

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0620639-5 A2**

(22) Data de Depósito: 21/12/2006
(43) Data da Publicação: 22/11/2011
(RPI 2133)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/00
C12P 21/08

(54) Título: ANTICORPOS DE CADEIA SIMPLES BIESPECÍFICOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2006 US 60/753,368

(73) Titular(es): Medimmune, Inc., Micromet AG

(72) Inventor(es): Bernd Schlereth, Elizabeth Bruckheimer, Michael Kinch, Patrick Baeurele, Peter A. Kiener, Peter Kufer, Petra Lutterbuese, Ralf Lutterbüse, Scott A. Hammond, Shannon Roff

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2006048995 de 21/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/073499de 28/06/2007

(57) Resumo: ANTICORPOS DE CADEIA SIMPLES BIESPECÍFICOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS. A presente invenção refere-se a anticorpos de cadeia simples biespecíficos compreendendo um primeiro domínio de ligação que liga-se imuno especificamente com o CD3 de antígeno de células T e um segundo domínio de ligação que liga-se imuno especificamente com o receptor de EphA2. Tais anticorpos de cadeia simples biespecíficos são abrangidos pelo termo "EphA2-BiTEs". A presente invenção refere-se ainda a métodos e composições destinados ao tratamento, à prevenção e/ou ao gerenciamento de desordens associadas com a expressão e/ou a atividade anormal de EphA2. Tais desordens incluem, sem limitação, câncer, desordens de células hiperproliferativas não-cancerígenas e infecções. A invenção revela vetores que compreendem polinucleotídeos codificando os EphA2-BiTEs da invenção, células de hospedeiros transformadas pelos mesmos e seus usos na produção dos referidos EphA2-BiTEs. A presente invenção também fornece composições, incluindo composições farmacêuticas, compreendendo qualquer um dos referidos EphA2-BiTEs, polinucleotídeos ou vetores, sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos ou profiláticos. São ainda descritos métodos de varredura dos referidos EphA2-BiTEs e kits compreendendo qualquer uma das referidas composições e reagentes de diagnóstico.

**ANTICORPOS DE CADEIA SIMPLES BIESPECÍFICOS E COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS**

O presente pedido reivindica o benefício do pedido
5 provisório U.S. Provisional Application No. 60/753.368,
depositado em 21 de dezembro de 2005, que é incorporado por
referência aqui em sua íntegra.

CAMPO DA INVENÇÃO

10

A presente invenção está relacionada a anticorpos
biespecíficos de cadeia simples compreendendo um primeiro
domínio de ligação que se liga imuno especificamente ao
antígeno CD3 de célula T e um segundo domínio de ligação
15 que se liga imuno especificamente ao receptor EphA2. Tais
anticorpos biespecíficos de cadeia simples são englobados
pelo termo "EphA2-BiTEs." A presente invenção está
relacionada ainda a métodos e composições projetados para o
tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de desordens
20 associadas com expressão e/ou atividade de EphA2 aberrante.
Tais desordens incluem, mas não estão limitadas a, câncer,
desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas, e
infecções. A invenção está ainda relacionada a vetores
compreendendo polinucleotídeos codificando os EphA2-BiTEs
25 da invenção, células hospedeiras transformadas com esses, e
seu uso na produção de ditos EphA2-BiTEs. A invenção
também provê composições, incluindo composições
farmacêuticas, compreendendo qualquer dos EphA2-BiTEs
mencionados a seguir, polinucleotídeos ou vetores tanto

sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos. Também descritos são métodos de rastrear para ditos EphA2-BiTEs e kits compreendendo qualquer das composições e reagentes diagnósticos mencionados a seguir.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

2.1 EphA2

10

EphA2 é uma tirosina quinase receptora de 130 kDa que é expressada em epitélio adulto, onde é encontrada em baixos níveis e é enriquecida em sítios de adesão célula-célula (Zantek et al., 1999, Cell Growth & Differentiation 10(9):629-38; Lindberg et al., Mol. & Cell. Biol. 10:6316, 1990). É pensado que essa localização subcelular desempenha um papel na inibição de contato através da interação de EphA2 com seus ligantes (conhecidos como EphrinsA1 a A5) que estão ancorados na membrana celular em células adjacentes (Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90:403-04; Cheng et al., 2002, Cytokine & Growth Factor Rev. 13:75-85). O engajamento de EphA2 com seu ligante resulta em autofosforilação de EphA2 e sua subsequente degradação (Walker-Daniels et al., 2002, Mol. Cancer. Res. 1(1):79-87; Carles-Kinch et al., 2002, Cancer Res. 62(10):2840-47). Essa cascata de sinalização também inicia eventos abaixo que regulam negativamente a anexação a moléculas de adesão de matriz extracelular e, dessa forma, regulam o crescimento e migração celular (Zantek et al., 1999, Cell

Growth & Differentiation 10(9):629-38; Miao et al., 2000, Nat. Cell Biol. 2(2):62-69; Zelinski et al., 2001, Cancer Res. 61(5):2301-06).

5 EphA2 foi mostrado por ser sobre-expressado em um número de deferentes tipos de tumores incluindo melanoma, carcinoma celular renal, cânceres de mama, próstata, cólon, de esôfago, cervical, de pulmão, ovariano e de bexiga (Carles-Kinch et al., 2002, Cancer Res. 62(10):2840-47).

10 Os níveis mais altos de expressão de EphA2 são observados nas células mais agressivas, sugerindo um papel para EphA2 na progressão da doença. Níveis altos de EphA2 também têm sido correlacionados com baixa sobrevivência para cânceres que não de células pequenas de pulmão, esôfago, cervical e

15 ovariano (Kinch et al., 2003, Clin. Cancer Res. 9(2):613-18; Miyazaki et al., 2003, Int. J. Cancer 103(5) 657-63; Wu et al., 2004, Gynecol. Oncol. 94(2):312-19; Thaker et al., 2004, Clin. Cancer Res. 10(15):5145-50). Adicionalmente, em modelos pré-clínicos, foi demonstrado que a expressão

20 exógena de EphA2 é suficiente para render uma linha celular não tumorigênica, tumorigênica *in vitro* e *in vivo* (Zelinski et al., 2001, Cancer Res. 61(5):2301-06).

2.2 Moléculas BiTE®

25

Engajadores de células T biespecíficos, ou BiTEs®, são uma forma de anticorpos biespecíficos que são baseados em anticorpos de cadeia simples arranjados um atrás do outro (revisado em Wolf et al., 2005, Drug Discovery Today: in

press). Eles formam uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 55 kDa e são secretados por células de ovário de *hamster* chinês (CHO) como uma mistura de monômeros e dímeros. Com uma ramificação, BiTEs® se liga à subunidade épsilon (ϵ) de CD3 humano, um componente 5 protéico de complexo de transdução de sinais do receptor de células T em células T. Com uma ramificação, BiTEs® reconhecem um antígeno em células alvo. A ativação de célula T é vista apenas quando BiTEs® são apresentados a 10 células T na superfície das células alvo.

BiTEs® limitam transientemente células T e células alvo. A ativação de células T por BiTEs® envolve a regulação positiva de CD69, CD25 e várias moléculas de 15 adesão celular, expressão *de novo* e liberação de citocinas (e.g., IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4 e IL-10), regulação positiva da expressão de granzima e perforina, e proliferação celular. A lise de célula alvo redirecionada por BiTEs® é independente de especificidade de receptor de 20 célula T, presença de MHC classe I e β 2 microglobulina, e de qualquer estímulo co-estimulatório. Essa independência de sinais de células T regulares e moléculas de reconhecimento pode ser explicada pela indução através de BiTEs® de sinapses citolíticas regulares e máxima 25 proximidade a membrana. O deslocamento de proteínas reguladoras negativas, tais como CD45 de sinapses induzidas por BiTE® pode aliviar a necessidade para co-estimulação.

