ. N°: 57). Para anexar um aglutinante de SME à proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA com uma sequência de reconhecimento de sortase, a proteína é incubada com uma sortase e um aglutinante de SME e, dessa forma, a sortase anexa o aglutinante de SME à sequência de reconhecimento. Aglutinantes de SME conhecidos incluem MIP-1072 e MIP-1095 que se ligam ao antígeno de membrana específico da próstata (PSMA). Ainda em outras modalidades, o domínio que se liga ao PSMA de proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo compreendem um peptídeo

knottin para ligação ao PSMA. *Knottins* são peptídeos estabilizados com dissulfeto com um arcabouço de *knot* de cisteína e possuem tamanhos médios de cerca de 3,5 kD. *Knottins* foram contemplados para ligação a certas moléculas tumorais como, por exemplo, PSMA. Em modalidades adicionais, o domínio que se liga ao PSMA de proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo compreendem um ligante de PSMA natural.

[109] Outra característica das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo é que elas são de um design de polipeptídeo único com ligação flexível de seus domínios. Isso permite a produção e manufatura fáceis das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA, na medida em que podem ser codificadas por uma única molécula de cDNA para serem facilmente incorporadas em um vetor. Além disso, como as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo são uma cadeia polipeptídica monomérica única, não há questões relacionados ao pareamento de cadeias ou a necessidade de dimerização. É contemplado que as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo possuem uma tendência reduzida para agregar, diferentemente de outras moléculas relatadas como, por exemplo, proteínas biespecíficas com domínios de imunoglobulina Fc-gama.

[110] Nas proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA descritas nesse relatório descritivo, os domínios são ligados por vinculadores internos L1 e L2, em que L1 liga o primeiro e segundo domínios das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA e L2 liga o segundo e terceiro domínios

das proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA. Os vinculadores L1 e L2 possuem um comprimento e/ou composição de aminoácidos otimizados. Em algumas modalidades, os vinculadores L1 e L2 são do mesmo comprimento e composição de aminoácidos. Em outras modalidades, L1 e L2 são diferentes. Em certas modalidades, os vinculadores internos L1 e/ou L2 são "curtos", ou seja, consistem em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 resíduos de aminoácidos. Dessa forma, em certos casos, os vinculadores internos consistem em cerca de 12 ou menos resíduos de aminoácidos. No caso de 0 resíduo de aminoácidos, o vinculador interno é uma ligação peptídica. Em certas modalidades, os vinculadores internos L1 e/ou L2 são "longos", ou seja, consistem em 15, 20 ou 25 resíduos de aminoácidos. Em algumas modalidades, esses vinculadores internos consistem em cerca de 3 até cerca de 15, por exemplo, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos contíguos. Em relação à composição de aminoácidos dos vinculadores internos L1 e L2, são selecionados peptídeos com propriedades que conferem flexibilidade às proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA, não interferem com os domínios de ligação, bem como resistem à clivagem por proteases. Por exemplo, resíduos de glicina e serina geralmente fornecem resistência à protease. Exemplos de vinculadores internos adequados para ligação dos domínios nas proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA incluem, sem limitação, $(GS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 157), $(GGS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 158), $(GGGS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 159), $(GGSG)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 160), $(GGSGG)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 161) ou $(GGGGS)_n$ (ID. DE SEQ. N°: 162), em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade, o vinculador interno L1 e/ou L2 é

(GGGGS)₄ (ID. DE SEQ. N°: 163) ou (GGGGS)₃ (ID. DE SEQ. N°: 164).

Modificações da proteína de ligação ao PSMA

[111] As proteínas de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo englobam derivados ou análogos nos quais (i) um aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que não é um codificado pelo código genético, (ii) o polipeptídeo maduro é fundido com outro composto como, por exemplo, polietileno glicol, ou (iii) aminoácidos adicionais são fundidos à proteína, por exemplo, como uma sequência líder ou secretária ou uma sequência para bloquear um domínio imunogênico e/ou para purificação da proteína.

[112] Modificações típicas incluem, sem limitação, acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, adesão covalente de flavina, adesão covalente de uma porção heme, adesão covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, adesão covalente de um lipídeo ou derivado de lipídeo, adesão covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação dissulfeto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cistina, formação de piroglutamato, formilação, gama carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatização, adição mediada por RNA de transferência de aminoácidos para proteínas como, por exemplo, arginilação e ubiquitinação.

[113] Modificações são feitas em qualquer lugar nas proteínas de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo, incluindo no arcabouço de peptídeo, nas cadeias

laterais de aminoácidos e nos terminais amino ou carboxil. Certas modificações de peptídeos comuns que são úteis para a modificação de proteínas de ligação ao PSMA incluem glicosilação, adesão de lipídeo, sulfatização, gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação, bloqueio do grupo amino ou carboxil em um polipeptídeo, ou ambos, por uma modificação covalente, e ADP-ribosilação.

Polinucleotídeos que codificam proteínas de ligação ao PSMA

[114] Também são fornecidas, em algumas modalidades, moléculas de polinucleotídeos que codificam uma proteína de ligação ao PSMA como descrita nesse relatório descriptivo. Em algumas modalidades, as moléculas de polinucleotídeos são fornecidas como uma construção de DNA. Em outras modalidades, as moléculas de polinucleotídeos são fornecidas como um transcrito de RNA mensageiro.

[115] As moléculas de polinucleotídeos são construídas por métodos conhecidos como, por exemplo, por combinação dos genes que codificam a proteína de ligação anti-PSMA, ligados operacionalmente a um promotor adequado e, opcionalmente, um terminador da transcrição adequado, e expressando-a em bactérias ou outro sistema de expressão apropriado como, por exemplo, células CHO.

[116] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo é inserido em um vetor, preferivelmente um vetor de expressão, que representa uma modalidade adicional. Esse vetor recombinante pode ser construído de acordo com métodos conhecidos. Vetores de interesse particular incluem plasmídeos, fagomídeos, derivados de fago, vírus (por exemplo, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados, herpes vírus, lentivírus e semelhantes) e cosmídeos.

[117] Diversos sistemas de vetor/hospedeiro de expressão podem ser utilizados para conter e expressar o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo da proteína de ligação ao PSMA descrita. Exemplos de vetores de expressão para expressão em *E. coli* são pSKK (Le Gall e cols., *J. Immunol. Methods.* (2004) 285 (1): 111-27), pcDNA5 (Invitrogen) para expressão em células de mamíferos, Sistemas de Expressão em Levedura PICHIAPIINK™ (Invitrogen), Sistema de Expressão em Baculovírus BACUVANCE™ (GenScript).

[118] Dessa forma, as proteínas de ligação à albumina-PSMA como descritas nesse relatório descritivo, em algumas modalidades, são produzidas por introdução de um vetor que codifica a proteína como descrita acima em uma célula hospedeira e cultivo da referida célula hospedeira sob condições sob as quais os domínios de proteína são expressos, podem ser isolados e, opcionalmente, adicionalmente purificados.

Produção de proteínas de ligação ao PSMA

[119] É revelado nesse relatório descritivo, em algumas modalidades, um processo para a produção de uma proteína de ligação ao PSMA. Em algumas modalidades, o processo compreende o cultivo de um hospedeiro transformado ou transfectado com um vetor que compreende uma sequência de ácidos nucléicos que codifica uma proteína de ligação ao PSMA sob condições que permitem a expressão da proteína de ligação ao PSMA e recuperação e purificação da proteína produzida da cultura.

[120] Em uma modalidade adicional, é fornecido um processo dirigido ao aprimoramento de uma ou mais propriedades, por exemplo, afinidade, estabilidade,

tolerância térmica, reatividade cruzada etc., das proteínas de ligação ao PSMA e/ou das proteínas de ligação multiespecíficas que compreendem uma proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo, comparadas com um composto de ligação de referência. Em algumas modalidades, são fornecidas diversas bibliotecas de substituição única, cada uma correspondendo a um domínio diferente, ou segmento de aminoácido, da proteína de ligação ao PSMA ou composto de ligação de referência, de modo que cada membro da biblioteca de substituição única codifique apena uma única alteração de aminoácido em seu domínio correspondente, ou segmento de aminoácido. Tipicamente, isso permite que todas as substituições potenciais em uma proteína grande ou sítio de ligação à proteína sejam sondadas com poucas bibliotecas pequenas. Em algumas modalidades, os diversos domínios formam ou cobrem uma sequência contígua de aminoácidos da proteína de ligação ao PSMA ou um composto de ligação de referência. Sequências de nucleotídeos de diferentes bibliotecas de substituição única se sobrepõem com as sequências de nucleotídeos de pelo menos uma outra biblioteca de substituição única. Em algumas modalidades, são projetadas diversas bibliotecas de substituição única, de modo que cada membro se sobreponha a cada membro de cada biblioteca de substituição única que codifica um domínio adjacente.

[121] Os compostos de ligação expressos a partir dessas bibliotecas de substituição única são selecionados separadamente para obter um subconjunto de variantes em cada biblioteca que possui propriedades pelo menos tão boas quanto aquelas do composto de ligação de referência e cuja

biblioteca resultante é reduzida de tamanho. Geralmente, o número de ácidos nucléicos que codificam o conjunto de compostos de ligação selecionado é menor do que o número de ácidos nucléicos que codificam membros da biblioteca de substituição única original. Essas propriedades incluem, sem limitação, afinidade para um composto-alvo, estabilidade com relação a várias condições como, por exemplo, calor, pH alto ou baixo, degradação enzimática, reatividade cruzada para outras proteínas e semelhantes. Os compostos selecionados de cada biblioteca de substituição única são referidos nesse relatório descritivo de forma intercambiável como "compostos pré-candidatos" ou "proteínas pré-candidatas". Sequências de ácidos nucléicos que codificam os compostos pré-candidatos a partir das bibliotecas de substituição única separadas são então embaralhadas em uma PCR para gerar uma biblioteca embaralhada, usando técnicas de embaralhamento de genes baseadas em PCR.

[122] Um fluxo de trabalho exemplar do processo de avaliação é descrito nesse relatório descritivo. Bibliotecas de compostos pré-candidatos são geradas a partir de bibliotecas de substituição única e selecionadas para ligação à proteína (ou proteínas)-alvo, e depois as bibliotecas pré-candidatas são embaralhadas para produzir uma biblioteca de ácidos nucléicos que codificam compostos candidatos que, por sua vez, são clonados em um vetor de expressão conveniente, por exemplo, um sistema de expressão de fagomídeo. Compostos candidatos que expressam fago, então, passam por uma ou mais rodadas de seleção para aprimoramentos nas propriedades desejadas, por exemplo, afinidade de ligação a uma molécula-alvo. As moléculas-alvo

podem ser adsorvidas ou de algum outro modo anexadas a uma superfície de um poço ou outro recipiente de reação, ou as moléculas-alvo podem ser derivatizadas com uma porção de ligação, por exemplo, biotina que, após incubação com compostos de ligação candidatos, pode ser capturada com uma porção complementar, por exemplo, estreptavidina, ligada a glóbulos, por exemplo, glóbulos magnéticos, para lavagem. Em regimes de seleção exemplares, os compostos de ligação candidatos passam por uma etapa de lavagem de modo que somente compostos candidatos com taxas de dissociação muito baixas de uma molécula-alvo sejam selecionados. Tempos de lavagem exemplares para essas modalidades são cerca de 10 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 35 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 50 minutos, cerca de 55 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas; ou, em outras modalidades, cerca de 24 horas; ou, em outras modalidades, cerca de 48 horas; ou, em outras modalidades, cerca de 72 horas. Os clones isolados após seleção são amplificados e submetidos a um ciclo adicional de seleção ou analisados, por exemplo, por sequenciamento e por produção de medições comparativas de afinidade de ligação, por exemplo, por ELISA, ressonância de plásmon de superfície (SPR), interferometria de biocamada (por exemplo, sistema OCTET®, Pall Life Sciences, ForteBio, Menlo Park, CA) ou semelhantes.

[123] Em algumas modalidades, o processo acima é implementado para identificar uma ou mais proteínas de ligação ao PSMA com afinidade de ligação aumentada,

reatividade cruzada aumentada para um conjunto selecionado de alvos de ligação, comparada com aquela de uma proteína de ligação ao PSMA de referência. Em algumas modalidades, a proteína de ligação de referência é uma proteína que possui a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, a proteína de ligação de referência é uma proteína que possui a sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 19. Em certas modalidades, bibliotecas de substituição única são preparadas por variação de códons na região VH da proteína de ligação ao PSMA de referência, incluindo códons em regiões *framework* e nas CDRs. Em outra modalidade, as localizações onde códons são variados compreendem as CDRs da cadeia pesada da proteína de ligação ao PSMA de referência, ou um subconjunto dessas CDRs, por exemplo, exclusivamente CDR1, exclusivamente CDR2, exclusivamente CDR3, ou pares destas. Em outra modalidade, as localizações onde códons são variados ocorrem exclusivamente em regiões *framework*. Em algumas modalidades, uma biblioteca compreende alterações de códon único exclusivamente de uma proteína de ligação ao PSMA de referência exclusivamente em regiões *framework* da numeração de VH na faixa de 10 a 111. Em outra modalidade, as localizações onde códons são variados compreendem as CDR3s da cadeia pesada da proteína de ligação ao PSMA de referência, ou um subconjunto dessas CDR3s. Em outra modalidade, o número de localizações onde códons de regiões que codificam VH são variados está na faixa de 10 a 111, de modo que até 80 localizações estejam na região *framework*. Após preparação da biblioteca de substituição única, como descrito acima, as seguintes etapas são realizadas: (a)

expressão separadamente de cada membro de cada biblioteca de substituição única como uma proteína pré-candidata; (b) seleção de membros de cada biblioteca de substituição única que codificam proteínas pré-candidatas que se ligam a um parceiro de ligação que pode ou não diferir do alvo de ligação original [por exemplo, um alvo (ou alvos) de reação cruzada desejado]; (c) embaralhamento dos membros das bibliotecas selecionadas em uma PCR para produzir uma biblioteca combinatória embaralhada; (d) expressão de membros da biblioteca embaralhada como proteínas de ligação ao PSMA candidatas; e (e) seleção de membros da biblioteca embaralhada uma ou mais vezes para proteínas de ligação ao PSMA candidatas que se ligam ao parceiro de ligação original e, potencialmente, (f) seleção adicional das proteínas candidatas para ligação ao alvo (ou alvos) de reação cruzada desejado fornecendo, dessa forma, uma proteína de ligação ao PSMA codificada pelo ácido nucléico com reatividade cruzada aumentada para uma ou mais substâncias com relação à proteína de ligação ao PSMA de referência, sem perda de afinidade para o ligante original. Em modalidades adicionais, o método pode ser implementado para obtenção de uma proteína de ligação ao PSMA com reatividade diminuída para uma substância (ou substâncias) ou composto (ou compostos) ou epítopo (ou epítopos) que reage de forma cruzada selecionada por substituição da etapa (f) com a seguinte etapa: depleção de compostos de ligação candidatos uma ou mais vezes do subconjunto de proteínas de ligação ao PSMA candidatas que se ligam ao composto indesejado que reage de forma cruzada.

Composições farmacêuticas

[124] Também são fornecidas, em algumas modalidades,

composições farmacêuticas que compreendem uma proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descriptivo, um vetor que compreende o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo das proteínas de ligação ao PSMA ou uma célula hospedeira transformada por esse vetor e pelo menos um carreador farmaceuticamente aceitável. O termo "carreador farmaceuticamente aceitável" inclui, sem limitação, qualquer carreador que não interfira com a eficácia da atividade biológica dos ingredientes e que não seja tóxico para o paciente ao qual é administrado. Exemplos de carreadores farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, por exemplo, emulsões óleo/água, vários tipos de agentes umidificantes, soluções estéreis etc. Esses carreadores podem ser formulados por métodos convencionais e podem ser administrados ao indivíduo em uma dose adequada. De preferência, as composições são estéreis. Essas composições também podem conter adjuvantes como, por exemplo, agentes conservantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da ação de microorganismos pode ser assegurada pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos.

[125] Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descriptivo é encapsulada em nanopartículas. Em algumas modalidades, as nanopartículas são fulerenos, cristais líquidos, lipossomo, pontos quânticos, nanopartículas superparamagnéticas, dendrímeros ou nanobastões. Em outras modalidades das composições farmacêuticas, a proteína de ligação ao PSMA é anexada a

lipossomos. Em alguns casos, a proteína de ligação ao PSMA é conjugada à superfície de lipossomos. Em alguns casos, a proteína de ligação ao PSMA é encapsulada dentro de uma casca de um lipossomo. Em alguns casos, o lipossomo é um lipossomo catiônico.