BiTEs[®] apresentam lise redirecionada *in vitro* com células T periféricas policlonais CD8- e CD4-positivas não estimuladas previamente. Nenhuma atividade é vista com células T CD8- ou CD4-positivas. células T CD4 podem regular positivamente a expressão de granzima B e perforina quando estimuladas com BiTEs[®] e, dessa forma, contribuem para lise de célula alvo mediada por CD8. *In vitro*, lise redirecionada é vista em concentrações picomolares baixas, sugerindo que números muito baixos de moléculas BiTE necessitam ser ligadas a células alvo para ativar células T. Em modelos de SCID de camundongo, doses sub- μ g de BiTEs[®] foram comprovadas por prevenir completamente o crescimento de tumor (Dreier et al., 2003, J Immunol. 170:4397-4402) e por erradicar tumores sólidos em até 200 mm³ (Schlereth et al., 2005, Cancer Res. 2005 65(7):2882-89).

BiTEs[®], portanto, provêm uma oportunidade única para desenvolver terapias baseadas em anticorpos seletivas e eficazes contra EphA2 para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de desordens associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas, e infecções).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê engajadores de células T biespecíficos (i.e., EphA2-BiTEs (em particular, EphA2-BiTEs, os quais são anticorpos biespecíficos de cadeia

simples)) que ligam EphA2 imunoespecificamente e antígeno CD3 de célula T, e métodos de usar o mesmo para tratar, prevenir e/ou gerenciar desordens associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2. Tais desordens incluem, por exemplo, câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas, e infecções. Em um aspecto, os EphA2-BiTEs são mais eficientes em eliminar células que expressam EphA2 de forma aberrante do que anticorpos EphA2 específicos conhecidos na arte. Em um aspecto específico, os EphA2-BiTEs são mais eficientes em eliminar células cancerosas expressando EphA2 (em particular, células cancerosas malignas expressando EphA2) do que anticorpos EphA2 conhecidos na arte. Em outro aspecto, os EphA2-BiTEs são mais eficientes em eliminar células hiperproliferativas não cancerosas expressando EphA2 do que anticorpos EphA2 conhecidos na arte. Ainda em outro aspecto, os EphA2-BiTEs da invenção são mais eficientes em eliminar células infectadas expressando EphA2 (em particular, células infectadas com o vírus sincitial respiratório; "RSV") do que anticorpos EphA2 conhecidos na arte. Em outro aspecto, dosagens menores de EphA2-BiTEs do que anticorpos EphA2 específicos conhecidos na arte são necessários para tratar, prevenir e/ou gerenciar desordens associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2.

25

Os engajadores de células T biespecíficos EphA2 específicos da presente invenção compreendem um primeiro domínio de ligação que se liga imunoespecificamente ao antígeno CD3 de célula T e um segundo domínio de ligação

que se liga imuno especificamente a EphA2 (daqui em diante "EphA2-BiTEs," "moléculas EphA2-BiTE" ou "engajadores de células biespecíficos de EphA2). Em um avanço, o primeiro domínio de ligação se liga imuno especificamente a CD3. Em

5 um avanço específico, o primeiro domínio de ligação se liga imuno especificamente a uma ou mais de qualquer subunidade de CD3 (e.g., a subunidade gama, delta, zeta, ou eta). Em um avanço preferencial, o primeiro domínio de ligação se liga imuno especificamente à subunidade épsilon (ϵ) de CD3.

10 Em um avanço específico, o primeiro domínio de ligação se liga imuno especificamente à subunidade épsilon (ϵ) de CD3 quando dita subunidade é complexada com a subunidade delta de CD3. Em outro avanço, o domínio de ligação que se liga a CD3 é desimunizado. Em outro avanço específico, o

15 segundo domínio de ligação se liga imuno especificamente ao domínio extracelular de EphA2. Em um avanço preferencial, o segundo domínio de ligação dos EphA2-BiTEs, que são usados no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de câncer, se liga imuno especificamente a epitopos em EphA2

20 que são seletivamente expostos e/ou aumentadas em células cancerosas, mas não em células não cancerosas. Em outro avanço preferencial, o segundo domínio de ligação dos EphA2-BiTEs da invenção se liga imuno especificamente a epitopos em EphA2 que são seletivamente expostos e/ou

25 aumentados em células hiperproliferativas não cancerosas, mas não em células não hiperproliferativas. Em outro avanço preferencial, o segundo domínio de ligação dos EphA2-BiTEs da invenção se liga imuno especificamente a epitopos em EphA2 que são seletivamente expostos e/ou

aumentados em células infectadas, mas não em células não infectadas.

Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção
5 compreende: (1) um primeiro domínio de ligação compreende um domínio variável pesado (VH) e um domínio variável leve (VL) de um anticorpo que se liga imuno especificamente ao antígeno CD3 de célula T; e (2) um segundo domínio de
10 ligação que compreende um domínio VH e um domínio VL de um anticorpo que se liga imuno especificamente a EphA2. Em um avanço específico, os domínios VH e VL do primeiro domínio de ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente para permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir ligação ao antígeno CD3 de célula T. Ainda para
15 este avanço, tal ligante pode compreender, por exemplo, a sequência GEGTSTGS(G₂S)₂GGAD (SEQ ID NO.:57). Em outro avanço específico, os domínios VH e VL do segundo domínio de ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente para permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação a EphA2. Ainda para este avanço, tal
20 ligante pode compreender, por exemplo, a sequência (G₄S)₃ (SEQ ID NO:59). Em outro avanço específico, o primeiro e o segundo domínios de ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente para permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação ao antígeno CD3 de
25 célula T e a EphA2. Ainda para este avanço, tal ligante pode compreender, por exemplo, a sequência G₄S (SEQ ID NO:58). Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção é anti-CD3xEA2 desimunizado (VH/VL) (SEQ ID NO:65).

De acordo com o avanço no parágrafo imediatamente anterior, a ligação é covalente. Em um avanço específico, os ligantes da invenção compreendem resíduos de serina e glicina. Os ligantes dos EphA2-BiTEs, e.g., o ligante entre os domínios VH e VL do primeiro domínio de ligação que se liga a CD3, o ligante entre os domínios VH e VL do segundo domínio de ligação que se liga a EphA2, e o ligante entre o primeiro domínio de ligação que se liga a CD3 e o segundo domínio de ligação que se liga a EphA2 podem ser de qualquer comprimento suficiente a permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação aos antígenos CD3 e EphA2, respectivamente. Em certos avanços, os ligantes da invenção compreendem um comprimento de pelo menos 5 resíduos, pelo menos 10 resíduos, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos ou mais. Em outros avanços, os ligantes da invenção compreendem um comprimento entre 2-4 resíduos, entre 2-4 resíduos, entre 2-6 resíduos, entre 2-8 resíduos, entre 2-10 resíduos, entre 2-12 resíduos, entre 2-14 resíduos, entre 2-16 resíduos, entre 2-18 resíduos, entre 2-20 resíduos, entre 2-22 resíduos, entre 2-24 resíduos, entre 2-26 resíduos, entre 2-28 resíduos, ou entre 2-30 resíduos. Em certos avanços, o primeiro domínio de ligação é 5' em relação ao segundo domínio de ligação. Em outros avanços, o segundo domínio de ligação é 5' em relação ao primeiro domínio de ligação. Em certos avanços, o primeiro e o segundo domínios de ligação são anticorpos de cadeia simples. Em um avanço específico, o primeiro e o Segundo

domínios de ligação compreendem Fvs de cadeia simples (scFvs).

Em um avanço específico, a invenção provê um anticorpo

5 biespecífico de cadeia simples compreendendo (a) um primeiro domínio variável de cadeia pesada e um primeiro domínio variável de cadeia leve cada de um anticorpo que liga imunoespecificamente à cadeia ϵ do CD3, dito primeiro domínio variável de cadeia pesada ligado covalentemente a

10 dito primeiro domínio variável de cadeia leve por um primeiro ligante de comprimento suficiente (e.g., GEGTSTGS(G₂S)₂GGAD (SEQ ID NO.:57)) de forma que dito primeiro domínio variável de cadeia pesada e dito primeiro domínio variável de cadeia leve se dobrem para formar um

15 primeiro domínio de ligação que se liga à subunidade ϵ de CD3; e (b) um segundo domínio variável de cadeia pesada e um segundo domínio variável de cadeia leve de um anticorpo que liga imunoespecificamente um epítipo de EphA2 exposto na superfície da célula, dito segundo domínio variável de

20 cadeia pesada covalentemente ligado a dito segundo domínio variável de cadeia leve por um segundo ligante de comprimento suficiente (e.g., (G₄S)₃ (SEQ ID NO:59)) de forma que dito segundo domínio variável de cadeia pesada e dito segundo domínio variável de cadeia leve se dobrem para

25 formar um segundo domínio de ligação que liga dito epítipo de EphA2, caracterizado pelo fato de que dito primeiro domínio de ligação e dito segundo domínio de ligação são covalentemente ligados por um terceiro ligante de um comprimento (e.g., G₄S (SEQ ID NO:58)), de forma que dito

primeiro domínio de ligação e dito segundo domínio de ligação se dobrem independentemente um do outro.

Em avanços específicos, os EphA2-BiTEs da invenção
 5 compreendem qualquer dos seguintes arranjos na direção 5' a 3': (1) $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VH_{EphA2}-VL_{EphA2}$; (2) $VL_{CD3}-VH_{CD3}-VH_{EphA2}-VL_{EphA2}$; (3) $VL_{CD3}-VH_{CD3}-VL_{EphA2}-VH_{EphA2}$; (4) $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VL_{EphA2}-VH_{EphA2}$; (5) $VH_{EphA2}-VL_{EphA2}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$; (6) $VL_{EphA2}-VH_{EphA2}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$; (7) $VL_{EphA2}-VH_{EphA2}-VL_{CD3}-VH_{CD3}$; ou (8) $VH_{EphA2}-VL_{EphA2}-VL_{CD3}-VH_{CD3}$. Ver, e.g., FIG. 14A para uma demonstração genérica
 10 dos constructos EphA2-BiTE da invenção.

Em um avanço específico, o primeiro domínio de ligação de um EphA2-BiTE da invenção se liga à subunidade ϵ de CD3
 15 com uma afinidade menor do que o segundo domínio de ligação que liga EphA2. Em um avanço, a constante de dissociação (K_D) do primeiro domínio de ligação que se liga à subunidade ϵ de CD3 está entre $0,1 \times 10^{-12}$ M e $0,5 \times 10^{-12}$ M, $0,1 \times 10^{-12}$ M e 1×10^{-12} M, $0,1 \times 10^{-11}$ M e $0,5 \times 10^{-11}$ M, $0,1 \times 10^{-11}$ M e 1×10^{-11} M, $0,1 \times 10^{-10}$ M e $0,5 \times 10^{-10}$ M, $0,1 \times 10^{-10}$ M e 1×10^{-10} M, $0,1 \times 10^{-9}$ M e $0,5 \times 10^{-9}$ M, $0,1 \times 10^{-9}$ M e 1×10^{-9} M, $0,1 \times 10^{-8}$ M e $0,5 \times 10^{-8}$ M, $0,1 \times 10^{-8}$ M e 1×10^{-8} M, $0,1 \times 10^{-7}$ M e $0,5 \times 10^{-7}$ M, $0,1 \times 10^{-7}$ M e 1×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 2×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 3×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 4×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 5×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 6×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 7×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 8×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 9×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 10×10^{-7} M, $0,1 \times 10^{-6}$ M e $0,5 \times 10^{-6}$ M, $0,1 \times 10^{-6}$ M e 1×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 2×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 3×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 4×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 5
 25

$\times 10^{-6}$ M, 1×10^{-6} M e 6×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 7×10^{-6} M, 1
 $\times 10^{-6}$ M e 8×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 9×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e
 10×10^{-6} M, $0,1 \times 10^{-5}$ M e $0,5 \times 10^{-5}$ M, $0,1 \times 10^{-5}$ M e $1 \times$
 10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 2×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 3×10^{-5} M, $1 \times$
5 10^{-5} M e 4×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e $6 \times$
 10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 7×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 8×10^{-5} M, $1 \times$
 10^{-5} M e 9×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 10×10^{-5} M. Em um avanço
específico, a constante de dissociação do primeiro domínio
que se liga à subunidade ϵ de CD3 é 4×10^{-7} M. Em outro
10 avanço específico, a constante de dissociação do segundo
domínio que se liga a EphA2 está entre $0,1 \times 10^{-12}$ M e $0,5 \times$
 10^{-12} M, $0,1 \times 10^{-12}$ M e 1×10^{-12} M, $0,1 \times 10^{-11}$ M e $0,5 \times 10^{-$
 11 M, $0,1 \times 10^{-11}$ M e 1×10^{-11} M, $0,1 \times 10^{-10}$ M e $0,5 \times 10^{-10}$
M, $0,1 \times 10^{-10}$ M e 1×10^{-10} M, $0,1 \times 10^{-9}$ M e $0,5 \times 10^{-9}$ M,
15 $0,1 \times 10^{-9}$ M e 1×10^{-9} M, $0,1 \times 10^{-8}$ M e $0,5 \times 10^{-8}$ M, $0,1 \times$
 10^{-8} M e 1×10^{-8} M, $0,1 \times 10^{-7}$ M e $0,5 \times 10^{-7}$ M, $0,1 \times 10^{-7}$ M
e 1×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 2×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 3×10^{-7}
M, 1×10^{-7} M e 4×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 5×10^{-7} M, 1×10^{-7}
M e 6×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 7×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 8×10^{-7}
20 M, 1×10^{-7} M e 9×10^{-7} M, 1×10^{-7} M e 10×10^{-7} M, $0,1 \times$
 10^{-6} M e $0,5 \times 10^{-6}$ M, $0,1 \times 10^{-6}$ M e 1×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e
 2×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 3×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 4×10^{-6} M,
 1×10^{-6} M e 5×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 6×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e
 7×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 8×10^{-6} M, 1×10^{-6} M e 9×10^{-6} M,
25 1×10^{-6} M e 10×10^{-6} M, $0,1 \times 10^{-5}$ M e $0,5 \times 10^{-5}$ M, $0,1 \times$
 10^{-5} M e 1×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 2×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e $3 \times$
 10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 4×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 5×10^{-5} M, $1 \times$
 10^{-5} M e 6×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 7×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e $8 \times$
 10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 9×10^{-5} M, 1×10^{-5} M e 10×10^{-5} M. Em

um avanço específico, a constante de dissociação do segundo domínio que se liga a EphA2 é $1,13 \times 10^{-7}$ M. Em outro avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção compreende um primeiro domínio de ligação que se liga à subunidade ϵ de CD3 com uma K_D de 4×10^{-7} M e um segundo domínio de ligação
5 que se liga a EphA2 com uma K_D de $1,13 \times 10^{-7}$ M.

Em avanços específicos, o domínio de ligação a EphA2 de um EphA2-BiTE da invenção possui uma alta constante de afinidade e uma baixa constante de dissociação. Em um
10 avanço alternativo, o domínio de ligação a EphA2 de um EphA2-BiTE da invenção possui uma baixa constante de afinidade e uma alta constante de dissociação. Em outro avanço, o domínio de ligação a EphA2 de um EphA2-BiTE da
15 invenção possui uma alta constante de afinidade e uma alta constante de dissociação. Em outro avanço específico, o domínio de ligação a CD3 de um EphA2-BiTE da invenção se liga à subunidade ϵ de CD3 com uma menor afinidade do que o segundo domínio de ligação que liga EphA2.

20

Em um avanço específico, os EphA2-BiTEs da invenção se ligam primeiro a EphA2 e, então, se ligam a CD3. Em outro avanço específico, os EphA2-BiTEs da invenção provocam a lise de células alvo que expressam EphA2 como medido por
25 testes padrão de citotoxicidade conhecidos na arte ou como descrito abaixo nas Seções 6.2.6 e 6.3. Em um avanço específico, os EphA2-BiTEs da invenção medeiam a lise de células alvo (e.g., células cancerosas, hiperproliferativas não cancerosas ou infectadas que expressam EphA2) em pelo

menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%,
pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos
45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo
menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%,
5 pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo
menos 99% ou pelo menos 1,5 vez, pelo menos 2 vezes, pelo
menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 3,5 vezes,
pelo menos 4 vezes, pelo menos 4,5 vezes, pelo menos 5
vezes, pelo menos 7 vezes ou pelo menos 10 vezes relativo
10 ao nível de expressão de EphA2 nas células normais, células
de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de
células normais, saudáveis que expressem EphA2 como medido
por um teste baseado em citometria de fluxo como descrito
na Seção 6.0 abaixo. Ainda em outro avanço, os EphA2-BiTEs
15 da invenção não ativam (e.g., fosforilam) EphA2 quando
ligados a EphA2 como medido por um teste de
imunoprecipitação/*Western blot* como descrito na Seção 6.0
abaixo. Em um avanço específico, menos de 20%, menos de
15%, ou menos de 5% da população de EphA2s receptores são
20 ativados (e.g., fosforilados) quando ligados a um EphA2-
BiTE da invenção.