[126] As proteínas de ligação ao PSMA descritas nesse relatório descritivo são contempladas para uso como um medicamento. A administração é efetuada por formas diferentes, por exemplo, por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. Em algumas modalidades, a via de administração depende do tipo de terapia e do tipo de composto contido na composição farmacêutica. O regime de dosagem será determinado pelo médico assistente e por outros fatores clínicos. As dosagens para qualquer paciente dependem de muitos fatores, incluindo do tamanho, área de superfície corporal, idade, sexo do paciente, do composto particular a ser administrado, do tempo e da via de administração, do tipo de terapia, da saúde geral e outros fármacos que estão sendo administrados concomitantemente. Uma "dose eficaz" se refere às quantidades do ingrediente ativo que são suficientes para afetar a evolução e a severidade da doença, levando à redução ou remissão dessa patologia, e pode ser determinada usando métodos conhecidos.

Métodos de tratamento

[127] Também são fornecidos nesse relatório descritivo, em algumas modalidades, métodos e usos para estimulação do sistema imune de um indivíduo que dela necessita, que compreendem a administração de uma proteína de ligação ao PSMA ou uma proteína de ligação multiespecífica que

compreende a proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descriptivo. Em alguns casos, a administração de uma proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descriptivo induz e/ou sustenta citotoxicidade para uma célula que expressa um antígeno-alvo. Em alguns casos, a célula que expressa um antígeno-alvo é uma célula de câncer ou tumoral, uma célula infectada por um vírus, uma célula infectada por uma bactéria, uma célula T ou B autorreativa, células sanguíneas vermelhas danificadas, placas arteriais ou tecido fibrótico.

[128] Também são fornecidos nesse relatório descriptivo métodos e usos para um tratamento de uma doença, distúrbio ou condição associada com um antígeno-alvo, que compreendem a administração a um indivíduo que dela necessita de uma proteína de ligação ao PSMA ou uma proteína de ligação multiespecífica que compreende proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descriptivo. Doenças, distúrbios ou condições associadas com um antígeno-alvo incluem, sem limitação, infecção viral, infecção bacteriana, doença autoimune, rejeição de transplante, aterosclerose ou fibrose. Em outras modalidades, a doença, distúrbio ou condição associada com um antígeno-alvo é uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença enxerto-versus-hospedeiro ou uma doença hospedeiro-versus-enxerto. Em uma modalidade, a doença, distúrbio ou condição associada com um antígeno-alvo é câncer. Em um caso, o câncer é um câncer hematológico. Em outro caso, o câncer é um câncer de próstata.

[129] Em algumas modalidades, o câncer de próstata é um câncer de próstata em estágio avançado. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente a fármacos. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente a fármacos de antiandrogênio. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é metastático. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é metastático e resistente a fármacos (por exemplo, resistente a fármacos de antiandrogênio). Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente à castração. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é metastático e resistente à castração. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente à enzalutamida. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente à enzalutamida e abiraterona. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente à enzalutamida, abiraterona e bicalutamida. Em algumas modalidades, o câncer de próstata é resistente ao docetaxel. Em algumas dessas modalidades, o câncer de próstata é resistente à enzalutamida, abiraterona, bicalutamida e ao docetaxel.

[130] Em algumas modalidades, a administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descriptivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descriptivo inibe o crescimento de células de câncer de próstata; inibe a migração de células de câncer de próstata; inibe a invasão de células de câncer de próstata; melhora os sintomas de câncer de próstata; reduz o tamanho de um tumor de câncer de próstata; reduz o número de tumores de câncer de próstata; reduz o número de células de câncer de próstata; induz a

necrose de células de câncer de próstata, piroptose, oncose, apoptose, autofagia, ou outra morte de células; ou aumenta os efeitos terapêuticos de um composto selecionado do grupo que consiste em enzalutamida, abiraterona, docetaxel, bicalutamida, e quaisquer combinações destes.

[131] Em algumas modalidades, o método compreende a inibição do crescimento de células de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o método compreende a inibição da migração de células de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o método compreende a inibição da invasão de células de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o método compreende a melhora dos sintomas de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o método compreende a redução do tamanho de um tumor de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em

algumas modalidades, o método compreende a redução do número de tumores de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o método compreende a redução do número de células de câncer de próstata por administração de um anticorpo de domínio único anti-PSMA descrito nesse relatório descritivo ou de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o método compreende a indução de necrose de células de câncer de próstata, piroptose, oncose, apoptose, autofagia, ou outra morte de células por administração de uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA descrita nesse relatório descritivo.

[132] Como usado nesse relatório descritivo, em algumas modalidades, o termo "tratamento" ou "que trata" ou "tratado" se refere ao tratamento terapêutico em que o objetivo é tornar mais lenta (atenuar) uma condição fisiológica indesejada, distúrbio ou doença, ou obter resultados clínicos benéficos ou desejados. Para as finalidades descritas nesse relatório descritivo, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, sem limitação, alívio de sintomas; diminuição da extensão da condição, distúrbio ou doença; estabilização (ou seja, não piora) do estado da condição, distúrbio ou doença; retardar o surgimento ou tornar mais lenta a progressão da condição, distúrbio ou doença; melhora da condição, distúrbio ou estado de doença; e remissão (seja ela parcial ou total), seja ela detectável ou indetectável, ou melhora da condição, distúrbio ou doença.

Tratamento inclui o desenvolvimento de uma resposta clinicamente significante, sem níveis excessivos de efeitos colaterais. Tratamento também inclui o prolongamento da sobrevida, quando comparada com a sobrevida esperada se não receber o tratamento. Em outras modalidades, "tratamento" ou "que trata" ou "tratado" se refere às medidas profiláticas, em que o objetivo é retardar o surgimento ou reduzir a severidade de uma condição fisiológica indesejada, distúrbio ou doença como, por exemplo, em uma pessoa predisposta a uma doença (por exemplo, um indivíduo que carrega o marcador genético para uma doença como, por exemplo, câncer de mama).

[133] Em algumas modalidades dos métodos descritos nesse relatório descritivo, as proteínas de ligação ao PSMA ou uma proteína de ligação multiespecífica que compreende a proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo são administradas em combinação com um agente para o tratamento da doença, distúrbio ou condição particular. Agentes incluem, sem limitação, terapias que envolvem anticorpos, pequenas moléculas (por exemplo, quimioterápicos), hormônios (esteroidais, peptídicos e semelhantes), radioterapias (raios- γ , raios-X e/ou a liberação direcionada de radioisótopos, microondas, radiação UV e semelhantes), terapias gênicas (por exemplo, anti-senso, terapia retroviral e semelhantes) e outras imunoterapias. Em algumas modalidades, a proteína de ligação ao PSMA ou uma proteína de ligação multiespecífica que compreende a proteína de ligação ao PSMA descrita nesse relatório descritivo é administrada em combinação com agentes antidiarréicos, agentes antieméticos, analgésicos, opióides e/ou agentes antiinflamatórios não esteroidais. Em

algumas modalidades, as proteínas de ligação ao PSMA ou uma proteína de ligação multiespecífica que compreende uma proteína de ligação ao PSMA como descrita nesse relatório descritivo são administradas antes, durante ou depois de cirurgia. De acordo com outra modalidade da invenção, são fornecidos kits para detecção de câncer de próstata para diagnóstico, prognóstico ou monitoramento. Os kits incluem as proteínas de ligação ao PSMA citadas anteriormente (por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA marcados ou fragmentos de ligação ao antígeno destes), e um ou mais compostos para detecção do marcador. Em algumas modalidades, o marcador é selecionado do grupo que consiste em um marcador fluorescente, um marcador de enzima, um marcador radioativo, um marcador ativo de ressonância magnética nuclear, um marcador luminescente e um marcador de cromóforo.

[134] Uma modalidade adicional fornece uma ou mais das proteínas de ligação descritas acima, por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, embaladas em forma liofilizada, ou embaladas em um meio aquoso. Em outro aspecto da revelação, são fornecidos métodos para detecção da presença de PSMA, ou de uma célula que expressa PSMA, em uma amostra. Esses métodos incluem o contato da amostra com qualquer uma das proteínas de ligação ao PSMA citadas anteriormente (por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA ou fragmentos de ligação ao antígeno destes) que se ligam especificamente a um domínio extracelular de PSMA, por um tempo suficiente para permitir a formação de um complexo entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste e PSMA, e detecção do complexo PSMA-anticorpo ou complexo PSMA-fragmento de

ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, a presença de um complexo na amostra é indicativa da presença na amostra de PSMA ou de uma célula que expressa PSMA. Em outro aspecto, a revelação fornece outros métodos para o diagnóstico de uma doença mediada por PSMA em um indivíduo. Esses métodos incluem a administração a um indivíduo suspeito de ter ou previamente diagnosticado com uma doença mediada por PSMA de uma quantidade de qualquer uma das proteínas de ligação ao PSMA citadas anteriormente (por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA ou fragmentos de ligação ao antígeno destes) que se ligam especificamente a um domínio extracelular do antígeno de membrana específico da próstata. O método também inclui a permissão da formação de um complexo entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste e PSMA, e detecção da formação do complexo PSMA-anticorpo ou do complexo PSMA-anticorpo de fragmento de ligação ao antígeno ao epítopo-alvo. A presença de um complexo no indivíduo suspeito de ter ou previamente diagnosticado com câncer de próstata é indicativa da presença de uma doença mediada por PSMA.

[135] Em certas modalidades dos métodos, a doença mediada por PSMA é câncer de próstata. Em outras modalidades, a doença mediada por PSMA é um câncer não da próstata, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em câncer da bexiga, incluindo carcinoma de célula transicional; câncer pancreático, incluindo carcinoma do ducto pancreático; câncer de pulmão, incluindo carcinoma de pulmão de célula não pequena; câncer renal, incluindo carcinoma de célula renal convencional; sarcoma, incluindo sarcoma de tecido mole; câncer de mama, incluindo carcinoma de mama; câncer do

cérebro, incluindo glioblastoma multiforme; carcinoma neuroendócrino; câncer de cólon, incluindo carcinoma colônico; câncer testicular, incluindo carcinoma embrionário testicular; e melanoma, incluindo melanoma maligno.

[136] Em algumas modalidades dos métodos citados anteriormente, as proteínas de ligação ao PSMA (por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA ou fragmentos de ligação ao antígeno destes) são marcadas. Em outras modalidades dos métodos citados anteriormente, um segundo anticorpo é administrado para detectar o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Em um aspecto adicional da revelação, são fornecidos métodos para avaliação do prognóstico de um indivíduo com uma doença mediada por PSMA. Esses métodos incluem a administração a um indivíduo suspeito de ter ou previamente diagnosticado com uma doença mediada por PSMA de uma quantidade eficaz de qualquer uma das proteínas de ligação ao PSMA citadas anteriormente (por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA ou fragmentos de ligação ao antígeno destes), permitindo a formação de um complexo entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste e PSMA, e detecção da formação do complexo ao epítopo-alvo. A quantidade do complexo no indivíduo suspeito de ter ou previamente diagnosticado com uma doença mediada por PSMA é indicativa do prognóstico.

[137] Em outro aspecto da revelação, são fornecidos métodos para avaliação da eficácia de um tratamento de um indivíduo com uma doença mediada por PSMA. Esses métodos incluem a administração a um indivíduo que tem ou previamente diagnosticado com uma doença mediada por PSMA de uma

quantidade eficaz de qualquer uma das proteínas de ligação ao PSMA citadas anteriormente, por exemplo, anticorpos de domínio único anti-PSMA ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, permitindo a formação de um complexo entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste e PSMA, e detecção da formação do complexo ao epítopo-alvo. A quantidade do complexo no indivíduo suspeito de ter ou previamente diagnosticado com uma doença mediada por PSMA é indicativa da eficácia do tratamento. Em certas modalidades, a doença mediada por PSMA é câncer de próstata. Em outras modalidades, a doença mediada por PSMA é um câncer não da próstata. Naquelas modalidades, o câncer não da próstata preferivelmente é selecionado do grupo que consiste em câncer da bexiga, incluindo carcinoma de célula transicional; câncer pancreático, incluindo carcinoma do ducto pancreático; câncer de pulmão, incluindo carcinoma de célula não pequena; câncer renal, incluindo carcinoma de célula renal convencional; sarcoma, incluindo sarcoma de tecido mole; câncer de mama, incluindo carcinoma de mama; câncer do cérebro, incluindo glioblastoma multiforme; carcinoma neuroendócrino; câncer de cólon, incluindo carcinoma colônico; câncer testicular, incluindo carcinoma embrionário testicular; e melanoma, incluindo melanoma maligno. Ainda em outras modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste é marcado. Em modalidades adicionais, um segundo anticorpo é administrado para detectar o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste.

[138] De acordo com ainda outro aspecto da revelação, são fornecidos métodos para inibição do crescimento de uma célula

que expressa PSMA. Esses métodos incluem o contato de uma célula que expressa PSMA com uma quantidade de pelo menos um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno destes citados anteriormente que se liga especificamente a um domínio extracelular de PSMA eficaz para inibir o crescimento da célula que expressa PSMA.

EXEMPLOS

[139] Os exemplos abaixo ilustram ainda mais as modalidades descritas, sem limitação do escopo da invenção.

Exemplo 1: Geração de variantes de anticorpo de domínio anti-PSMA único com propriedades de ligação equivalentes ou aprimoradas a um anticorpo de domínio anti-PSMA único parental

Caracterização de fago anti-PSMA parental

[140] A ligação específica do fago anti-PSMA parental a um antígeno de PSMA foi determinada (**Tabela 1**)

Bibliotecas de fago de sdAb de PSMA de substituição única selecionadas em PSMA de ciano

[141] Foi fornecida uma biblioteca de substituição única para cada um dos três domínios de CDR. Bibliotecas de substituição única foram ligadas ao PSMA de *Cynomolgus* e depois lavadas em tampão por 30 minutos. Fagos ligados em 0 e 30 minutos foram resgatados e contados. Fagos selecionados usando uma lavagem de 30 minutos no tampão foram usados para criar duas bibliotecas combinatórias de fagos independentes.

Bibliotecas combinatórias anti-PSMA

[142] PSMA de *Cynomolgus* foi usado como o alvo de seleção para três rodadas de seleção. Os poços foram lavados por 2 a 4 horas após ligação combinatória de fagos de duas bibliotecas independentes por três rodadas de seleção.

Insertos PCRed da terceira rodada de seleção foram subclonados no vetor de expressão p34. Noventa e seis clones foram escolhidos, DNA foi purificado, sequenciado e transfetado em células Expi293.

Bibliotecas de fago de sdAb de PSMA de substituição única selecionadas em huPSMA

[143] Foi fornecida uma biblioteca de substituição única para cada um dos três domínios de CDR. Bibliotecas de substituição única foram ligadas ao PSMA humano e depois lavadas em tampão contendo 30 µg/ml h de PSMA-Fc por 24 horas. Fagos ligados em 0 e 24 horas foram resgatados e contados. Fagos selecionados usando a lavagem competitiva por 24 horas foram usados para criar uma biblioteca combinatória de fagos.

Bibliotecas combinatórias anti-PSMA

[144] PSMA humano foi usado como o alvo de seleção para três rodadas de seleção. Os poços foram lavados em tampão contendo 30 µg/ml - 850 µg/ml de PSMA humano-Fc por 24 - 96 horas após ligação combinatória de fagos para três rodadas de seleção. Insertos PCRed da terceira rodada de seleção foram subclonados no vetor de expressão p34. 96 clones foram escolhidos, DNA foi purificado, sequenciado e transfetado em células Expi293.

Medição da afinidade de ligação

[145] Sobrenadantes foram usados para estimar Kd, kon e koff (ou kdis) ao PSMA humano e de *Cynomolgus* usando o sistema OCTET®. Vários clones foram selecionados para caracterização adicional (**Tabela 1**), com base em suas afinidades de ligação, e constantes da taxa de associação e de dissociação para interação com PSMA humano, comparado com

o sdAb parental, bem como perfis de produção robusta, agregação e estabilidade. O sdAb parental está listado como Anti-PSMA wt sdAb.6his na Tabela 1.

Tabela 1: Afinidade de ligação (Kd) de várias proteínas de ligação ao PSMA ao PSMA humano.