A presente invenção provê ainda composições
compreendendo os EphA2-BiTEs da invenção. Em particular, a
25 presente invenção provê composições farmacêuticas
compreendendo os EphA2-BiTEs da invenção e um ou mais
carregadores farmacêuticos ou excipientes. A presente
invenção provê formulações aquosas, formulações
liofilizadas, géis, e implantes cirúrgicos contendo

qualquer dos EphA2-BiTEs da invenção. A presente invenção também provê kits compreendendo um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, em um ou mais recipientes, e instruções para uso de tais EphA2-BiTEs.

5

A presente invenção provê composições e métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar câncer associado com expressão de EphA2 aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade, os métodos compreendendo administrar a um
10 sujeito em necessidade do mesmo um EphA2-BiTE da invenção. Em um avanço específico, a presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar câncer associado com expressão de EphA2 aberrante, os métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma
15 quantidade profilaticamente ou terapeuticamente efetiva de um EphA2-BiTE da invenção.

Em um avanço, o câncer a ser tratado, prevenido e/ou gerenciado é uma célula de origem epitelial. Ainda em outro
20 avanço, as células cancerosas do câncer de um sujeito a ser tratado, prevenido e/ou gerenciado sobre-expressam EphA2 em relação a células normais de dito sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis. Em um avanço preferencial, algum EphA2
25 expressado pelas células cancerosas está ligado a um ligante, tanto como resultado de menos contatos célula-célula, localização subcelular alterada, ou aumento na quantidade de EphA2 relativa ao ligante. Em um avanço

preferencial, o câncer a ser tratado, prevenido e/ou gerenciado é maligno.

Os EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em
5 combinação com uma ou mais terapias para câncer. Em particular, a presente invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar câncer, os métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo, uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente efetiva de
10 um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com a administração de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente efetiva de uma ou mais outras terapias. Exemplos não limitantes de outras terapias incluem quimioterapias, terapias hormonais, terapias
15 biológicas/imunoterapias, radiação e cirurgia.

Expressão aumentada de EphA2 foi vista por ser associada com infecções por certos patógenos intracelulares, em particular, RSV (ver, e.g., U.S. Appn.
20 Ser. No. 11/259.266, preenchida em 27 de outubro de 2005, intitulada "Use of Modulators of EphA2 and EphrinA1 for the Treatment and Prevention of Infections", que é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Dessa forma, a invenção também provê composições e métodos projetados para
25 o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção por patógeno, incluindo, mas não limitado a, uma infecção viral, uma infecção bacteriana, uma infecção fúngica e uma infecção por protozoário (exemplos de tais patógenos são descritos em, e.g., U.S. Appn. Ser. No. 11/259.266,

preenchida em 27 de outubro de 2005, intitulada "Use of Modulators of EphA2 and EphrinA1 for the Treatment and Prevention of Infections", (e em particular, nos parágrafos [006], [0046], [0047], e [0057]) a qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Em particular, a presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção onde a expressão de EphA2 é regulada positivamente em células infectadas (e.g., células infectadas expressando EphA2), ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, e opcionalmente, uma quantidade efetiva de uma terapia que não com EphA2-BiTE. Em um avanço específico, as infecções patogênicas a serem tratadas, prevenidas e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção são infecções patogênicas intracelulares. Em outro avanço específico, a infecção patogênica a ser tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção é uma infecção por RSV.

Em outro aspecto da invenção, a expressão aumentada de EphA2 foi vista por estar associada com certas desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas tais como, por exemplo, aquelas descritas em U.S. Pat. Pub. No. US 2005-0059592 A1, intitulada "EphA2 and Hyperproliferative Cell Disorders", a qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra. Dessa forma, a invenção também provê composições e métodos projetados para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de desordens celulares hiperproliferativas (exemplos não limitantes de tais desordens são descritos

em, e.g., U.S. Pat. Pub. No. 2005-0059592, intitulada "EphA2 and Hyperproliferative Cell Disorders", (e em particular no parágrafo [0035]) que é aqui incorporado por referência em sua íntegra. Em particular, a presente

5 invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem celular hiperproliferativa onde a expressão de EphA2 é regulada positivamente em células afetadas por tal desordem, ditos métodos compreendendo administrar a um

10 sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, e opcionalmente, uma quantidade efetiva de uma terapia sem EphA2-BiTE. Em um avanço específico, a desordem celular hiperproliferativa a ser tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção são asma, COPD, fibrose pulmonar,

15 asbestose, IPF, DIP, PIU, fibrose de rim, fibrose de fígado, outras fibroses, psoríase bronquial hiper-responsiva, psoríase, dermatite seborréica, fibrose cística, ou uma desordem celular hiperproliferativa de endotélio, tal como restenose, doença vascular

20 hiperproliferativa, síndrome de Behcet, aterosclerose, degeneração macular, ou uma desordem de fibroblasto hiperproliferativa.

Os métodos e composições da invenção são úteis não

25 apenas em pacientes com câncer não tratado, mas também são úteis no tratamento de pacientes com câncer parcialmente ou completamente refratários a atuais terapias padrão e experimentais para câncer, incluindo, mas não limitado a quimioterapias, terapias hormonais, terapias biológicas,

imunoterapias, terapias de radiação e/ou cirurgia assim como para melhorar a eficácia de tais tratamentos. Dessa forma, em um avanço preferencial, a invenção provê métodos terapêuticos e profiláticos para o tratamento, prevenção
5 e/ou gerenciamento de câncer que foi comprovado por ser ou pode ser refratário ou não responsivo a terapias que não aquelas compreendendo a administração de EphA2-BiTEs da invenção. Em um avanço específico, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção são administrados a um paciente refratário ou
10 não responsivo a uma terapia não baseada em EphA2-BiTE (i.e., uma terapia que não um EphA2-BiTE) para tornar o paciente não refratário ou responsivo. Em certos avanços, a terapia a qual o paciente foi previamente refratário ou não responsivo pode ser, então, administrada com efeito
15 terapêutico.

Os métodos e composições da invenção são úteis não apenas em pacientes não tratados com uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, mas são também úteis no
20 tratamento de tais pacientes parcialmente ou completamente refratários a terapias padrão e experimentais atuais para desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas, incluindo, mas não limitadas a quimioterapias, terapias hormonais, terapias biológicas, imunoterapias, terapias de
25 radiação e/ou cirurgia assim como para melhorar a eficácia de tais tratamentos. Dessa forma, em um avanço preferencial, a invenção provê métodos terapêuticos e profiláticos para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de desordens celulares hiperproliferativas

não cancerosas que foram vistas por ser ou podem ser refratárias ou não responsivas a terapias que não aquelas compreendendo a administração de EphA2-BiTEs da invenção. Em um avanço específico, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção
5 são administrados a um paciente refratário ou não responsivo a uma terapia não baseada em EphA2-BiTE (i.e., uma terapia que não um EphA2-BiTE) para tornar o paciente não refratário ou responsivo. Em certos avanços, a terapia a qual o paciente foi previamente refratário ou não
10 responsivo pode ser, então, administrada com efeito terapêutico.

Em outro avanço, métodos e composições da invenção são úteis não apenas em pacientes não tratados infectados com
15 um patógeno (e.g., um vírus, bactéria, fungo ou protozoário patógeno), mas são também úteis no tratamento de pacientes parcialmente ou completamente refratários a terapias atuais padrão e experimentais para infecções, incluindo, mas não limitadas a agentes antivirais, antibacterianos,
20 antifúngicos e/ou outros agentes antimicrobianos. Dessa maneira, em um avanço preferencial, a invenção provê métodos terapêuticos e profiláticos para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de infecções que foram vistas por ser ou podem ser refratárias ou não responsivas a
25 terapias que não aquelas compreendendo a administração de EphA2-BiTEs da invenção. Em um avanço específico, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção são administrados a um paciente refratário ou não responsivo a uma terapia não baseada em EphA2-BiTE (i.e., uma terapia que não um EphA2-

BiTE) para tornar o paciente não refratário ou responsivo. Em certos avanços, a terapia na qual o paciente foi previamente refratário ou não responsivo pode ser, então, administrada com efeito terapêutico.

5

Além disso, a presente invenção provê métodos de rastrear EphA2-BiTEs da invenção. Em particular, EphA2-BiTEs podem ser rastreados para ligação a EphA2, particularmente o domínio extracelular de EphA2, e o

10 antígeno CD3 de célula T, usando técnicas imunológicas de rotina tais como, por exemplo, testes radioimuno (RIAs), testes imunossorbentes ligados a enzimas (ELISA), testes de citometria de fluxo e aqueles descritos na Seção 6 abaixo. Em um avanço, para identificar EphA2-BiTEs, EphA2-BiTEs

15 candidatos podem ser rastreados para a habilidade de iniciar lise redirecionada de células alvo EphA2 positivas (e.g., células cancerosas, células hiperproliferativas não cancerosas, ou células infectadas que expressam EphA2). Em outro avanço, EphA2-BiTEs candidatos podem ser rastreados

20 para a habilidade de ter atividade antitumoral *in vivo* (e.g., em um modelo de xenotransplante NOD/SCID de camundongo).

A invenção também provê métodos de rastrear

25 constructos de anticorpos biespecíficos de cadeia simples que se ligam a outros receptores de Eph do tipo A e B, i.e., outros BiTEs receptores de Eph usando os métodos aqui descritos para identificar BiTEs específicos de EphA2. Ver Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90(3):403-4; e Cheng

et al., 2002, Cytokine & Growth Factor Rev. 13:75-85, cada qual é incorporado por referência aqui em sua íntegra, para uma lista dos membros da família de receptores Eph que podem ser usados como alvos para identificar outras
5 moléculas BiTE específicas de receptor Eph.

Em outro avanço, para identificar EphA2-BiTEs que preferencialmente ligam um epitopo EphA2 exposto em células cancerosas, mas não em células não cancerosas, células
10 hiperproliferativas não cancerosas ou em células infectadas, mas não em células não infectadas, EphA2-BiTEs podem ser também rastreados para a habilidade de ligar preferencialmente EphA2 que não está ligado a um ligante, e.g., Ephrin A1, e que não é localizado para contatos
15 célula-célula. Em um avanço específico, a invenção provê métodos para identificar tecido afetado por uma desordem associada com expressão de EphA2 e/ou atividade aberrante, compreendendo usar um EphA2-BiTE da invenção em um teste de exclusão de epitopo (ver, e.g., Seções 6.2.4, 6.3.8 e
20 6.7.2, *infra*). De acordo com este avanço, EphA2-BiTEs da invenção se ligam a epitopos EphA2 acessíveis ou se expõem apenas em células de tecidos afetados por uma desordem associada com expressão de EphA2 e/ou atividade aberrante (e.g., células cancerosas, não cancerosas, células
25 hiperproliferativas ou células infectadas que expressam EphA2), e não células de tecidos normais do mesmo tipo de tecido. Qualquer método conhecido na arte para determinar a ligação/localização de anticorpos em uma célula pode ser usado para rastrear BiTEs candidatos para propriedades de

ligação desejáveis. Em um avanço específico, testes padrão conhecidos na arte, tais como microscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), microscopia de imunofluorescência, citometria de fluxo ou testes de ressonância de *plasmon* de superfície são usados para determinar as características de ligação de um EphA2-BiTE em particular. Neste avanço, EphA2-BiTEs que se ligam fracamente a EphA2 quando este está ligado a seu ligante e localizado em contatos célula-célula, mas se ligam bem a EphA2 livre em uma célula, são englobados pela invenção. Em outro avanço específico, EphA2-BiTEs são selecionados para sua habilidade de competir com ligantes (e.g., ligantes ancorados na célula ou purificados) para ligação a EphA2 usando testes baseados em células ou ELISA.

DEFINIÇÕES

Como aqui usado, o termo "aberrante" no contexto de expressão de EphA2, em certos avanços, refere-se à expressão de EphA2 que é aumentada em uma célula, e.g., uma célula cancerosa, uma célula não cancerosa hiperproliferativa, ou uma célula infectada de um sujeito, relativo ao nível de expressão de EphA2 nas células normais de dito sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis. Expressão aumentada de EphA2 refere-se a um aumento na expressão de EphA2 nas células de um sujeito com uma desordem associada com expressão aberrante de EphA2, relativa ao nível de expressão de EphA2 em células normais

de dito sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis. Em um avanço específico, o nível de expressão de EphA2 na células de um sujeito com uma desordem associada com expressão

5 aberrante de EphA2 é aumentado em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%,

10 pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% ou pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 3,5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 4,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 7 vezes ou pelo menos 10 vezes relativo ao nível de

15 expressão de EphA2 nas células normais de dito sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis, como medido por teste padrão conhecido na arte ou como descrito na Seção 6.0 abaixo (e.g., um teste de citometria de fluxo). Em um avanço

20 específico, a expressão de EphA2 é aumentada em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo

25 menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% ou pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 3,5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 4,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 7 vezes ou pelo menos 10 vezes em uma célula

cancerosa, uma célula não cancerosa hiperproliferativa, ou uma célula infectada, relativa ao nível de expressão de EphA2 nas células normais de dito sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis, como medido por teste padrão conhecido na arte ou como descrito na Seção 6.0 abaixo (e.g., um teste de citometria de fluxo). Em outro avanço, o termo "aberrante" no contexto de expressão de EphA2 refere-se à expressão de EphA2, caracterizada pelo fato de que certos epitopos de EphA2 são seletivamente expostos em uma célula cancerosa, uma célula não cancerosa hiperproliferativa, ou uma célula infectada de um sujeito, e não em células normais de dito sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis.

Em outro avanço, o termo "aberrante" no contexto de expressão de EphA2 refere-se à expressão de EphA2, caracterizada pelo fato de que a localização subcelular de EphA2 é alterada em uma célula (at, e.g., sítios que não os sítios de contato célula-célula), como medido por teste padrão conhecido na arte ou por métodos descritos na Seção 6 abaixo, tais como, por exemplo, marcação por imunofluorescência.

Como aqui usado, o termo "agente" refere-se a uma molécula que possui um efeito biológico desejado. Agentes incluem, mas não estão limitados a, moléculas protéicas (e.g., peptídeos, polipeptídeos, proteínas e anticorpos (e.g., anticorpos biespecíficos de cadeia simples)), vacinas, moléculas pequenas (de menos de 1000 dáltons),

compostos inorgânicos ou orgânicos, e moléculas de ácidos nucleicos (incluindo, mas não limitadas, DNA de dupla fita ou fita simples, ou RNA de dupla fita ou fita simples (e.g., anti-senso, RNAi, etc.), aptâmeros, assim como
5 moléculas de ácidos nucleicos de hélice tripla). Agentes podem ser derivados ou obtidos de qualquer organismo conhecido (incluindo, mas não limitado a, animais (e.g., mamíferos (humanos e mamíferos não humanos)), plantas, bactérias, fungos, e protistas, ou vírus) ou de uma
10 biblioteca de moléculas sintéticas.

Como aqui usado, o termo "análogo" no contexto de um agente protéico (e.g., a peptídeo, polipeptídeo, proteína ou anticorpo) refere-se a um agente protéico que possui uma
15 função similar ou idêntica como um segundo protéico, mas não necessariamente compreende uma sequência de aminoácidos similar ou idêntica ou estrutura do segundo agente protéico. Um agente protéico que possui uma sequência de aminoácidos similar refere-se a um agente protéico que
20 satisfaz pelo menos um dos seguintes: (a) um agente protéico tendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo
25 menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de um segundo agente protéico; (b) um agente protéico codificado por uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições estridentes a uma sequência de nucleotídeos codificando um

segundo agente protéico de pelo menos 20 resíduos de aminoácidos, pelo menos 30 resíduos de aminoácidos, pelo menos 40 resíduos de aminoácidos, pelo menos 50 resíduos de aminoácidos, pelo menos 60 resíduos de aminoácidos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos, pelo menos 100 resíduos de aminoácidos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos, ou pelo menos 150 resíduos de aminoácidos; e (c) um agente protéico codificado por uma sequência de nucleotídeos que é menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de nucleotídeos codificando um segundo agente protéico. Um agente protéico com estrutura similar a um segundo agente protéico refere-se a um agente protéico que possui uma estrutura secundária, terciária ou quaternária similar do segundo agente protéico. A estrutura de um agente protéico pode ser determinada por métodos conhecidos daqueles especialistas na arte, incluindo, mas não limitados a, cristalografia de raio X, ressonância magnética nuclear, e microscopia eletrônica cristalográfica. Preferencialmente, um agente protéico da invenção possui atividade EphA2-BiTE.