	Kd (hFc.flag.hPSMA)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Anti-PSMA wt sdAb.6his	15,0 nM	8,77E+05	1,32E-02
anti-PSMA E31P sdAb.6his	9,5 nM	3,83E+05	3,66E-03
anti-PSMA T56Q sdAb.6his	5,6 nM	8,22E+05	4,61E-03
anti-PSMA G55K sdAb.6his	4,5 nM	5,56E+05	2,48E-03
anti-PSMA S33H T50D G97SsdAb.6his	6,7 nM	8,00E+05	5,38E-03
anti-PSMA S33H G97SsdAb.6his	0,21 nM	9,36E+05	1,97E-05

Exemplo 2: Métodos para avaliar da ligação e atividades citotóxicas de moléculas de ligação ao antígeno triespecíficas direcionadas ao PSMA exemplares

Produção de proteína

[146] Sequências de moléculas triespecíficas foram clonadas em vetor de expressão de mamífero pcDNA 3.4 (Invitrogen), precedidas por uma sequência-líder e seguidas por um Tag de Histidina 6x (ID. DE SEQ. Nº: 33). Células Expi293F (Life Technologies A14527) foram mantidas em suspensão em Frascos de Crescimento Optimum (Thomson) entre 0,2 até 8 x 1e6 células/ml em meio Expi293. DNA de plasmídeo purificado foi transfetado em células Expi293 de acordo com os protocolos do Kit de Sistema de Expressão Expi293 (Life Technologies, A14635), e mantido por 4-6 dias pós-transfecção. Meio condicionado foi parcialmente purificado

por cromatografia por afinidade e dessalinização. Proteínas triespecíficas foram subsequentemente polidas por troca iônica ou, alternativamente, concentradas com unidades de filtração centrífuga Amicon Ultra (EMD Millipore), aplicadas ao meio de exclusão de tamanho Superdex 200 (GE Healthcare) e resolvidas em um tampão neutro contendo excipientes. A reunião em pool das frações e a pureza final foram avaliados por SDS-PAGE e SEC analítica.

Medições de afinidade

[147] As afinidades de todas as moléculas de domínios de ligação foram medidas por inferometria de biocamada usando um instrumento Octet.

[148] As afinidades por PSMA foram medidas por carregamento de PSMA humano-proteína Fc (100 nM) sobre biossensores de Fc anti-IgG humana por 120 segundos, seguido por uma linha de base de 60 segundos, e depois as associações foram medidas por incubação da ponta do sensor em uma série de diluições das moléculas triespecíficas por 180 segundos, seguido por dissociação por 50 segundos. Afinidades por EGFR e CD3 foram medidas por carregamento de EGFR humano-proteína Fc ou CD3 humano-Flag-proteína Fc, respectivamente (100 nM) sobre biossensores de Fc anti-IgG humana por 120 segundos, seguido por uma linha de base de 60 segundos, e depois as associações foram medidas por incubação da ponta do sensor em uma série de diluições das moléculas triespecíficas por 180 segundos, seguido por dissociação por 300 segundos. Afinidades para albumina sérica humana (HSA) foram medidas por carregamento de albumina biotinilada sobre biossensores de estreptavidina, e depois seguindo os mesmos parâmetros cinéticos usados para medições de afinidade de CD3. Todas as

etapas foram realizadas a 30°C em caseína 0,25% em solução salina tamponada com fosfato.

Ensaio de citotoxicidade

[149] Um ensaio de citotoxicidade celular dependente de célula T humana (TDCC) foi usado para medir a habilidade de engajadores de célula T, incluindo moléculas triespecíficas, para direcionar células T para matar células tumorais (Nazarian e cols. 2015. *J. Biomol. Screen.* 20: 519–27). Nesse ensaio, células T e células-alvo da linhagem de célula de câncer são misturadas juntas em uma proporção de 10:1 em uma placa de 384 poços, e quantidades variáveis de engajador de célula T são adicionadas. Após 48 horas, as células T são removidas por lavagem deixando anexadas à placa células-alvo que não foram mortas pelas células T. Para quantificar as células viáveis restantes, é usado o Ensaio de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo® (Promega). Em alguns casos, as células-alvo são modificadas geneticamente para expressar luciferase. Nesses casos, a viabilidade das células-alvo é avaliada por avaliação de um ensaio de luciferase luminescente com reagente STEADYGLO® (Promega), no qual a viabilidade é diretamente proporcional à quantidade de atividade de luciferase.

Ensaio de estabilidade

[150] A estabilidade das proteínas de ligação triespecíficas foi avaliada em concentrações baixas na presença de soro de primata não humano. TriTACs foram diluídas até 33 µg/ml em soro de *Cynomolgus* (BioReclamationIVT) e incubadas por 2 d a 37°C ou submetidas a cinco ciclos de congelamento/descongelamento. Após o tratamento, as amostras foram avaliadas em ensaios de

citotoxicidade (TDCC) e sua atividade restante foi comparada com soluções de estoque não tratadas.

Ensaios de xenoenxerto

[151] A eficácia *in vivo* de proteínas de ligação triespecíficas foi avaliada em experimentos de xenoenxerto (Crown Bioscience, Taicang). Camundongos NOD/SCID deficientes na cadeia gama comum (NCG, "Model Animal Research Center of Nanjing University") foram inoculados no dia 0 com uma mistura de 5e6 células de câncer de próstata humano 22Rv1 e 5e6 células T humanas em repouso, que foram isoladas de um doador humano saudável. Os camundongos foram randomizados em três grupos, e tratados com veículo, 0,5 mg/kg de PSMA TritAC C324 ou 0,5 mg/kg de PSMA BiTE. Os tratamentos foram administrados diariamente por 10 dias por meio de injeção i.v. em bolo. Os animais foram verificados diariamente quanto à morbidade e mortalidade. Os volumes dos tumores foram determinados duas vezes por semana com um compasso de calibre. O estudo foi terminado após 30 dias.

Ensaios de PK

[152] O objetivo desse estudo foi avaliar a farmacocinética de dose única de proteínas de ligação triespecíficas após injeção intravenosa. Dois macacos *Cynomolgus* experimentalmente virgens por grupo (1 macho e 1 fêmea) receberam composto por meio de uma injeção IV em bolo lenta administrada ao longo de aproximadamente 1 minuto. Após administração da dose, foram feitas observações na lateral da gaiola uma vez por dia e os pesos corporais foram registrados semanalmente. Amostras de sangue foram coletadas e processadas até soro para análise farmacocinética por 21 dias pós-administração da dose.

[153] As concentrações de artigos de teste foram determinadas do soro de macaco com uma leitura eletroluminescente (Meso Scale Diagnostics, Rockville). Placas de 96 poços com CD3 recombinante, imobilizado, foram usadas para capturar o analito. A detecção foi realizada com PSMA recombinante, marcado com sulfo, em uma leitora MSD de acordo com as instruções do fabricante.

Exemplo 3: Avaliação do impacto da afinidade por CD3 on as propriedades de moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA exemplares

[154] Moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA com domínios de ligação ao CD3 distintos foram estudadas para demonstrar os efeitos da alteração da afinidade por CD3. Uma molécula triespecífica direcionada ao PSMA exemplar é ilustrada na Figura 1. A Tabela 2 lista a afinidade de cada molécula para os três parceiros de ligação (PSMA, CD3, HSA). As afinidades foram medidas por interferometria de biocamada usando um instrumento Octet (Pall Forté Bio). Afinidade por CD3 reduzida leva a uma perda na potência em termos de toxicidade celular mediada por célula T (Figuras 2A-C). As propriedades farmacocinéticas dessas moléculas triespecíficas foram avaliadas em macacos *Cynomolgus*. Moléculas com afinidade por CD3 elevada como TriTAC C236 possuem uma meia-vida terminal de aproximadamente 90 h (Figura 3). Apesar da habilidade alterada para ligar CD3 em células T, a meia-vida terminal de duas moléculas com afinidades por CD3 diferentes mostradas na Figura 4 é muito similar. No entanto, a afinidade por CD3 reduzida parece levar a um volume de distribuição maior, o que é consistente com sequestração reduzida da molécula triespecífica por

células T. Não houve observações clínicas adversas ou alterações do peso corporal observadas durante o período de estudo.

Tabela 2: Afinidades de ligação para antígenos humanos e de *Cynomolgus*.

	Valor da K _D Anti-PSMA (nM)			Valor da K _D Anti-albumina (nM)			Valor da K _D Anti-CD3e (nM)		
	Hu- mano	Cino	Propor- ção cino/ hu- mano	pHSA	CSA	Pro- porçã o cino/ Huma- no	Hu- mano	Cino	Propor- ção cino/ humano
Ferramenta TriTAC alta afinidade - C236	16,3	0	0	22,7	25,4	1,1	6,0	4,7	0,8
TriTAC CD3 alta afinidade - C324	17,9	0	0	9,8	9,7	1	7,4	5,8	0,8
TriTAC CD3 afinidade média - C339	13,6	0	0	8,8	8,3	0,9	40,6	33,6	0,8
TriTAC CD3 afinidade baixa - C325	15,3	0	0	10,1	9,7	1	217	160	0,7

Exemplo 4: Avaliação do impacto da afinidade por PSMA sobre as propriedades de moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA exemplares

[155] Moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA com domínios de ligação ao PSMA distintos foram estudadas para demonstrar os efeitos da alteração da afinidade por PSMA. A Tabela 3 lista a afinidade de cada molécula para os três parceiros de ligação (PSMA, CD3, HSA). Afinidade por PSMA reduzida leva a uma perda na potência em termos de toxicidade celular mediada por célula T (Figuras 5A-C).

Tabela 3: Afinidades de ligação para antígenos humanos e de

Cynomolgus.

	Valor da K_D Anti-PSMA (nM)			Valor da K_D Anti-albumina (nM)			Valor da K_D Anti-CD3e (nM)		
	Huma -no	Cin o	Propor -ção cino/ humano	pHS A	CSA	Propor -ção cino/ humano	Huma -no	Cino	Propor -ção cino/ humano
PSMA- TriTAC (p8)- C362	22,0	0	n/a	6,6	6,6	1,0	8,3	4,3	0,52
PSMA TriTAC (HDS)- C363	3,7	540	146	7,6	8,4	1,1	8,0	5,2	0,65
PSMA TriTAC (HTS)- C364	0,15	663	4423	8,4	8,6	1,0	7,7	3,8	0,49

Exemplo 5: Eficácia *in vivo* de moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA exemplares

[156] A molécula triespecífica direcionada ao PSMA exemplar C324 foi avaliada quanto à sua habilidade para inibir o crescimento de tumores em camundongos. Para esse experimento, camundongos imunocomprometidos reconstituídos com células T humanas foram inoculados por via subcutânea com células de tumores humanos da próstata que expressam PSMA (22Rv1) e tratados diariamente por 10 dias com 0,5 mg/kg i.v. de moléculas direcionada ao PSMA BiTE ou TriTAC. O crescimento do tumor foi medido por 30 dias. Ao longo da evolução do experimento, a molécula triespecífica foi capaz de inibir o crescimento tumoral com uma eficácia comparável a uma molécula BiTE (Figura 6).

Exemplo 6: Especificidade de moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA exemplares

[157] A fim de avaliar a especificidade de moléculas TriTAC direcionadas ao PSMA, sua habilidade para induzir que células T matem células tumorais foi testada com células

tumorais que são negativas para PSMA (Figura 7A). Uma molécula TriTAC direcionada ao EGFR serviu como controle positivo, uma molécula TriTAC direcionada à GFP como controle negativo. Todas as três TriTACs com domínios de ligação ao PSMA distintos mostraram a atividade esperada contra a linhagem de célula PSMA-positiva LNCaP (Figura 7B), mas não alcançaram EC50s nas linhagens de células tumorais PSMA-negativas KMS12BM e OVCAR8 (Figuras 7C e 7D). As EC50s estão resumidas na Tabela 4. Em concentrações de TriTAC muito elevadas ($> 1 \text{ nM}$), alguma morte fora da célula-alvo limitada podia ser observada para TriTACs C362 e C363, enquanto C364 não mostrou morte de células significante sob qualquer uma das condições testadas.

Tabela 4: Atividade de morte de células de moléculas TriTAC em com linhagens de células tumorais antígeno-positivas e antígeno-negativas (EC50 [pM]).

TriTAC	LNCaP	KMS12BM	OVCAR8
PSMA p8 TriTAC C362	13,0	>10.000	>10.000
PSMA HDS TriTAC C363	6,2	>10.000	>10.000
PSMA HTS TriTAC C364	0,8	>10.000	>10.000
EGFR TriTAC C131	9,4	>10.000	6
GFP TriTAC C	>10.000	>10.000	>10.000

Exemplo 7: Testes de estresse e estabilidade da proteína

[158] Quatro moléculas triespecíficas direcionadas ao PSMA foram incubadas por 48 h em soro de *Cynomolgus* em concentrações baixas (33,3 $\mu\text{g/ml}$) ou submetidas a cinco ciclos de congelamento/descongelamento em soro de *Cynomolgus*. Após o tratamento, a bioatividade das moléculas TriTAC foi avaliada em ensaios de morte de células e comparada com amostras não estressadas ("controle positivo", Figura 8A-D). Todas as moléculas mantiveram a maior parte de sua atividade de morte de células. TriTAC C362 foi a mais

resistente ao estresse e não pareceu perder qualquer atividade sob as condições testadas aqui.

Exemplo 8: Modelo de tumor de xenoenxerto

[159] Uma proteína triespecífica direcionada ao PSMA exemplar é avaliada em um modelo de xenoenxerto.

[160] Machos de camundongos NCG imunodeficientes são inoculados por via subcutânea com 5×10^6 células 22Rv1 no seu flanco dorsal direito. Quando os tumores alcançam 100 a 200 mm^3 , os animais são alocados em 3 grupos de tratamento. Grupos 2 e 3 (8 animais cada) são injetados por via intraperitoneal com $1,5 \times 10^7$ células T humanas ativadas. Três dias mais tarde, animais do Grupo 3 são subsequentemente tratados com um total de 9 doses intravenosas de 50 µg da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar dessa revelação (qdx9d). Grupos 1 e 2 são tratados apenas com veículo. Peso corporal e volume do tumor são determinados por 30 dias. Espera-se que o crescimento tumoral em camundongos tratados com a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA seja significantemente reduzido em comparação com o crescimento tumoral no respectivo grupo de controle tratado com veículo.

Exemplo 9: Protocolo do experimento clínico de prova-de-conceito para administração de uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar a pacientes com câncer de próstata

[161] Esse é um experimento clínico de Fase I/II para estudo da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA do Exemplo 1 como um tratamento para câncer de próstata.

[162] Resultados finais do estudo:

[163] *Primários:* Dose máxima tolerada de proteínas

triespecíficas direcionadas ao PSMA dos exemplos prévios

[164] *Secundários:* Determinar se a resposta *in vitro* de proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA dos exemplos prévios está associada com resposta clínica

Fase I

[165] A dose máxima tolerada (MTD) será determinada na seção da Fase I do experimento.

1.1 A dose máxima tolerada (MTD) será determinada na seção da Fase I do experimento.

1.2 Pacientes que preenchem os critérios de elegibilidade serão incluídos no experimento para proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA dos exemplos prévios.

1.3 O objetivo é identificar a maior dose de proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA dos exemplos prévios que pode ser administrada com segurança sem efeitos colaterais severos ou não gerenciáveis nos participantes. A dose dada dependerá do número de participantes que foram incluídos no estudo antes e quanto bem a dose foi tolerada. Nem todos os participantes receberão a mesma dose.

Fase II

[166] 2.1 Uma seção de Fase II subsequente será tratada na MTD com o objetivo de determinar se a terapia com terapia as proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA dos exemplos prévios resulta em uma taxa de resposta de pelo menos 20%.

Resultado final primário para a Fase II – Determinar se a terapia com proteínas triespecíficas direcionadas ao PSMA dos exemplos prévios resulta em pelo menos 20% de pacientes obtendo uma resposta clínica (resposta explosiva, resposta menor, resposta parcial ou resposta completa).

Eligibilidade:

[167] Câncer de próstata agressivo recém diagnosticado histologicamente confirmado de acordo com a classificação atual da Organização Mundial de Saúde, de 2001 a 2007

Estágio final de doença.

Tratamento com docetaxel e prednisona (+/- cirurgia).

Idade \geq 18 anos

Estado de desempenho de Karnofsky \geq 50% ou estado de desempenho ECOG 0-2

Expectativa de vida \geq 6 semanas

Exemplo 10: Atividade de uma proteína de ligação ao antígeno de PSMA exemplar (molécula TriTAC direcionada ao PSMA) nos ensaios de morte por célula T redirecionada usando um painel de linhagens de células que expressam PSMA e células T de doadores diferentes

[168] Esse estudo foi realizado para demonstrar que a atividade da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar não está limitada às células LNCaP ou a um único doador de células.

[169] Ensaios de morte por célula T redirecionada foram realizados usando células T de quatro doadores diferente e as linhagens de células de câncer de próstata que expressam PSMA humano VCaP, LNCaP, MDAPCa2b e 22Rv1. Com uma exceção, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA foi capaz de dirigir a morte dessas linhagens de células de câncer usando células T de todos os doadores com valores de EC50 de 0,2 até 1,5 pM, como mostrado na Tabela 5. Com a linhagem de célula de câncer de próstata 22 Rv1 e Doador 24, pouca a nenhuma morte foi observada (dados não mostrados). Doador 24 também só resultou em aproximadamente 50% de morte

da linhagem de célula MDAPCa2b, enquanto células T dos outros 3 doadores resultaram em morte quase completa dessa linhagem de célula (dados não mostrados). Ensaios de controle demonstraram que a morte pela proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA era PSMA-específica. Nenhuma morte foi observada quando células que expressam PSMA foram tratadas com uma proteína triespecífica de controle direcionada à proteína fluorescente verde (GFP) ao invés de PSMA (dados não mostrados). Similarmente, a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA foi inativa com linhagens de células que não possuem expressão de PSMA, NCI-1563 e HCT116, também mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de EC₅₀ de ensaios de TDCC com seis linhagens de célula de câncer humano e quatro doadores de células T diferentes.