25

Para determinar a identidade percentual de duas seqüências de aminoácidos ou de duas seqüências de ácidos nucléicos, as seqüências são alinhadas para propósitos de comparação ótima (e.g., espaços podem ser introduzidos na

seqüência de uma primeira seqüência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos para alinhamento ótimo com uma segunda seqüência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos). Os resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos nas posições de aminoácidos ou posições de nucleotídeos correspondentes são, então, comparadas. Quando uma posição na primeira seqüência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo que a posição correspondente na segunda seqüência, então, as moléculas são idênticas naquela posição. A identidade percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (i.e., % identidade = número de posições idênticas se sobrepondo / número total de posições x 100%). Em um avanço, as duas seqüências são do mesmo tamanho.

15

A determinação de identidade percentual entre duas seqüências pode ser também conseguida usando um algoritmo matemático. Um exemplo preferido não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas seqüências é o algoritmo de Karlin and Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2264-2268, modificado como em Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873-5877. Tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403. Buscas BLAST de nucleotídeos podem ser efetuadas com os parâmetros do programa NBLAST nucleotide estabelecidos em, e.g., para pontuação=100, comprimento de palavra=12 para obter seqüências de nucleotídeos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção.

25

Buscas BLAST de proteínas podem ser efetuadas com os parâmetros do programa XBLAST estabelecidos em, e.g., para pontuação=50, comprimento de palavra=3 para obter seqüências de aminoácidos homólogas a moléculas de proteínas da presente invenção. Para obter alinhamentos espaçados para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Alternativamente, PSI-BLAST pode ser usado para efetuar uma busca iterada que detecta relações distantes entre moléculas (*Id.*). Quando utilizando os programas BLAST, Gapped BLAST, e PSI-Blast, os parâmetros padrão dos respectivos programas (e.g., de XBLAST e NBLAST) podem ser usados (ver, e.g., o sítio eletrônico da NCBI). Outro exemplo preferido não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de seqüências é o algoritmo de Myers and Miller, 1988, *CABIOS* 4: 11-17. Tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que é parte do pacote de software GCG de alinhamento de seqüências. Quando utilizando o programa ALIGN para comparar seqüências de aminoácidos, uma tabela de peso de resíduo PAM120, uma penalidade de extensão de espaço de 12, e uma penalidade de espaço de 4 podem ser usados.

25 A identidade percentual entre duas seqüências pode ser determinada usando técnicas similares àquelas descritas acima, com o sem espaços permitidos. Quando calculando a identidade percentual, tipicamente apenas as correspondências exatas são contadas.

Como aqui usado, o termo "análogo" no contexto de um análogo não protéico refere-se a uma segunda molécula orgânica ou inorgânica que possui uma função similar ou
5 idêntica de uma primeira molécula orgânica ou inorgânica e é estruturalmente similar à primeira molécula orgânica ou inorgânica.

Como aqui usado, os termos "anticorpo" ou "anticorpos" referem-se a moléculas que contêm um sítio de ligação de antígeno, e.g., moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina que contêm um sítio de ligação de antígeno. Moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo (e.g., IgG, IgE,
15 IgM, IgD, IgA e IgY), classe (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou uma subclasse de molécula de imunoglobulina. Anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos sintéticos, anticorpos monoclonais, anticorpos de domínio simples, anticorpos de cadeia
20 simples, anticorpos produzidos de forma recombinante, anticorpos multiespecíficos (incluindo anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, intracorpos, scFvs (e.g., incluindo monoespecífico e biespecífico, etc.), fragmentos Fab,
25 F(ab') fragmentos, Fvs ligados a dissulfetos (sdFv), (anti-Id) anticorpos anti-idiotípicos, e fragmentos se ligando a epitopos de qualquer de acima.

Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção é um anticorpo biespecífico de cadeia simples que compreende: (1) um primeiro domínio de ligação que compreende um domínio variável pesado (VH) e um domínio variável leve (VL) de um anticorpo que se liga imunoespecificamente ao antígeno CD3 de célula T; e (2) um segundo domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a EphA2. Em outro avanço específico, o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação de um EphA2-BiTE da invenção compreende, cada um, uma única cadeia Fv (scFv). O domínio variável pesado e/ou domínio variável leve do primeiro domínio de ligação de um EphA2-BiTE pode ser obtido ou derivado de qualquer tipo de anticorpo que se liga imunoespecificamente a CD3. O domínio variável pesado e/ou domínio variável leve do segundo domínio de ligação de um EphA2-BiTE pode ser obtido ou derivado de qualquer tipo de anticorpo que se liga imunoespecificamente a EphA2. Exemplos não limitantes dos tipos de anticorpos incluem anticorpos sintéticos, anticorpos monoclonais, anticorpos de domínio simples, anticorpos de cadeia simples, anticorpos produzidos de forma recombinante, anticorpos multiespecíficos (incluindo anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, intracorpos, scFvs (e.g., incluindo monoespecífico e biespecífico, etc.), fragmentos Fab, F(ab'), Fvs ligados a dissulfetos (sdFv), (anti-Id) anticorpos anti-idiotípicos, e fragmentos se ligando a epitopos de qualquer de acima.

Como aqui usado, o termo "domínio de ligação" refere-se a um domínio compreendendo uma estrutura tridimensional capaz de se ligar imuno especificamente a um epitopo. Assim, em um avanço, dito domínio pode compreender o

5 domínio VH e/ou VL de uma cadeia de anticorpo, preferencialmente pelo menos o domínio VH. Em outro avanço, o domínio de ligação pode compreender pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) de uma cadeia de anticorpo reconhecendo os antígenos EphA2 e CD3,

10 respectivamente. A respeito disso, é notado que os domínios dos domínios de ligação presentes no EphA2-BiTE da invenção podem não ser apenas derivados de anticorpos, mas também de outras proteínas de ligação de EphA2 ou CD3, tais receptores de superfície naturalmente ocorrentes ou

15 ligantes.

Como aqui usado, os termos "desimunizado", "desimunização" ou variantes gramaticalmente relacionados desses denotam uma modificação do primeiro e/ou segundo

20 domínio de ligação vis-à-vis um constructo original de tipo selvagem tornando dito constructo de tipo selvagem não imunogênico ou menos imunogênico em humanos. Abordagens de desimunização são bem conhecidas na arte e são descritas em, e.g., International Pub. Nos. WO 00/34317 (em em

25 particular, pp. 1-14); WO 98/52976 (e em particular, Exemplos 1-6 nas pp. 18-38); WO 02/079415 (e em particular, pp. 2-8 e Exemplos 1-10 nas pp. 15-43); e WO 92/10755 (e em particular, pp. 6-9), cada qual é incorporada por referência aqui em sua íntegra. O termo "desimunizado"

também está relacionado a constructos, que apresentam propensão a gerar epitopos de células T. De acordo com esta invenção, o termo "propensão reduzida para gerar epitopos de células T" está relacionado à remoção de epitopos de células T levando a ativação específica de células T. Além do mais, "propensão reduzida para gerar epitopos de células T" refere-se à substituição de aminoácidos contribuindo para a formação de epitopos de células T, i.e., substituição de aminoácidos que são essenciais para a formação de um epitopo de célula T. Em outras palavras, "propensão reduzida para gerar epitopos de células T" está relacionada a imunogenicidade reduzida ou capacidade reduzida de induzir a proliferação de células T dependente de antígeno. O termo epitopo de célula T está relacionado a seqüências peptídicas curtas que podem ser liberadas durante a degradação de peptídeos, polipeptídeos ou proteínas em células e subseqüentemente apresentado por moléculas do principal complexo de histocompatibilidade (MHC) para dar início à ativação de células T (ver, e.g., International Pub. No. WO 02/066514, que é incorporada por referência aqui na sua íntegra). Para peptídeos apresentados por MHC classe II, tal ativação de células T pode, então, dar início a uma resposta de anticorpo por estimulação direta de células B para produzir ditos anticorpos. "propensão reduzida para gerar epitopos de células T" e/ou "desimunização" pode ser medido por técnicas conhecidas na arte. Preferencialmente, a desimunização de proteínas pode ser testada *in vitro* por um teste de proliferação de célula T. Nesse teste, células

mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de doadores representando >80% de alelos HLA-DR no mundo são rastreadas para proliferação em resposta tanto a peptídeos de tipo selvagem ou desimunizados. De maneira ideal, a