Linhagem celular	Valores de EC₅₀ de TDCC (M)			
	Doador 24	Doador 8144	Doador 72	Doador 41
LNCaP	1,5E-12	2,2E-13	3,6E-13	4,3E-13
MDAPCa2b	4,8E-12	4,1E-13	4,9E-13	6,5E-13
VCaP	6,4E-13	1,6E-13	2,0E-13	3,5E-13
22Rv1	n/a	7,2E-13	1,4E-12	1,3E-12
HCT116	>1,0E-8	>1,0E-8	>1,0E-8	>1,0E-8
NCI-1563	>1,0E-8	>1,0E-8	>1,0E-8	>1,0E-8

Exemplo 11: Estimulação de expressão de citocina por uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar (molécula TriTAC direcionada ao PSMA) nos ensaios de morte por célula T redirecionada

[170] Esse estudo foi realizado para demonstrar a ativação de células T pela proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar durante ensaios de morte por célula T redirecionada por medição da secreção de citocina no meio de ensaio por células T ativadas.

[171] Meios condicionados coletados de ensaios de morte por célula T redirecionada, como descrito acima no Exemplo 9, foram analisados quanto à expressão das citocinas TNF α e IFN γ . As citocinas foram medidas usando ensaios AlphaLISA (Perkin-Elmer). A adição de uma titulação da proteína de ligação ao antígeno de PSMA às células T de quatro doadores diferentes e quatro linhagens de células que expressam PSMA, LNCaP, VCaP, MDAPCa2b e 22Rv1, resultou em níveis aumentados de TNF α . Os resultados para os níveis de expressão de TNF α e de expressão de IFN γ nos meios condicionados são mostrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os valores de EC₅₀ para a expressão induzida pela proteína de ligação ao antígeno de PSMA dessas citocinas variaram de 3 a 15 pM. Níveis de citocina aumentados não foram observados com uma proteína triespecífica de controle direcionada à GFP. Similarmente, quando os ensaios foram realizados com duas linhagens de células que são apresentam expressão de PSMA, HCT116 e NCI-H1563, PSMA HTS TriTAC também não aumentou a expressão de TNF α ou IFN γ .

Tabela 6: Valores de EC₅₀ para expressão de TNF α em meios de ensaios de TDCC de proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA com seis linhagens de célula de câncer humano e células T de quatro doadores diferentes.

Linhagem celular	Doador 24	Doador 8144	Doador 41	Doador 72
LNCaP	4,9E-12	2,8E-12	4,0E-12	3,2E-12
VCaP	3,2E-12	2,9E-12	2,9E-12	2,9E-12
MDAPCa2b	2,1E-11	4,0E-12	5,5E-12	3,6E-12
22Rv1	8,9E-12	2,5E-12	4,0E-12	3,3E-12
HCT116	>1E-8	>1E-8	>1E-8	>1E-8
NCI-H1563	>1E-8	>1E-8	>1E-8	>1E-8

Tabela 7: Valores de EC₅₀ para expressão de IFN γ em meios de

ensaios de TDCC de proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA com seis linhagens de célula de câncer humano e células T de quatro doadores diferentes.

Linhagem celular	Doador 24	Doador 8144	Doador 41	Doador 72
LNCaP	4,2E-12	4,2E-12	4,2E-12	2,8E-12
VCaP	5,1E-12	1,5E-11	3,4E-12	4,9E-12
MDAPCa2b	1,5E-11	5,8E-12	9,7E-12	3,5E-12
22Rv1	7,8E-12	3,0E-12	9,1E-12	3,0E-12
HCT116	>1E-8	>1E-8	>1E-8	>1E-8
NCI-H1563	>1E-8	>1E-8	>1E-8	>1E-8

Exemplo 12: Atividade de uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar (TriTAC direcionada ao PSMA) no ensaio de morte por célula T redirecionada (TDCC) usando células T de macacos Cynomolgus

[172] Esse estudo foi realizado para testar a habilidade da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar para dirigir células T de macacos *Cynomolgus* para matar linhagens de células que expressam PSMA.

[173] Os ensaios de TDCC foram configurados usando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de macacos *Cynomolgus*. PBMCs de cinco foram adicionadas às células LNCaP em uma proporção de 10:1. Foi observado que a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA redirecionou a morte de LNCaP pelas PBMCs de cinco com um valor de EC₅₀ de 11 pM. O resultado é mostrado na Figura 9A. Para confirmar esses resultados, uma segunda linhagem de célula foi usada, MDAPCa2b, e PBMCs de um segundo macaco *Cynomolgus* doador foram testadas. A morte redirecionada das células-alvo foi observada com um valor de EC₅₀ de 2,2 pM. O resultado é mostrado na Figura 9B. A morte era específica para o braço anti-PSMA da proteína de ligação ao antígeno

triespecífica para PSMA, na medida em que não foi observada morte com uma proteína triespecífica direcionada à GFP de controle negativo. Esses dados demonstram que a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA pode direcionar células T de *Cynomolgus* para matar células-alvo que expressam PSMA humano.

Exemplo 13: Expressão de marcadores de ativação de célula T nos ensaios de morte por célula T redirecionada com uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar (molécula TriTAC direcionada ao PSMA)

[174] Esse estudo foi realizado para avaliar se células T eram ativadas quando a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar direcionava as células T para matar células-alvo.

[175] Os ensaios foram configurados usando condições para os ensaios de morte por células T redirecionadas descritos no exemplo acima. A ativação de célula T foi avaliada por medição da expressão de CD25 e CD69 na superfície das células T usando citometria de fluxo. A proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA foi adicionada a uma mistura 10:1 de células T humanas purificadas e a linhagem de célula de câncer de próstata VCaP. Mediante adição de quantidades crescentes da proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA, foram observadas expressão aumentada de CD69 e expressão de CD25, como mostrado na Figura 10. O valor de EC₅₀ foi de 0,3 pM para CD69 e 0,2 pM para CD25. Uma proteína triespecífica direcionada à GFP foi incluída nesses ensaios como controle negativo, e pouco ou nenhum aumento na expressão de CD69 ou CD25 é observado com a proteína triespecífica direcionada à GFP, também mostrado na Figura

10.

Exemplo 14: Estimulação da proliferação de células T por uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar (molécula TriTAC direcionada ao PSMA) na presença de células-alvo que expressam PSMA

[176] Esse estudo foi usado como um método adicional para demonstrar que a proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar era capaz de ativar células T quando ela as redireciona para matar células-alvo.

[177] Os ensaios de proliferação de células T foram configurados usando as condições do ensaio de morte por célula T redirecionada usando como células-alvo LNCaP, como descrito acima, e medindo o número de células T presentes em 72 horas. A proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar estimulou na proliferação com um valor de EC₅₀ de 0,5 pM. Como controle negativo, uma proteína triespecífica direcionada à GFP foi incluída no ensaio, e nenhuma proliferação aumentada foi observada com essa proteína. Os resultados para o ensaio de proliferação de células T estão ilustrados na Figura 11.

Exemplo 15: Morte por célula T redirecionada de células LNCaP por proteínas de ligação ao antígeno triespecíficas para PSMA exemplares (molécula TriTAC direcionada ao PSMA Z2)

[178] Esse estudo foi realizado para testar a habilidade de uma proteína de ligação ao antígeno triespecífica para PSMA exemplar, que possui a sequência como apresentada nos IDS. DE SEQ. N°s: 156, para redirecionar células T para matar a linhagem de célula LNCaP.

[179] Em ensaios de TDCC, configurados como descrito nos exemplos acima, a proteína PSMA Z2 TriTAC (ID. DE SEQ. N°:

156) direcionou a morte com um valor de EC₅₀ de 0,8 pM, como mostrado na Figura 12.

Tabela 8

<u>IDS. DE SEQ. N°s</u>	<u>Sequência</u>
ID. DE SEQ. N°: 1	RFMISX ₁ YX ₂ MH
ID. DE SEQ. N°: 2	X ₃ INPAX ₄ X ₅ TDYAE ₆ VKG
ID. DE SEQ. N°: 3	DX ₇ YGY
ID. DE SEQ. N°: 4	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA S RFMISEY S MHWV RQAPGKGLEWV S TINPAGTTDYAE S VKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
ID. DE SEQ. N°: 5	RFMISEYHMH
ID. DE SEQ. N°: 6	RFMISPYSMH
ID. DE SEQ. N°: 7	RFMISPYHMH
ID. DE SEQ. N°: 8	DINPAGTTDYAESVKG
ID. DE SEQ. N°: 9	TINPAKTTDYAESVKG
ID. DE SEQ. N°: 10	TINPAGQTDYAESVKG
ID. DE SEQ. N°: 11	TINPAGTTDYAEYVKG
ID. DE SEQ. N°: 12	DINPAKTTDYAESVKG
ID. DE SEQ. N°: 13	DINPAGQTDYAESVKG
ID. DE SEQ. N°: 14	DINPAGTTDYAEYVKG
ID. DE SEQ. N°: 15	DSYGY
ID. DE SEQ. N°: 16	RFMISEYSMH
ID. DE SEQ. N°: 17	TINPAGTTDYAESVKG
ID. DE SEQ. N°: 18	DGYGY
ID. DE SEQ. N°: 19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWV RQAPGKGLEWV S TINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTIVTVSS
ID. DE SEQ. N°: 20	MWNLLHETDSAVATARPRWLCA G ALVLAGGFFLLGF LFGWF I KSSNEATNITPKHNMKAF L DELKAENIKKFL YNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQS Q WKEFGLDSVELA HYDVLLSYPNKTHPNYISI I INEDGNEIFNTSLFE PP PGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDF FKLERDMKINC S GKIVIARYGKVFRGNKVKAQLAGA KG V ILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLP GG VQRGNIL NLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHP IGYYDAQKLLEKM G GSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPGF TGNFSTQKV K MHI H STNEVTRIY N VI G TLRGAVEPDR YVILGGHRDSWVF G GI D PQSGAAVVHEIVRS F GT L KK EGWRPRRTILFASWDAEEF G LLG S TEWAEENS R LQ E RGVAYINADSSIE G NYTLRV D C T PLMYSLVHNLT K EL KSPDEGFEGKSLYESWT K KSPSPEFSGMPRI S KL G SG

	NDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSV YETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIV LPFDICRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTVSF DSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMND QLMFLERAFIGDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGE SFPGIYDALFDIESKVDP SKAWGEVKRQIYVAAFTVQ AAAETLSEVA
ID. DE SEQ. N°: 21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSDINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWV RQAPGKGLEWVSTINPAKTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISPYSMWV RQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMWV RQAPGKGLEWVSTINPAGQTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMWV RQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAEYVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSDINPAKTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISPYSMWV RQAPGKGLEWVSDINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSDINPAGQTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSDINPAGTTDYAEYVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDSYGYRGQGT LTVSS
ID. DE SEQ. N°: 31	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSDINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRGQGT QVTVSS
ID. DE SEQ. N°: 32	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYHMHWV RQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRGQGT QVTVSS

Tabela 9: Sequências do domínio de ligação ao CD3.

<u>ID. DE SEQ. N°:</u>	<u>Descrição</u>	<u>Sequência de AA</u>
34	Anti-CD3, clone 2B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF TFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSY ISYWAWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC ASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG TKLTVL
35	Anti-CD3, clone 9F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF EFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNKYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSFGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCWLWYDNRWVFGGG TKLTVL
36	Anti-CD3, clone 5A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF TFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSH ISYWAWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSTGYVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTSLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWIFGGGG TKLTVL
37	Anti-CD3, clone 6A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF MFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK SNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWATWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSFGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCWLWYSNSWVFGGG TKLTVL

38	Anti-CD3, clone 2D2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCHAASGF TFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYKDSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSP ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVVSGNYPNWWQQKPGQAPRGL IGGTTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
39	Anti-CD3, clone 3F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCHAASGF TYNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADEVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSP ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGL IGGTKEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
40	Anti-CD3, clone 1A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCHAASGN TFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYETYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHTNFGNSY ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGYYPNWWQQKPGQAPRGL IGGYFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
41	Anti-CD3, clone 1C2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCHAASGF TFNNYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADAVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSQ ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTDGNYPNWWQQKPGQAPRGL IGGIKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
42	Anti-CD3, clone 2E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCHAASGF TFNKYAVNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY

		ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GESTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKILAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
43	Anti-CD3, clone 10E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYPMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKNEDTAVYYCVRHGNFNNSY ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GSSTGAVTKGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKMLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGG TKLTVL
44	Anti-CD3, clone 2H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNGYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADEVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSP ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GSSTGAVVSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
45	Anti-CD3, clone 2A4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGN TFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGDSY ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GSSTGAVTHGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKVLAGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL
46	Anti-CD3, clone 10B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNNYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSG YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GSYTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFNAPGTPARFSGSLLGGKAALT

		LSGVQPEDEAEYYCVLWYANRWFVGGG TKLTVL
47	Anti-CD3, clone 1G4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAACASGF EFNKYAMNWRQAPGKGLEVARIRSK YNNYETYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSL ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWFVGGG TKLTVL
48	anti-CD3 wt	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAACASGF TFNKYAMNWRQAPGKGLEVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVHQEPQLTVSPGGTVLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWFVGGG TKLTVL
49	anti-CD3 wt HC CDR1	GFTFNKYAMN
50	anti-CD3 wt HC CDR2	RIRSKYNYYATYYADSVK
51	anti-CD3 wt HC CDR3	HGNFGNSYISYWAY
53	anti-CD3 wt LC CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
54	anti-CD3 wt LC CDR2	GTKFLAP
55	anti-CD3 wt LC CDR3	VLWYSNRWV
56	HC CDR1 variante 1	GNTFNKYAMN
57	HC CDR1 variante 2	GFEFNKYAMN
58	HC CDR1 variante 3	GFMFNKYAMN
59	HC CDR1 variante 4	GFTYNKYAMN
60	HC CDR1 variante 5	GFTFNNYAMN
61	HC CDR1 variante 6	GFTFNGYAMN
62	HC CDR1 variante 7	GFTFNTYAMN
63	HC CDR1 variante 8	GFTFNEYAMN
64	HC CDR1 variante 9	GFTFNKYPMN
65	HC CDR1 variante 10	GFTFNKYAVN
66	HC CDR1 variante 11	GFTFNKYAIN
67	HC CDR1 variante 12	GFTFNKYALN
68	HC CDR2 variante 1	RIRSGYNYYATYYADSVK
69	HC CDR2 variante 2	RIRSKSNYYATYYADSVK
70	HC CDR2 variante 3	RIRSKYNKYATYYADSVK

71	HC CDR2 variante 4	RIRSKNNYETYYADSVK
72	HC CDR2 variante 5	RIRSKNNYATEYADSVK
73	HC CDR2 variante 6	RIRSKNNYATYYKDSVK
74	HC CDR2 variante 7	RIRSKNNYATYYADEVK
75	HC CDR2 variante 8	RIRSKNNYATYYADAVK
76	HC CDR2 variante 9	RIRSKNNYATYYADQVK
77	HC CDR2 variante 10	RIRSKNNYATYYADDVK
78	HC CDR3 variante 1	HANFGNSYISYWAY
79	HC CDR3 variante 2	HTNFGNSYISYWAY
80	HC CDR3 variante 3	HGNFNNSYISYWAY
81	HC CDR3 variante 4	HGNFGDSYISYWAY
82	HC CDR3 variante 5	HGNFGNHSIISYWAY
83	HC CDR3 variante 6	HGNFGNISPISYWAY
84	HC CDR3 variante 7	HGNFGNSQISYWAY
85	HC CDR3 variante 8	HGNFGNSLISYWAY
86	HC CDR3 variante 9	HGNFGNSGISYWAY
87	HC CDR3 variante 10	HGNFGNSYISYWAT
88	LC CDR1 variante 1	ASSTGAVTSGNYPN
89	LC CDR1 variante 2	GESTGAVTSGNYPN
90	LC CDR1 variante 3	GSYTGAVTSGNYPN
91	LC CDR1 variante 4	GSSFGAVTSGNYPN
92	LC CDR1 variante 5	GSSKGAVTSGNYPN
93	LC CDR1 variante 6	GSSSGAVTSGNYPN
94	LC CDR1 variante 7	GSSTGYVTSGNYPN
95	LC CDR1 variante 8	GSSTGAVVSGNYPN
96	LC CDR1 variante 9	GSSTGAVTDGNYPN
97	LC CDR1 variante 10	GSSTGAVTKGNYPN
98	LC CDR1 variante 11	GSSTGAVTHGNYPN
99	LC CDR1 variante 12	GSSTGAVTVGNYPN
100	LC CDR1 variante 13	GSSTGAVTSGYYPN
101	LC CDR2 variante 1	GIKFLAP
102	LC CDR2 variante 2	GTEFLAP
103	LC CDR2 variante 3	GTYFLAP
104	LC CDR2 variante 4	GTSFLAP
105	LC CDR2 variante 5	GTNFLAP
106	LC CDR2 variante 6	GTKLLAP
107	LC CDR2 variante 7	GTKELAP
108	LC CDR2 variante 8	GTKILAP
109	LC CDR2 variante 9	GTKMLAP
110	LC CDR2 variante 10	GTKVLAP
111	LC CDR2 variante 11	GTKFNAP
112	LC CDR2 variante 12	GTKFGAP
113	LC CDR2 variante 13	GTKFLVP

114	LC CDR3 variante 1	TLWYSNRWV
115	LC CDR3 variante 2	ALWYSNRWV
116	LC CDR3 variante 3	VLWYDNRWV
117	LC CDR3 variante 4	VLWYANRWV
118	LC CDR3 variante 5	VLWYSNSWV
119	LC CDR3 variante 6	VLWYSNRWI
120	LC CDR3 variante 7	VLWYSNRWA
121	Anti-CD3, clone 2G5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF TFNKYALNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATEYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSP ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPESTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTNFLAPGTPERFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWAFGGG TKLTVL
122	Anti-CD3, clone 8A5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF TFNEYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADDVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSG ISYWAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPESTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTVGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWVFGGG TKLTVL

Tabela 10: Sequências do domínio de ligação à HSA.

<u>ID. DE SEQ. N°:</u>	<u>Descrição</u>	<u>Sequência de AA</u>
123	Anti-HSA sdAb clone 6C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SRFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSS
124	Anti-HSA sdAb clone 7A	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGADT LYADSLKGRFTISRDNNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSKSSQGTLTVSS
125	Anti-HSA sdAb clone 7G	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTY SSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSKSSQGTLTVSS

126	Anti-HSA sdAb clone 8H	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGTDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
127	Anti-HSA sdAb clone 9A	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SRFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSKSSQGTLVTVSS
128	Anti-HSA sdAb clone 10G	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGRDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS
129	wt anti-HSA	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SSFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
130	wt anti-HSA CDR1	GFTFSSFGMS
131	wt anti-HSA CDR2	SISGSGSDTLYADSVK
132	wt anti-HSACDR3	GGSLSR
133	CDR1 variante 1	GFTFSRGFGMS
134	CDR1 variante 2	GFTFSKFGMS
135	CDR1 variante 3	GFTYSSFGMS
136	CDR2 variante 1	SISGSGADTLYADSLK
137	CDR2 variante 2	SISGSGTDTLYADSVK
138	CDR2 variante 3	SISGSGRDTLYADSVK
139	CDR2 variante 4	SISGSGSDTLYAESVK
140	CDR2 variante 5	SISGSGTDTLYAESVK
141	CDR2 variante 6	SISGSGRDTLYAESVK
142	CDR3 variante 1	GGSLSK
143	CDR3 variante 2	GGSLSV
144	Anti-HSA sdAb clone 6CE	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SRFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGSDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
145	Anti-HSA sdAb clone 8HE	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGTDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
146	Anti-HSA sdAb clone 10GE	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGRDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS

Tabela 11: Sequências da proteína triespecífica direcionada

ao PSMA.

ID. DE SEQ. Nº:	Número -C	Construção	Sequência
147	C00324	PSMA TriTAC CD3 alta afinidade	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSAASRFM ISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIGGSLSV SSQGTLVTVSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD QVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAWGQGTL VTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
148	C00339	PSMA TriTAC CD3 afinidade média	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSAASRFM ISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIGGSLSV SSQGTLVTVSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSAASGFTFNNYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSGYNYATYYAD SVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAWGQGTL VTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLCGSYTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFNAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYANRWVFGGGTKLTVLHHHHHH

ID. DE SEQ. Nº:	Número -C	Construção	Sequência
149	C00325	PSMA TriTAC CD3 afinidade baixa	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSAASRFM ISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIGGSLV SSQGTLTVSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFEFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYETYYAD SVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSLISYWAYWGQTL VTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGKFGAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
150	C00236	Ferramenta PSMA TriTAC	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSAASRFM ISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIGGSLR SSQGTLTVSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTL VTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH

ID. DE SEQ. Nº:	Número -C	Construção	Sequência
151	C00362	PSMA p8 TriTAC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFM ISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTIVTSSG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV SSQGTIVTSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD QVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQTL VTVSSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTILTCASSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTTKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
152	C00363	PSMA HDS TriTAC C363	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFM ISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSDINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCDSYGYRGQGTQVTVSSG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV SSQGTIVTSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD QVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQTL VTVSSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTILTCASSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTTKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH

ID. DE SEQ. Nº:	Número -C	Construção	Sequência
153	C00364	PSMA HTS TriTAC C364	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSAASRFM ISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCDSYGYRGQGTQVTVSSG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV SSQGTLTVSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD QVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTL VTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTTKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
154	C00298	PSMA BiTE	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFT FSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIIISDGYY YTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNN SLKAEDTAVYYCARGFPLLHGAMDYWG QGTLTVSSGGGSGGGSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVDTN VAWYQQKPGQAPKSLIYSASYRYSDVPS RFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFAVYYC QQYDSYPYTFGGGTKLEIKSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNK YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY TYYADSVK _D RFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGTLTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTV VTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTTKFLAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH

ID. DE SEQ. N°:	Número -C	Construção	Sequência
155	C00131	EGFR TriTAC	<p>QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREVFSGISWRGD STGYADSVKGRTFISRDNNAKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYD YWQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVK_DRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS YISYWAYWGQGTIVTSSGGGGGGGG GGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLHHHHHH</p>
156	C00410	PSMA Z2 TriTAC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SRFM ISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGT TDYAESVKGRTFISRDNNAKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCDSYGYRGQGTIVTSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRTLYADSVKGRTFISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV SSQGTLTVSSGGGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD QVK_DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTI VTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPN WWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTIVLHHHHHH</p>

Tabela 12: Sequências framework exemplares.

ID. DE SEQ. N°:	Descrição	Sequência
165	Framework (f1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA

166	<i>Framework (f2)</i>	WVRQAPGKGLEWS
167	<i>Framework (f3)</i>	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
168	<i>Framework (f4)</i>	DGYGYRGQGTLVTVSS

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, **caracterizada** por compreender regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

(a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em RFMISX₁YX₂MH (ID. DE SEQ. N°: 1);

(b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG (ID. DE SEQ. N°: 2); e

(c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em DX₇YGY (ID. DE SEQ. N°: 3).

2. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a referida proteína compreende a seguinte fórmula:

$$f_1-r_1-f_2-r_2-f_3-r_3-f_4$$

em que, r₁ é o ID. DE SEQ. N°: 1; r₂ é o ID. DE SEQ. N°: 2; e r₃ é o ID. DE SEQ. N°: 3; e em que f₁, f₂, f₃ e f₄ são resíduos estruturais selecionados de modo que a referida proteína seja pelo menos oitenta por cento idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

3. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que X₁ é prolina.

4. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que X₂ é histidina.

5. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que X₃ é ácido aspártico.

6. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que X₄ é lisina.

7. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que X₅ é glutamina.

8. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que X₆ é tirosina.

9. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que X₇ é serina.

10. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4.

11. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₁ é prolina.

12. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₅ é glutamina.

13. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₆ é

tirosina.

14. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₄ é lisina e X₇ é serina.

15. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₄ é lisina e X₇ é serina.

16. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₁ é prolina, X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina.

17. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₅ é glutamina e X₇ é serina.

18. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico, X₆ é tirosina e X₇ é serina.

19. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₂ é histidina e X₇ é serina.

20. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que X₂ é histidina, X₃ é ácido aspártico e X₇ é serina.

21. Proteína de ligação ao antígeno de membrana

específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 20, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

22. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação ainda possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

23. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizada pelo fato de que r1 compreende o ID. DE SEQ. N°: 5, ID. DE SEQ. N°: 6 ou ID. DE SEQ. N°: 7.

24. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que r2 compreende o ID. DE SEQ. N°: 8, ID. DE SEQ. N°: 9, ID. DE SEQ. N°: 10, ID. DE SEQ. N°: 11, ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 13 ou ID. DE SEQ. N°: 14.

25. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que r3 compreende o ID. DE SEQ. N°: 15.

26. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata caracterizada pelo fato de que

compreende CDR1, CDR2 e CDR3, compreendendo a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4, em que um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados das posições de aminoácido 31, 33, 50, 55, 56, 62 e 97 são substituídas.

27. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada** por compreender uma ou mais substituições adicionais nas posições de aminoácido diferentes das posições 31, 33, 50, 55, 56, 62 e 97.

28. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizada** por compreender substituição na posição 31.

29. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizada** por compreender substituição na posição 33.

30. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizada** por compreender substituição na posição 50.

31. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizada** por compreender substituição na posição 55.

32. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizada** por compreender substituição na posição 56.

33. Proteína de ligação ao antígeno de membrana

específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituição na posição 62.

34. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituição na posição 97.

35. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições nas posições de aminoácido 55 e 97.

36. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 35, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

37. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições nas posições de aminoácido 33 e 97.

38. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições nas posições de aminoácido 33, 50 e 97.

39. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para antígeno de membrana

específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4.

40. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação ainda possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

41. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições nas posições de aminoácido 31, 33, 50 e 97.

42. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições nas posições de aminoácido 33, 50, 55 e 97.

43. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições em posições de aminoácido 33, 50, 56 e 97.

44. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizada por compreender substituições nas posições de aminoácido 33, 50, 62 e 97.

45. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, caracterizada por compreender uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende a sequência como apresentada é o ID. DE SEQ. N°: 16.

46. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, caracterizada por compreender uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR2 compreende a sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17.

47. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, caracterizada por compreender uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR3 compreende a sequência como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18.

48. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, caracterizada por compreender uma sequência que é pelo menos 80% idêntica à sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

49. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, caracterizada por compreender uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 possui pelo menos 80% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 16, CDR2 possui pelo menos 85% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 17, e CDR3 possui pelo menos 80% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 18.

50. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, caracterizada por compreender uma CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16, CDR2 compreende a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 17, e CDR3 compreende a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 18.

51. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com de qualquer uma das reivindicações 1 a 50, caracterizada pelo fato de que a referida proteína de ligação se liga a um ou a ambos do antígeno de membrana específico da próstata humano e antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus*.

52. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51, caracterizada pelo fato de que a referida proteína de ligação se liga um antígeno de membrana específico da próstata humano e antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* com afinidades de ligação comparáveis.

53. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51, caracterizada pelo fato de que a referida proteína de ligação se liga um antígeno de membrana específico da próstata humano com uma afinidade de ligação maior do que antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus*.

54. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de codificar uma proteína de ligação ao PSMA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 53.

55. Vetor caracterizado pelo fato de compreender o polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 54.

56. Célula hospedeira caracterizada por ser transformada com o vetor conforme definido na reivindicação 55.

57. Composição farmacêutica caracterizada por compreender (i) uma proteína de ligação ao PSMA conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 53, o polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 54, o vetor conforme definido na reivindicação 55 ou a célula hospedeira conforme definido na reivindicação 56, e (ii) um carreador farmaceuticamente aceitável.

58. Processo caracterizado por ser usado para a produção

de uma proteína de ligação ao PSMA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 53, o referido processo compreendendo o cultivo de um hospedeiro transformado ou transfetado com um vetor que comprehende uma sequência de ácidos nucléicos que codifica uma proteína de ligação à albumina-PSMA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 53 sob condições que permitem a expressão da proteína de ligação ao PSMA e recuperação e purificação da proteína produzida da cultura.

59. Método caracterizado por ser usado para o tratamento ou melhora de uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença enxerto-versus-hospedeiro ou uma doença hospedeiro-versus-enxerto, que comprehende a administração da proteína de ligação ao PSMA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 53, a um indivíduo que dela necessita.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o método ainda comprehende a administração de um agente em combinação com a proteína de ligação ao PSMA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 53.

62. Proteína de ligação multiespecífica, caracterizada por compreender a proteína de ligação ao PSMA conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1, 26 ou 45 a 50.

63. Anticorpo caracterizado por compreender a proteína

de ligação ao PSMA conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1, 26 ou 45 a -50.

64. Anticorpo multiespecífico, anticorpo biespecífico, sdAb, domínio pesado variável, peptídeo ou ligante, **caracterizado** por compreender a proteína de ligação ao PSMA conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1, 26 ou 45 a 50.

65. Anticorpo **caracterizado** por compreender a proteína de ligação ao PSMA conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1, 26 ou 45 a 50, em que o referido anticorpo é um anticorpo de domínio único.

66. Anticorpo de domínio único, conforme definido na reivindicação 64, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo é derivado de uma região variável da cadeia pesada de IgG.

67. Proteína de ligação multiespecífica ou anticorpo, **caracterizado** por compreender a proteína de ligação ao PSMA conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1, 26 e 45 a 50 e um domínio de ligação ao CD3.

68. Método, **caracterizado** por ser usado para o tratamento ou melhora de uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença enxerto-versus-hospedeiro ou uma doença hospedeiro-versus-enxerto, que compreende a administração do anticorpo multiespecífico de conforme definida em qualquer uma das reivindicações 64 a 68, a um indivíduo que dela necessita.

69. Método, **caracterizado** por ser usado para o tratamento ou melhora de uma condição da próstata, que

compreende a administração do anticorpo multiespecífico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 64 a 68, a um indivíduo que dela necessita.

70. Método, **caracterizado** por ser usado para o tratamento ou melhora de uma condição da próstata, que comprehende a administração da proteína de ligação ao PSMA de conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 53, a um indivíduo que dela necessita.

71. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender qualquer combinação do seguinte:

- (i), em que X₁ é prolina;
- (ii), em que X₂ é histidina;
- (iii), em que X₃ é ácido aspártico;
- (iv) em que X₄ é lisina;
- (v), em que X₅ é glutamina;
- (vi), em que X₆ é tirosina; e
- (vii), em que X₇ é serina.

72. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 71, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada como ID. DE SEQ. N°: 4.

73. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender qualquer combinação do seguinte:

- (i), em que X₁ é prolina; em que X₅ é glutamina;

(ii), em que X_6 é tirosina; em que X_4 é lisina e X_7 é serina;

(iii), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_4 é lisina e X_7 é serina;

(iv), em que X_1 é prolina, X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina;

(v), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_5 é glutamina e X_7 é serina;

(vi), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_4 é lisina e X_7 é serina;

(vii), em que X_1 é prolina, X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina;

(viii), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_5 é glutamina e X_7 é serina;

(ix), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico, X_6 é tirosina e X_7 é serina; e

(x), em que X_2 é histidina, X_3 é ácido aspártico e X_7 é serina.

74. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 73, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

75. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 74, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de ligação ainda possui uma afinidade maior para um antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no

ID. DE SEQ. N°: 4.

76. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada** por compreender qualquer combinação do seguinte:

- (i) substituição na posição 31;
- (ii) substituição na posição 50;
- (iii) substituição na posição 55; substituição na posição 56;
- (iv) substituição na posição 62;
- (v) substituição na posição 97;
- (vi) substituições nas posições 55 e 97;
- (vii) substituições nas posições 33 e 97;
- (viii) substituições nas posições 33, 50 e 97;
- (ix) substituições nas posições 31, 33, 50 e 97;
- (x) substituições nas posições 33, 50, 55 e 97;
- (xi) substituições nas posições 33, 50, 56 e 97; e
- (xiii) substituições nas posições 33, 50, 62 e 97.

77. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de ligação possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata humano do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no ID. DE SEQ. N°: 4.

78. Proteína de ligação ao antígeno de membrana específico da próstata, de acordo com a reivindicação 77, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de ligação ainda possui uma afinidade maior para antígeno de membrana específico da próstata de *Cynomolgus* do que aquela de uma proteína de ligação que possui a sequência apresentada no

ID. DE SEQ. N°: 4.

79. Método de tratamento ou melhora de câncer de próstata, caracterizado pelo fato de que o ara compreendendo a administração da proteína de ligação ao PSMA que compreende regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

(a) a sequência de aminoácidos de CDR1 é como apresentada em RFMISX₁YX₂MH (ID. DE SEQ. N°: 1);

(b) a sequência de aminoácidos de CDR2 é como apresentada em X₃INPAX₄X₅TDYAE₆VKG (ID. DE SEQ. N°: 2); e

(c) a sequência de aminoácidos de CDR3 é como apresentada em DX₇YGY (ID. DE SEQ. N°: 3), a um indivíduo que dela necessita.

80. Anticorpo compreendendo a proteína de ligação ao PSMA, conforme definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o referido anticorpo ser um anticorpo de domínio único.