5 proliferação de células é apenas detectada com o carregamento das células apresentando antígeno com peptídeos de tipo selvagem. Alternativamente, a desimunização pode ser testada expressando-se tetrâmeros HLA-DR representando todos haplótipos. Esses tetrâmeros

10 podem ser testados para ligação de peptídeos ou carregados com peptídeos substitutos para células apresentando antígeno em testes de proliferação. Para determinar se peptídeos desimunizados são apresentados em haplótipos HLA-DR, a ligação de, e.g., peptídeos rotulados por fluorescência em

15 PBMCs pode ser medida. Adicionalmente, a desimunização pode ser confirmada determinando-se se anticorpos contra as moléculas desimunizadas foram formados após a administração em pacientes. Preferencialmente, moléculas derivadas de anticorpo são desimunizadas nas regiões ferramenta e a

20 maioria das regiões CDR não é modificada para gerar propensão reduzida a induzir epítopos de células T, de forma que a afinidade de ligação das regiões CDR não seja afetada. Mesmo a eliminação de um epítopo de célula T resulta em imunogenicidade reduzida. Em avanços

25 específicos, a imunogenicidade do domínio de ligação que se liga a um antígeno de interesse (e.g., CD3) é reduzida em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%,

pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou pelo menos 100% comparado a um polipeptídeo ou proteína controle não imunizados ou fragmento desses, como
5 medido por teste padrão descrito acima (e.g., um teste de proliferação de célula T) ou conhecido na arte. Em resumo, as abordagens discutidas acima ajudam a reduzir a imunogenicidade dos anticorpos terapêuticos biespecíficos de cadeia simples (e.g., EphA2-BiTEs) aqui descritos quando
10 eles são administrados a pacientes tendo uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas e infecções). Por exemplo, o primeiro domínio de ligação que se liga à subunidade épsilon de CD3 é
15 desimmunizado. Preferencialmente, o arranjo das regiões variáveis nesse domínio de ligação a CD3 é VH-VL.

Como aqui usado, o termo "derivado" no contexto de um agente protéico (e.g., proteínas, polipeptídeos, peptídeos,
20 e anticorpos) refere-se a um agente protéico que compreende a sequência de aminoácidos que foi alterada pela introdução de substituições, deleções, e/ou adições de resíduos de aminoácidos. O termo "derivado" como aqui usado também se refere a um agente protéico que foi modificado, i.e., pela
25 anexação covalente de qualquer tipo de molécula para o agente protéico. Por exemplo, mas não por meio de limitação, um derivado de um agente protéico pode ser produzido, e.g., por glicosilação, acetilação, pegilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos de

proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Um derivado de um agente protéico pode ser também produzido por modificações químicas usando técnicas conhecidas
5 daqueles especialistas na arte, incluindo, mas não limitado a clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Ainda, um derivado de um agente protéico pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos. Um derivado de um agente protéico possui
10 uma função(ões) idêntica(s) ao agente protéico do qual é derivado.

Como aqui usado, o termo "derivado" no contexto de um derivado não protéico refere-se a uma segunda molécula
15 orgânica ou inorgânica que é formada baseada na estrutura de uma primeira molécula orgânica ou inorgânica. Um derivado de uma molécula orgânica inclui, mas não é limitado a, uma molécula modificada, e.g., pela adição ou deleção de uma hidroxila, grupo metil, etil, carboxil,
20 nitril, ou amina. Uma molécula orgânica pode também, por exemplo, ser esterificada, alquilada e/ou fosforilada.

Como aqui usado, o termo "quantidade efetiva" refere-se à quantidade de uma terapia (e.g., um agente terapêutico
25 ou profilático) que é suficiente para reduzir e/ou melhorar a severidade e/ou duração de uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2, ou um sintoma dessa, prevenir o avanço de dita desordem, causar a regressão de dita desordem, prevenir a recorrência,

desenvolvimento, ou começo de um ou mais sintomas associados com dita desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2, ou intensificar ou melhorar o(s) efeito(s) profilático(s) ou terapêutico(s) de outra
5 terapia (e.g., outro agente terapêutico ou profilático).

Como aqui usado, os termos "pessoa idosa", "idoso," ou variações desses referem-se a um ser humano de 65 anos de idade ou mais velho, preferencialmente de 70 anos de idade
10 ou mais velho.

Como aqui usado, o termo "ligante endógeno" ou "ligante natural" refere-se a uma molécula que se liga normalmente a um receptor *in vivo* em particular. Por
15 exemplo, EphrinA1 é um ligante endógeno de EphA2.

Como aqui usado, o termo "polipeptídeo EphA2" refere-se a EphA2, um análogo, derivado ou um fragmento desse, ou uma proteína de fusão compreendendo EphA2, um análogo,
20 derivado ou um fragmento dessa. O EphA2 polipeptídeo pode ser de qualquer espécie. Em um avanço específico, o polipeptídeo EphA2 é humano. Em certos avanços, o termo "polipeptídeo EphA2" refere-se à forma madura, processada de EphA2. Em outros avanços, o termo "polipeptídeo EphA2"
25 refere-se a uma forma imatura de EphA2. De acordo com este avanço, os anticorpos da invenção se ligam imunoespecificamente à porção da forma imatura de EphA2 que corresponde à forma madura, processada de EphA2. Em um avanço específico, o termo "polipeptídeo EphA2" refere-se

ao domínio extracelular de EphA2 ou um fragmento desse. Em certos avanços, no contexto de uma célula, um EphA2-BiTE da invenção se liga ao domínio extracelular (*i.e.*, um epitopo de EphA2 que está exposto na superfície da célula) de um
 5 EphA2.

As seqüências de nucleotídeos e/ou aminoácidos de polipeptídeos EphA2 podem ser encontradas na literatura ou bases de dados públicas, ou as seqüências de nucleotídeos
 10 e/ou aminoácidos podem ser determinadas usando técnicas de clonagem e seqüenciamento conhecidas daqueles especialistas na arte. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos de EphA2 humano podem ser encontradas na base de dados do GenBank (ver, *e.g.*, números de acesso *Accession*
 15 Nos. BC037166, M59371 e M36395). A seqüência de aminoácidos de EphA2 humano pode ser encontrada na base de dados do GenBank (ver, *e.g.*, números de acesso *Accession* Nos. AAH37166 e AAA53375). Exemplos adicionais não limitantes de seqüências de aminoácidos de EphA2 são
 20 listados na seguinte tabela.

Espécie	Número de acesso do GenBank - <i>Accession</i> No.
Camundongo	NP 034269, AAH06954
Rato	XP 345597

Como aqui usado, o termo "epitopo" refere-se a sítios ou fragmentos de um polipeptídeo ou proteína tendo

atividade antigênica ou imunogênica em um animal, preferencialmente em um mamífero, e mais preferencialmente em um humano. Em avanços específicos, o termo "epitopo" refere-se a um fragmento de um polipeptídeo EphA2 ou um
5 fragmento de um polipeptídeo CD3 tendo atividade antigênica ou imunogênica em um animal, preferencialmente em um mamífero, e mais preferencialmente em um humano. Um epitopo tendo atividade imunogênica é um sítio ou fragmento de um polipeptídeo ou proteína que evoca uma resposta de
10 anticorpo em um animal. Em avanços específicos, um epitopo tendo atividade imunogênica é um fragmento de um polipeptídeo EphA2 ou um fragmento de um polipeptídeo CD3 que evoca uma resposta de anticorpo em um animal. Um epitopo tendo atividade antigênica é um sítio ou fragmento
15 de um polipeptídeo ou proteína ao qual um anticorpo se liga imuno-especificamente como determinado por qualquer método bem conhecido de um especialista na arte, por exemplo, por testes imuno, tais como testes RIAs ou ELISA. Em avanços específicos, um epitopo tendo atividade antigênica é um
20 fragmento de um polipeptídeo EphA2 ou um fragmento de um polipeptídeo CD3 ao qual um anticorpo se liga imuno-especificamente como determinado por qualquer método bem conhecido na arte, por exemplo, por testes imuno. Epitopos antigênicos não precisam ser necessariamente
25 imunogênicos.