81. Anticorpo compreendendo a proteína de ligação ao PSMA, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo de domínio único é parte de um anticorpo triespecífico.

82. Anticorpo compreendendo a proteína de ligação ao PSMA, conforme definida na reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um anticorpo de domínio único.

83. Anticorpo compreendendo a proteína de ligação ao PSMA, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo de domínio único é parte de um anticorpo triespecífico.

84. Anticorpo compreendendo a proteína de ligação ao

PSMA, conforme definida na reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo é um anticorpo de domínio único.

85. Anticorpo compreendendo a proteína de ligação ao PSMA, de acordo com a reivindicação 84, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo de domínio único é parte de um anticorpo triespecífico.

Figura 1

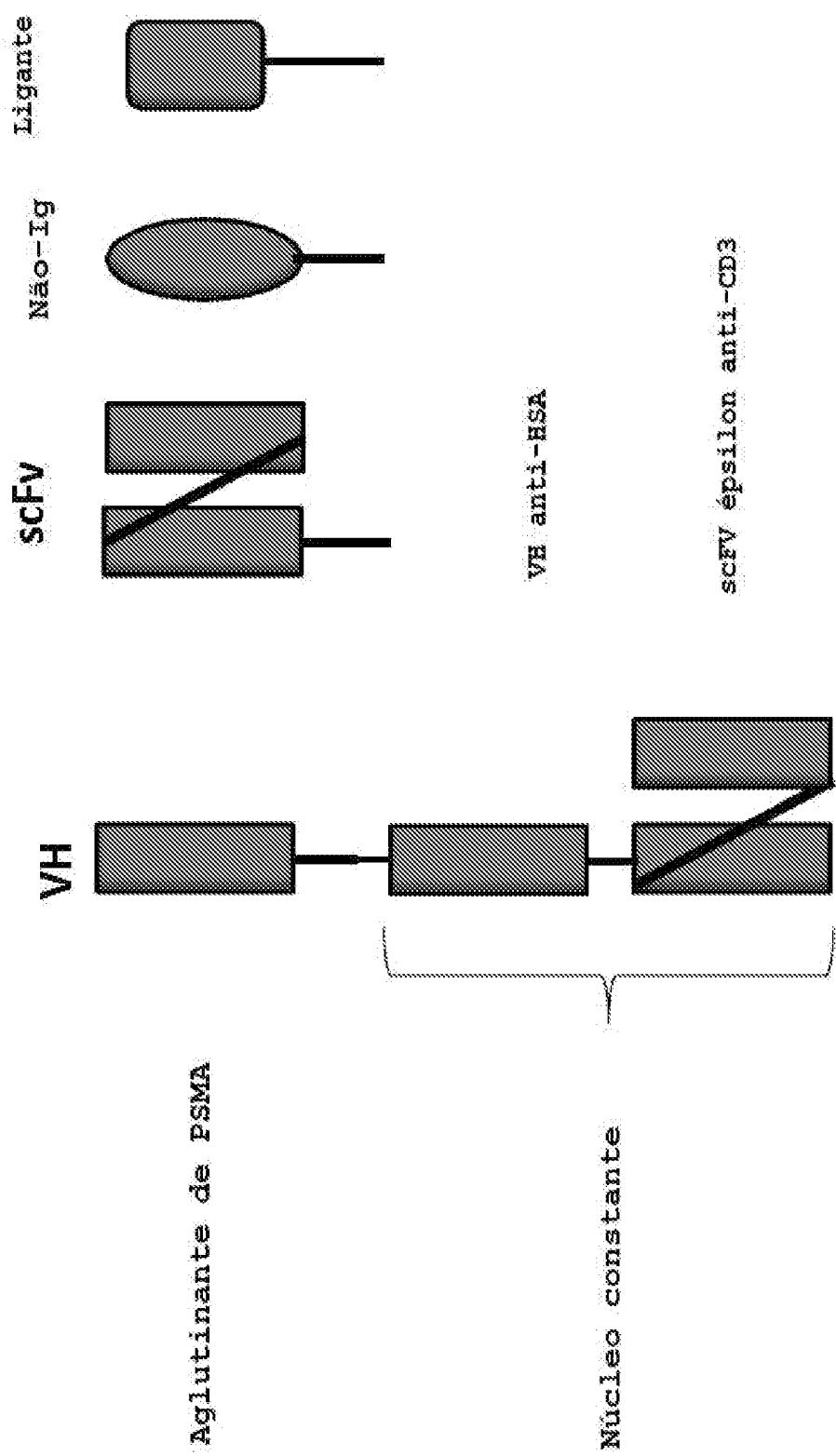


Figura 2A

**Atividade de TriTACs no
modelo de câncer de próstata LNCaP**

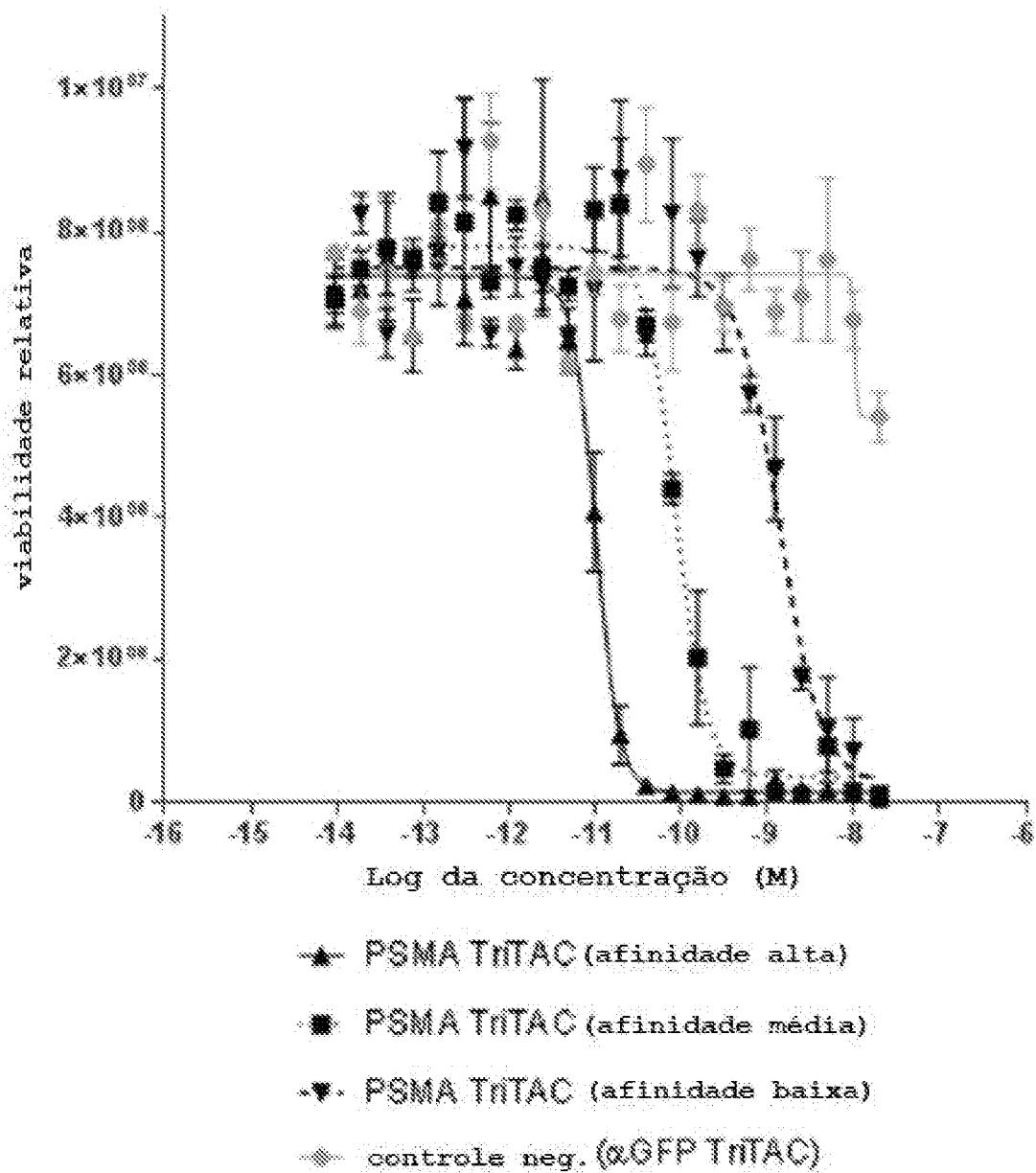


Figura 2B

**Atividade da TriTACs no
modelo de câncer de próstata 22Rv1**

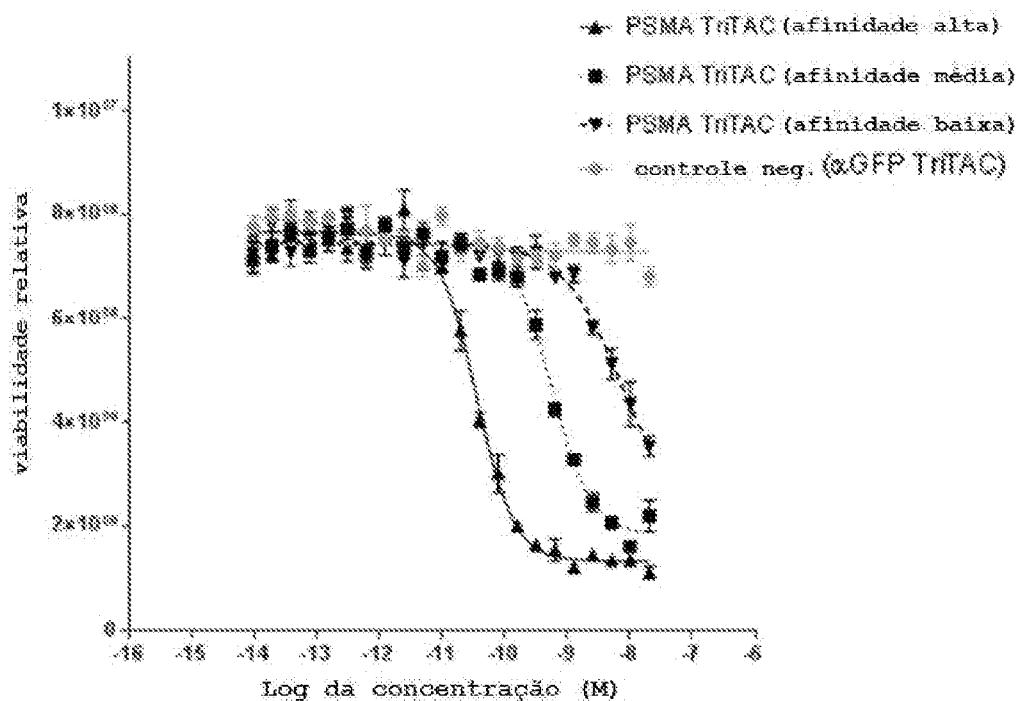
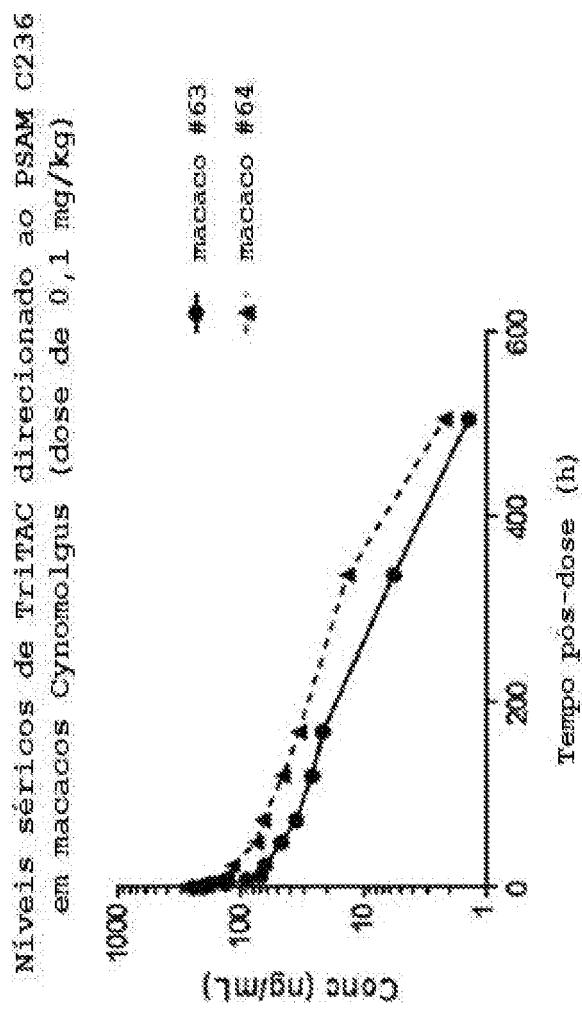


Figura 2C

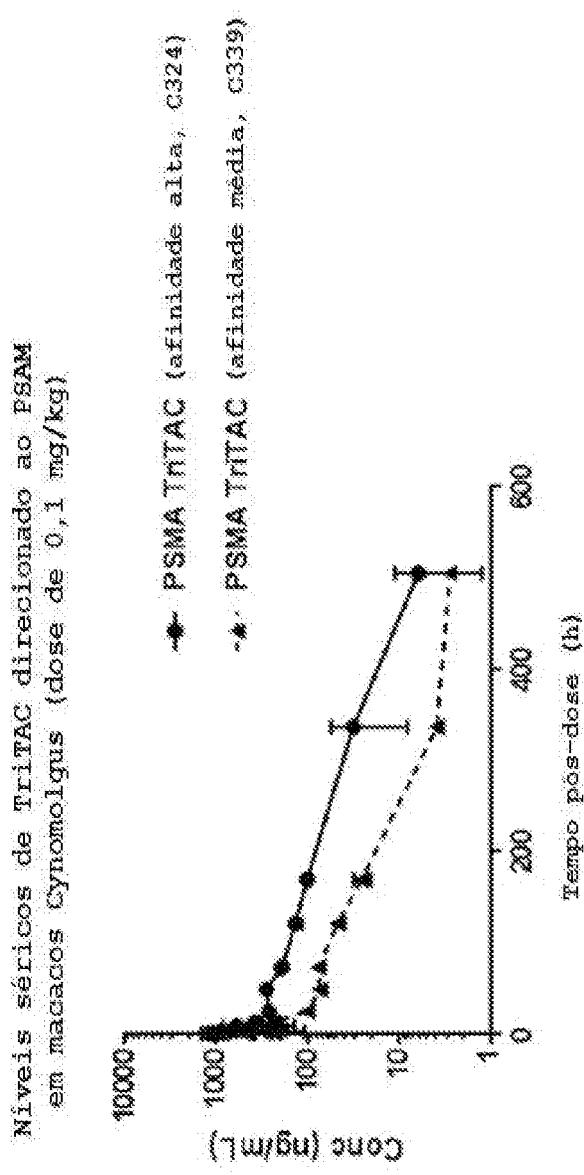
EC50 [pM]	LNCaP	22Rv1
TriTAC CD3 afin. alta - C324	10	35
TriTAC CD3 afin. média - C339	87	561
TriTAC CD3 afin. baixa - C325	1,389	7,450

Figura 3



Nível de dose	ID do animal	Sem pontos lambda_z	t1/2 terminal	Cmax (ng/ml)	CO (ng/ml)	AUC, 0-inf * extrapolado da AUC (hr*ng/ml)	Depuração (ml/h/kg)	Vss (l/kg)
0,1 mg/kg	63	6	31,6	24,5	25,3	10100	10300	1,8
	64	6	93,7	28,7	29,8	17500	17800	1,7
	Média	6	92,6	26,6	27,6	13800	14100	1,8

Figura 4



Nível de dose	ID do animal	# pontos terminais	ti/2 terminal	emax	Cl	AUC,0-last	% extrapolado da AUC	Depuração (ml/h/kg)	Viss (l/kg)
C324 0,1 mg/kg	2323M	3	72,3	1260	1330	47320	0,563	2,33	0,182
	71F	3	101	918	941	56116	0,753	2,46	0,244
	Média	3	85,8	1146	1170	510936	0,76936	1,52	0,218
C339 0,1 mg/kg	2322M	6	85,3	497	823	17240	1,724	1,73	0,343
	70F	6	86,5	456	523	15620	1,60306	2,31	0,321
	Média	6	85,9	477	528	16890	1,68906	2,08	0,335

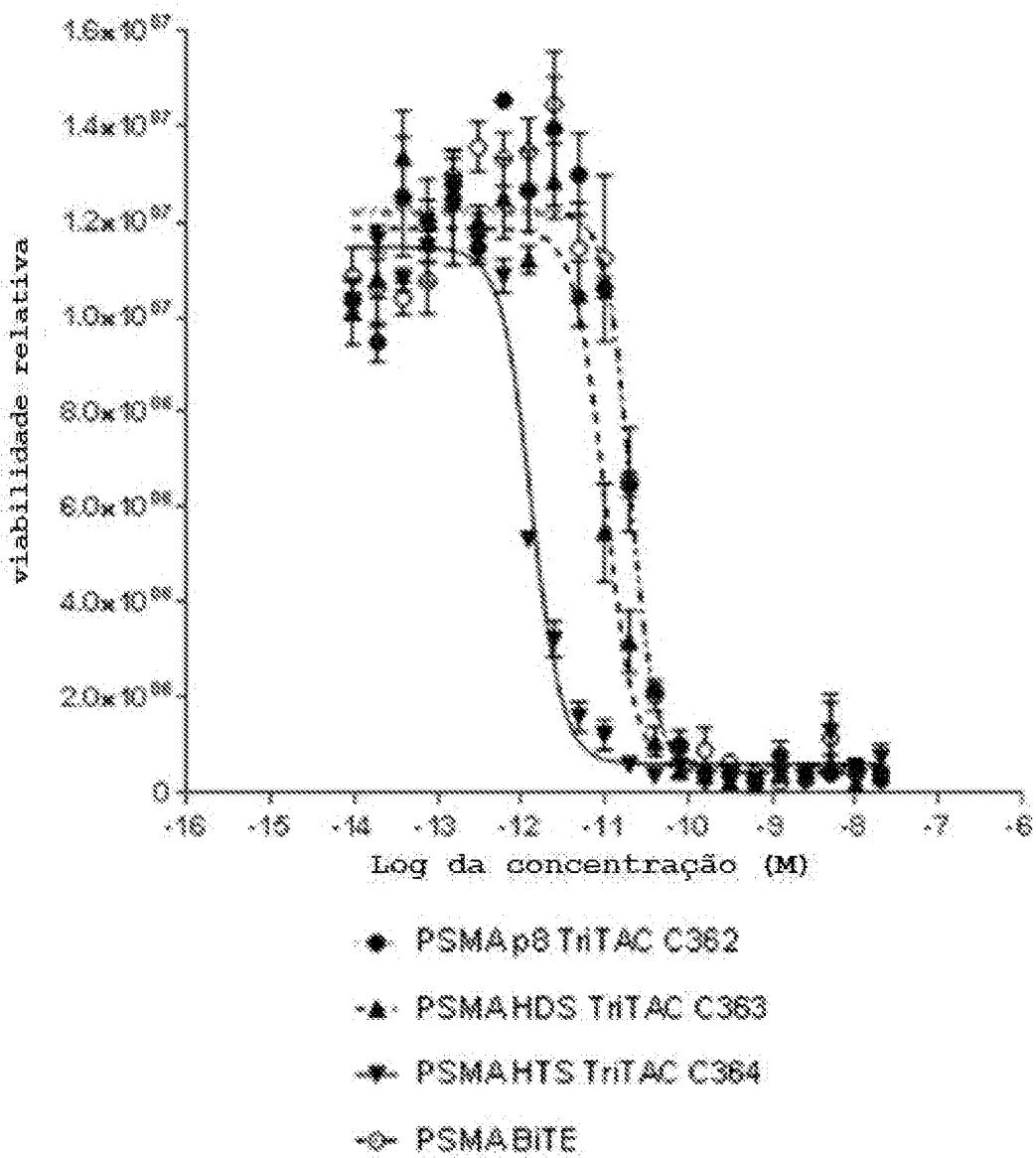
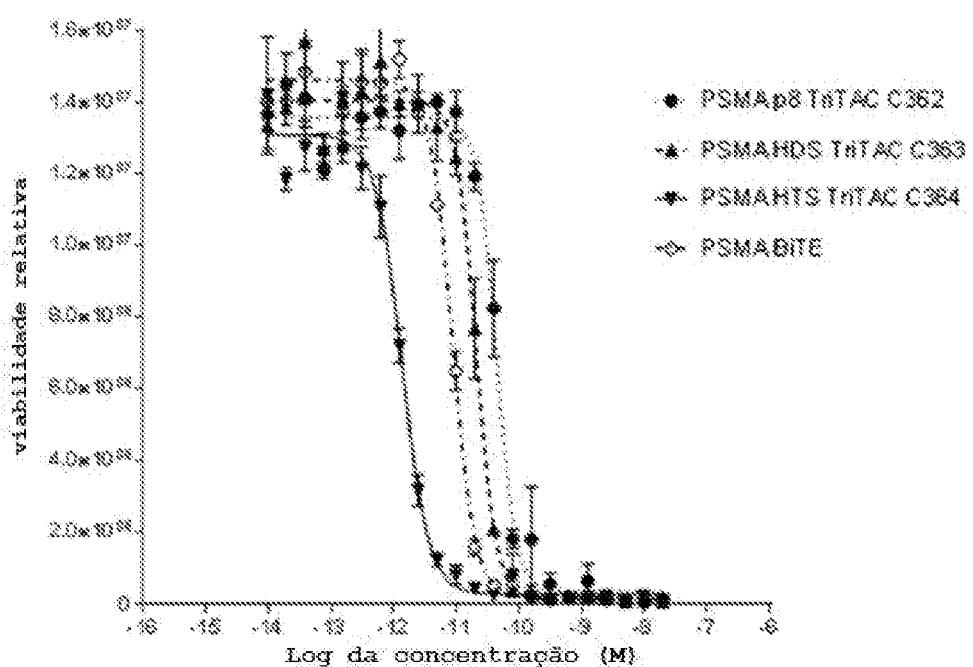
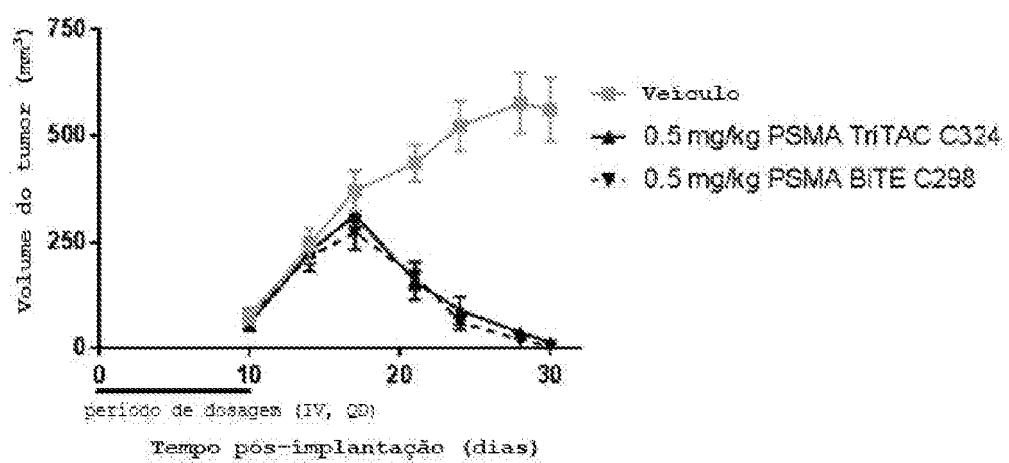
Figura 5A.**Atividade de TriTacs no modelo de LNCaP**

Figura 5B
Atividade de TritACs na presença
de HSA (modelo de LNCaP)

**Figura 5C**

EC50 [pM]	LNCaP	LNCaP com HSA	Deslocamento de HSA
PSMA p8 TriTAC C362	20	43	2x
PSMA HDS TriTAC C363	10	21	2x
PSMA HTS TriTAC C364	1.3	1.3	1x
PSMA BiTE	20	9	0.5x

Figura 6



- * Estudo de xenoenxerto de câncer de próstata humano 22Rv1 em camundongos NOD/SCID/gama reconstituídos com células T humanas primárias, em repouso, misturadas em uma proporção de 1:1 com células de câncer

Figura 7A

Linhagem de célula	Expressão de EGFR	Expressão de PSMA
LNCaP	Positiva	Positiva
KMS12BM	Negativa	Negativa
OVCAR8	Positiva	Negativa

Figura 7B

Ensaio de TDCC com células tumorais LNCaP PMSA-positivas

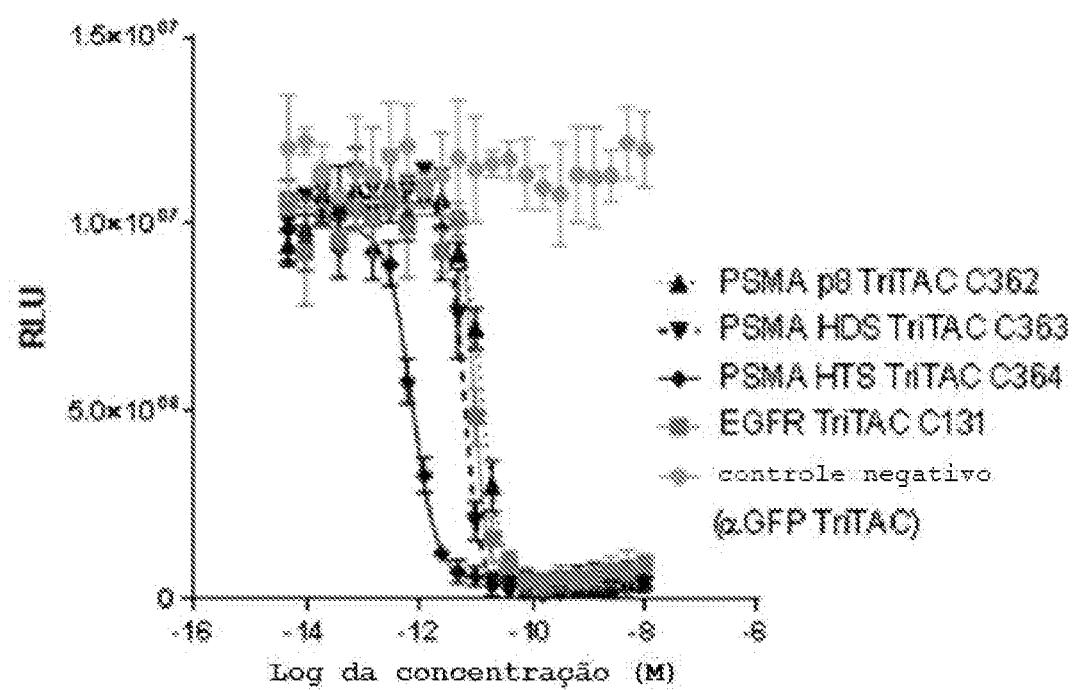


Figura 7C

Ensaio de TDCC com células tumorais KMS12BM PSMA-negativas

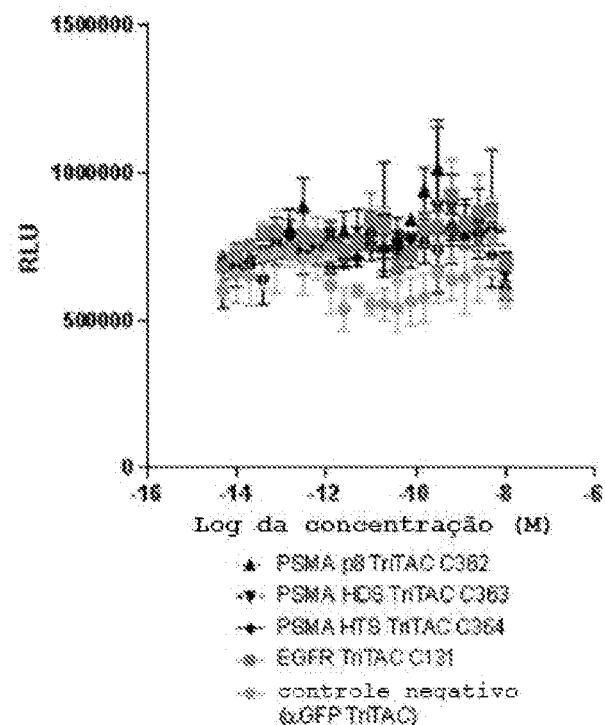


Figura 7D

Ensaio de TDCC com linhagem de células OVCAR8 PSMA-negativas

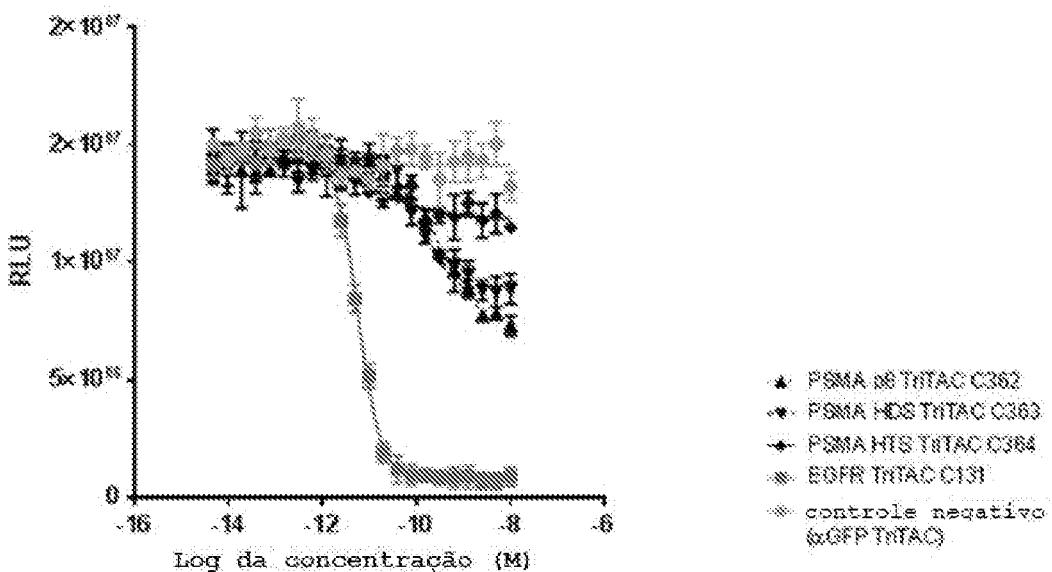


Figura 8A

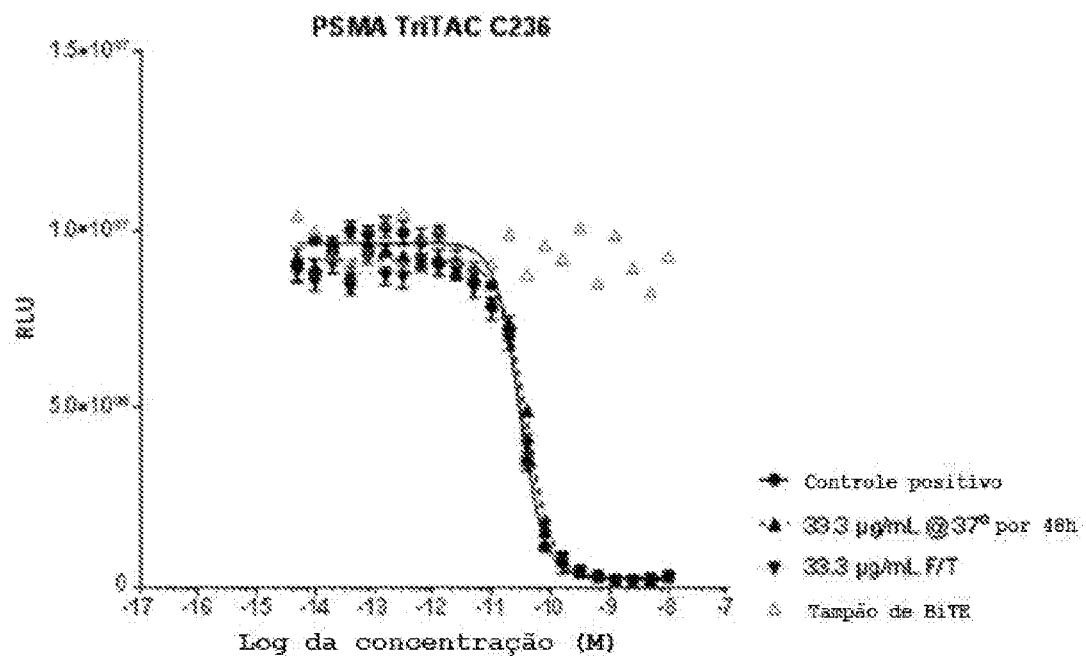


Figura 8B

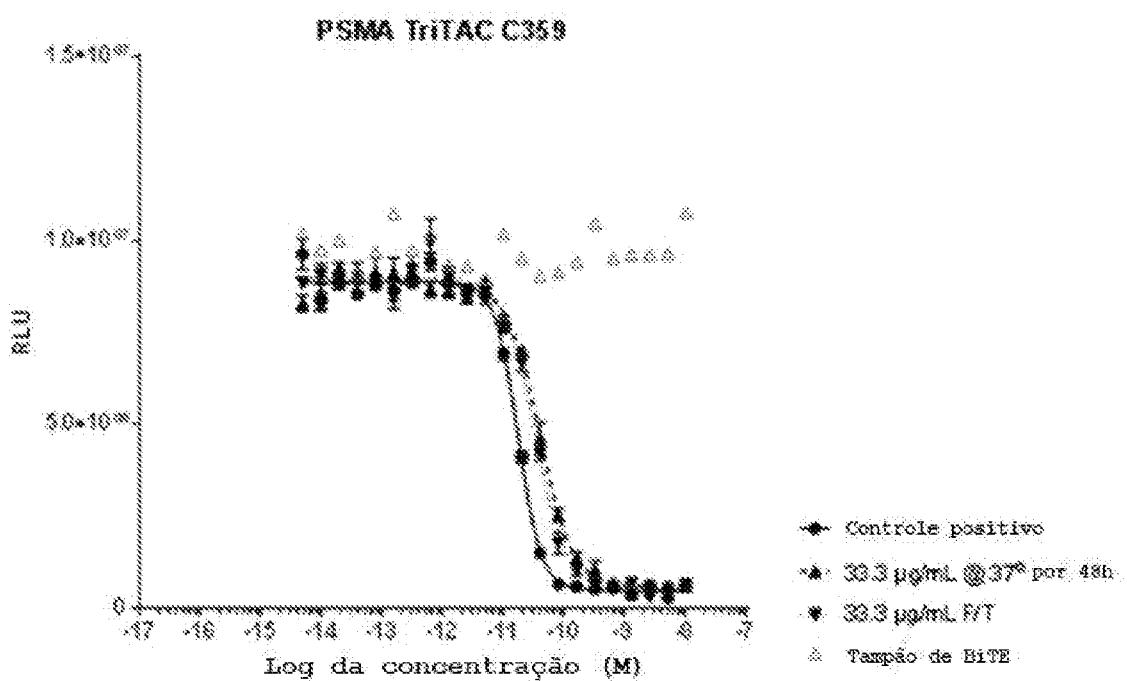


Figura 8c

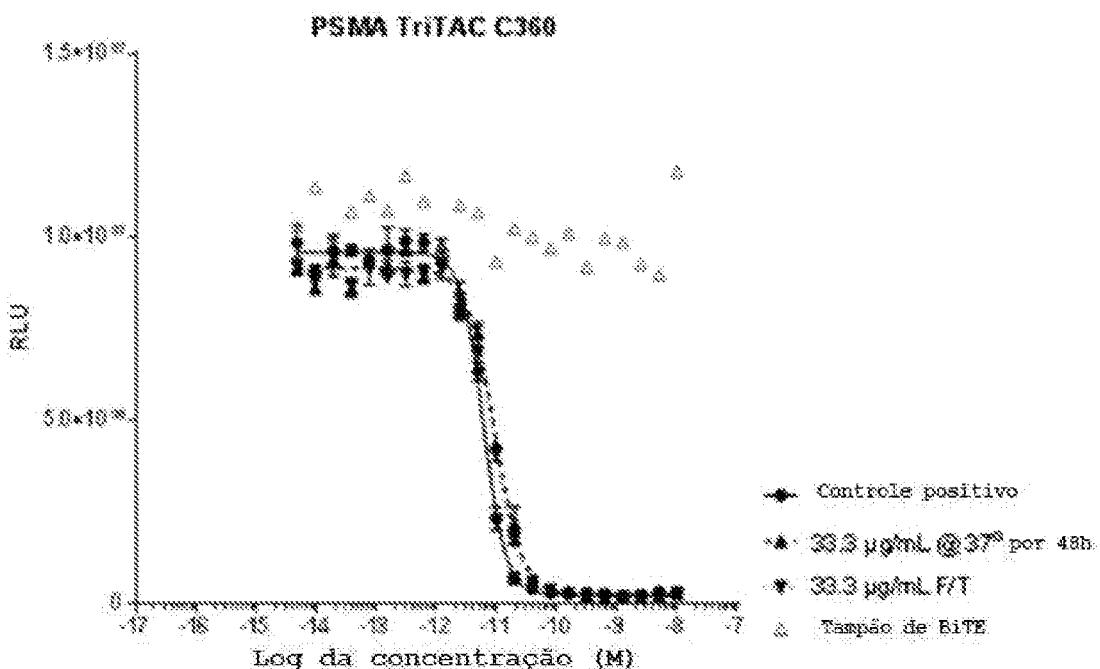


Figura 6B

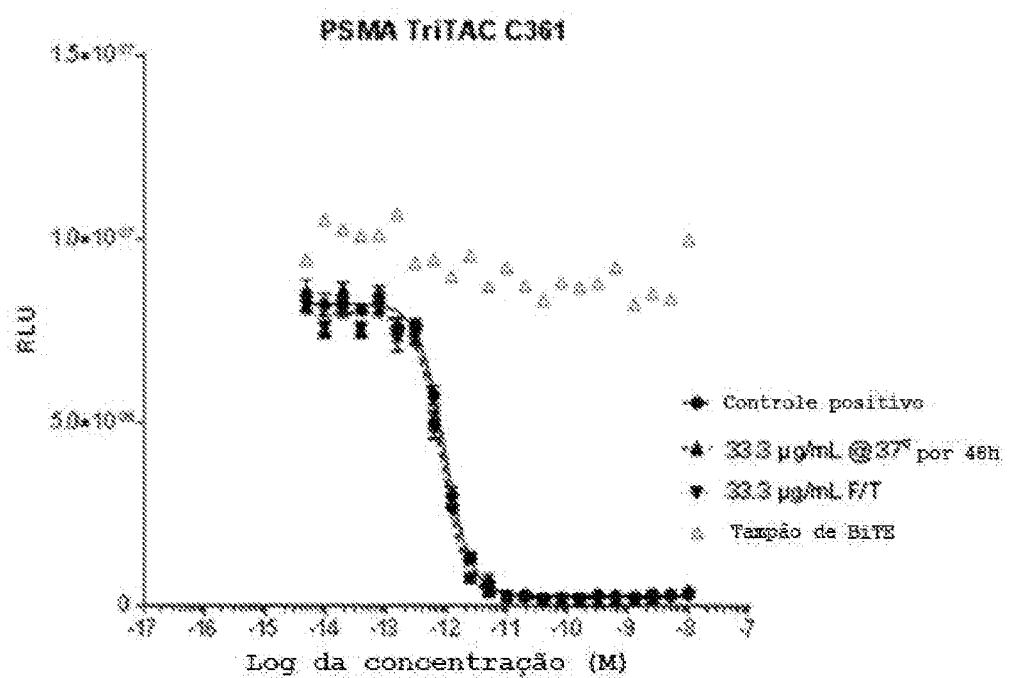


Figura 9A

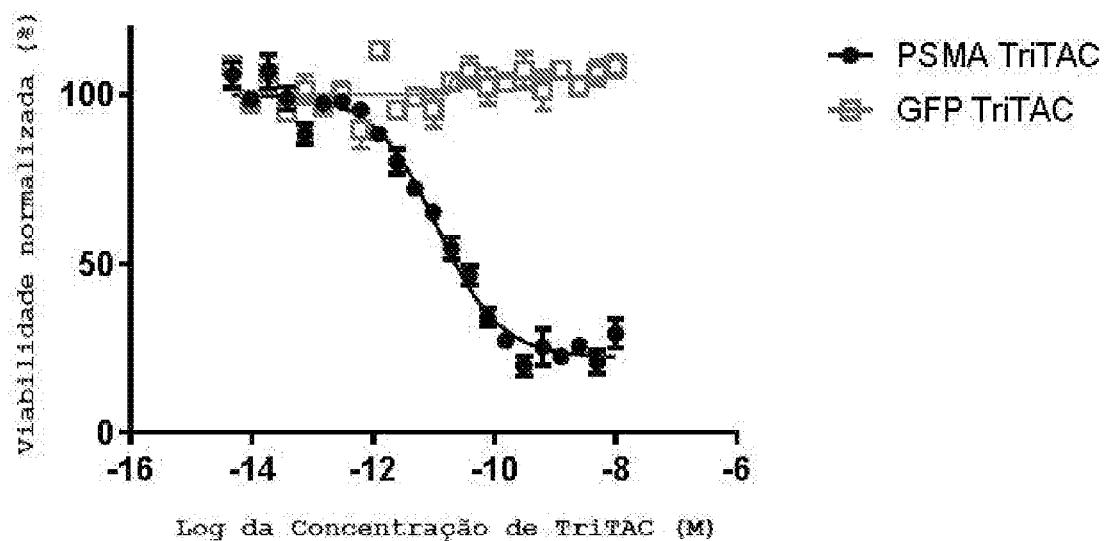


Figura 9B

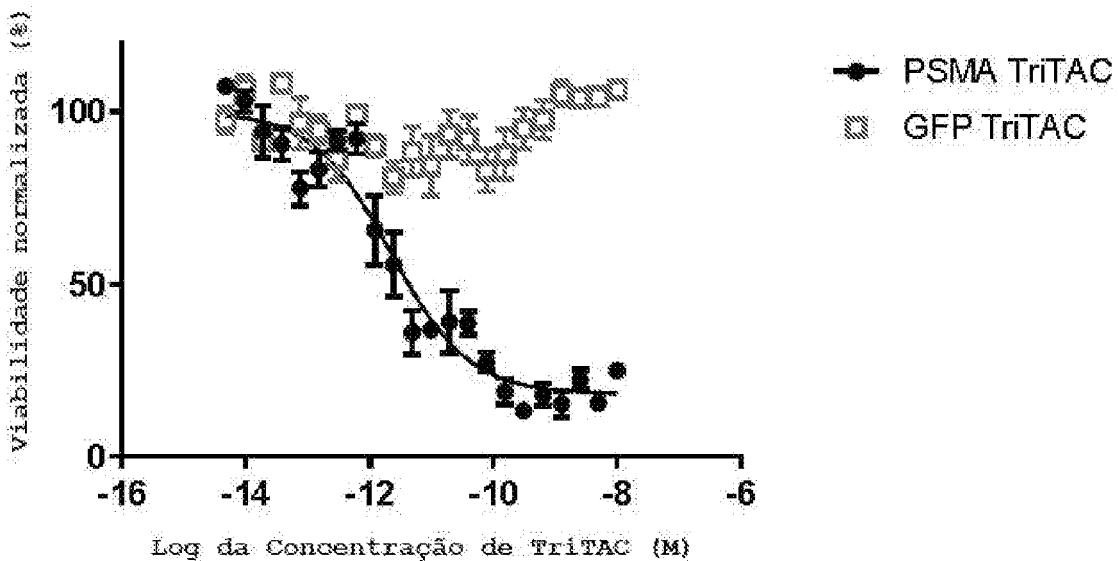


Figura 10

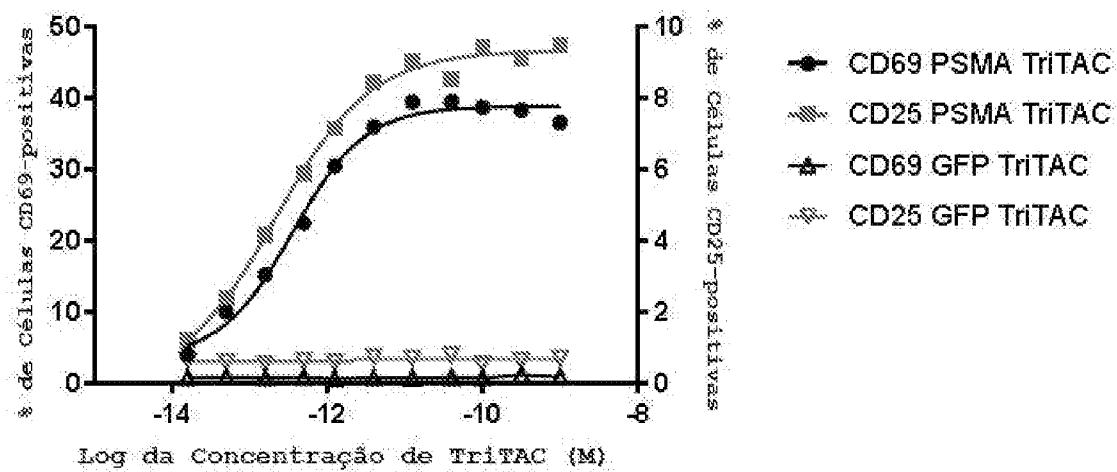


Figura 11

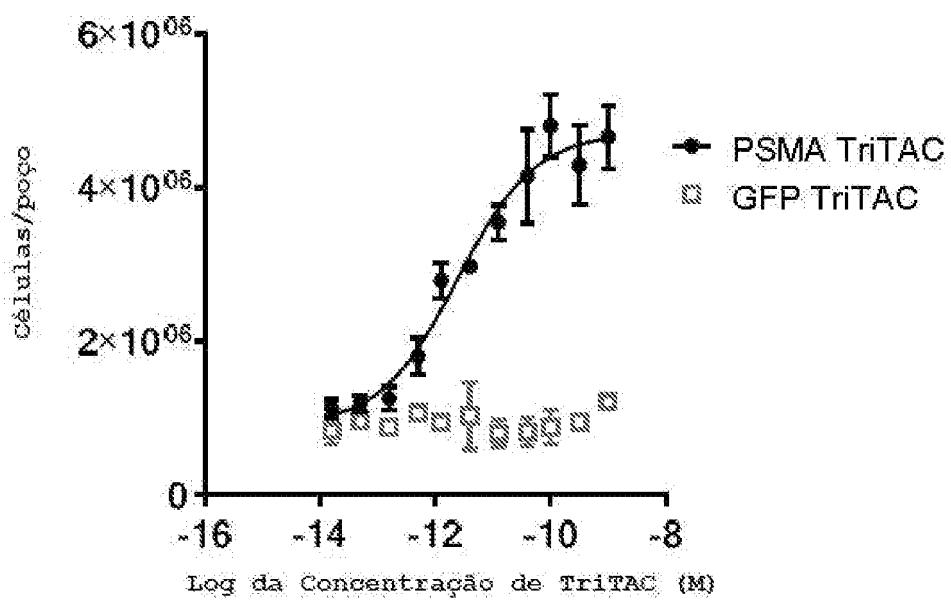
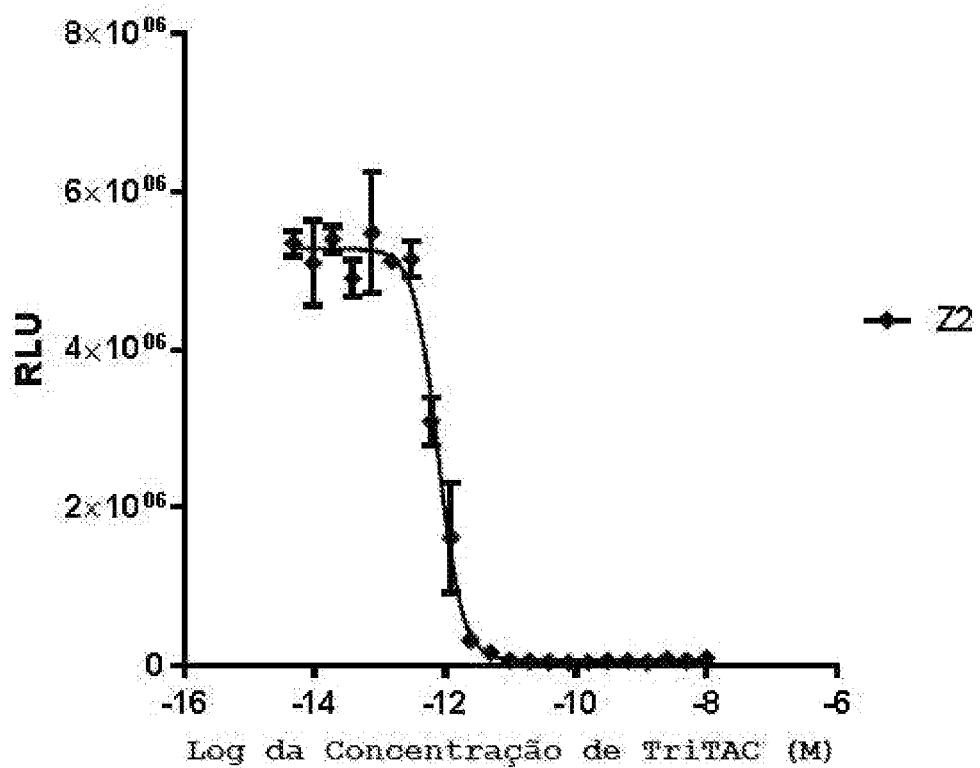


Figura 12



RESUMO

**"PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DE MEMBRANA PRÓSTATA-
ESPECÍFICO"**

São reveladas nesse relatório descritivo proteínas de ligação ao PSMA com afinidades de ligação aumentada e perfis de agregação robustos. Também são descritas proteínas de ligação multiespecíficas que compreendem uma proteína de ligação ao PSMA de acordo com a presente revelação. São ainda fornecidas composições farmacêuticas que compreendem as proteínas de ligação reveladas nesse relatório descritivo e métodos de utilização dessas formulações.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201900700 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 14/11/2019
- Hora de Geração do Código: 12:05:24
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1553657B72713E67
 - Campo 2: 2F1BD4F48D616202