Como aqui usado, o termo "fragmento" no contexto de um agente protéico refere-se a um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de pelo menos 5

resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 30 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 40 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 60 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 100 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 150 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 175 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 200 resíduos de aminoácidos contíguos, ou pelo menos 250 resíduos de aminoácidos contíguos de outro polipeptídeo ou proteína. Em um avanço específico, o termo "fragmento" no contexto de um agente protéico refere-se a um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos variando de 10 a 15, 10 a 20, 10 a 30, 10 a 40, 10 a 50, 10 a 60, 10 a 70, 10 a 80, 10 a 100, 10 a 125, 10 a 150, 10 a 175, 10 a 200, 10 a 250, ou 10 a 300 resíduos de aminoácidos contíguos de outro polipeptídeo ou proteína.

25

Em um avanço específico, um fragmento é um fragmento de EphA2, ou um anticorpo que se liga imunoesspecificamente a um EphA2. Em outro avanço específico, um fragmento é um fragmento de CD3 ou um anticorpo que se liga

imunoespecificamente a CD3. Em um avanço, um fragmento de uma proteína ou polipeptídeo retém pelo menos uma função da proteína ou polipeptídeo. Em outro avanço, um fragmento de um polipeptídeo ou proteína retém pelo menos duas, três, 5 quatro ou cinco funções do polipeptídeo ou proteína. Em um avanço preferencial, um fragmento de um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo EphA2 ou fragmento desse retém a habilidade para se ligar imunoespecificamente a um polipeptídeo EphA2 ou fragmento 10 desse. Em outro avanço preferencial, um fragmento de um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 ou fragmento desse retém a habilidade de se ligar imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 ou fragmento desse. Preferencialmente, fragmentos de 15 anticorpo são fragmentos que se ligam a epitopos.

Como aqui usado, o termo "proteína de fusão" refere-se a um polipeptídeo ou proteína que compreende a sequência de aminoácidos de um primeiro polipeptídeo ou proteína ou 20 fragmento, análogo ou derivado desse, e a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo heterólogo ou proteína (i.e., um segundo polipeptídeo ou proteína ou fragmento, análogo ou derivado desse diferente do primeiro polipeptídeo ou proteína ou fragmento, análogo ou derivado 25 desse, ou não normalmente parte do primeiro polipeptídeo ou proteína ou fragmento, análogo ou derivado desse). Em um avanço, uma proteína de fusão compreende um agente terapêutico ou profilático fusionado a uma proteína heteróloga, polipeptídeo ou peptídeo. De acordo com este

avanço, a proteína heteróloga, polipeptídeo ou peptídeo pode ou não ser um tipo diferente de agente terapêutico ou profilático. Por exemplo, duas proteínas, polipeptídeos, ou peptídeos diferentes com atividade imunomoduladora podem
5 ser fusionadas juntas para formar a proteína de fusão. Em um avanço preferencial, proteínas de fusão retêm ou possuem atividade melhorada relativa à atividade do polipeptídeo ou proteína original antes de ser fusionada a uma proteína heteróloga, polipeptídeo, ou peptídeo. Em um avanço
10 específico, uma proteína de fusão compreende um primeiro domínio de ligação que se liga ao antígeno CD3 de célula T e um segundo domínio de ligação que se liga a um antígeno de interesse (e.g., EphA2). De acordo com este avanço, uma proteína de fusão é um EphA2-BiTE.

15

Como aqui usado, o termo "anticorpo humanizado" refere-se a formas de anticorpos não humanos (e.g., murinos), preferencialmente anticorpos quiméricos, os quais contêm seqüência mínima derivada de imunoglobulina não
20 humana. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nos quais resíduos de região hipervariável ou de determinação de complementaridade (CDR) do recipiente são substituídos por resíduos de região hipervariável ou resíduos CDR de um
25 anticorpo de uma espécie não humana (anticorpo de doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas. Em algumas instâncias, um ou mais resíduos de regiões ferramenta (FR) da imunoglobulina humana são substituídos

por resíduos não humanos correspondentes ou outros resíduos baseado em modelagem estrutural, e.g., para melhorar a afinidade do anticorpo humanizado. Adicionalmente, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não
5 são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo de doador. Essas modificações são feitas para melhor refinar a performance de anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais
10 todas das regiões hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas das FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá, opcionalmente, pelo menos um fragmento de uma
15 região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para maiores detalhes em relação a métodos de humanização de embaralhamento de ferramentas, ver Dall'Acqua et al., 2005, *Methods* 36:43-60, Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al.,
20 1988, *Nature* 332:323-329; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596; e Queen et al., U.S. Patent No. 5.585.089, e US Pat. Pub. No. 2005-0048617 A1, cada qual é incorporada por referência aqui em sua íntegra.

25 Como aqui usado, o termo "hibridiza sob condições estridentes" descreve condições para hibridização e lavagem sob as quais sequências de nucleotídeos pelo menos 30% (preferencialmente, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98%) idênticas uma à outra

tipicamente permanecem hibridizadas uma à outra. Tais condições estridentes são conhecidas daqueles especialistas na arte e podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Geralmente, condições estridentes são selecionadas para serem cerca de 5 a 10°C menores do que o ponto térmico de derretimento (T_m) para a sequência específica em uma determinada força iônica e pH. A T_m é a temperatura (sob força iônica definida, pH, e concentração nucléica) na qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam à sequência alvo em equilíbrio (já que as sequências alvo estão presentes em excesso, na T_m , 50% das sondas são ocupadas no equilíbrio). Condições estridentes serão aquelas nas quais a concentração de sais é de menos do que cerca de 1,0 M de íons de sódio, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0 M de concentração de íons de sódio (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (por exemplo, maiores do que 50 nucleotídeos). Condições estridentes podem ser também conseguidas com a adição de agentes desestabilizantes, por exemplo, formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo é pelo menos duas vezes a base de hibridização, preferencialmente 10 vezes a base de hibridização.

Em um exemplo não limitante, condições de hibridização estringentes são hibridização a 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,1X SSC, 0,2% SDS a cerca de 68°C. Em um
5 exemplo preferido, não limitante, condições de hibridização estringentes são hibridização em 6X SSC a cerca de 45°C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 0,1% SDS a 50-65°C (i.e., uma ou mais lavagens a 50°C, 55°C, 60°C ou 65°C). É entendido que os ácidos nucleicos da invenção não
10 incluem moléculas de ácidos nucleicos que hibridizam sob essas condições apenas a uma sequência de nucleotídeos consistindo de apenas nucleotídeos A ou T.

Como aqui usado, o termo "região hipervariável"
15 refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo os quais são responsáveis para ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "Região de Determinação de Complementaridade" ou "CDR" (i.e. resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no
20 domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um "loop
25 hipervariável " (i.e. resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Resíduos de "Região Ferramenta" ou "FR" são aqueles

resíduos de domínio variável que não os resíduos de região hipervariável como aqui definido.

Como aqui usado, o termo "agente imunomodulador" refere-se a um agente que modula um sistema imunológico de um sujeito. Em particular, um agente imunomodulador é um agente que altera a habilidade de um sistema imunológico de um sujeito para responder a um ou mais antígenos estrangeiros. Em um avanço específico, um agente imunomodulador é um agente que muda um aspecto de uma resposta de sistema imunológico de um sujeito. Em um avanço preferencial da invenção, um agente imunomodulador é um agente que inibe ou reduz uma resposta de sistema imunológico de um sujeito (i.e., um agente imunossupressor).

15

Como aqui usado, o termo "se liga imuno-especificamente a EphA2" e termos análogos no contexto de anticorpos anti-EphA2, EphA2-BiTEs, e domínios de ligação de EphA2-BiTEs, referem-se a agentes protéicos, incluindo anticorpos (e.g., EphA2-BiTEs os quais são anticorpos biespecíficos de cadeia simples) e os domínios de ligação de EphA2-BiTEs (e.g., scFvs de EphA2-BiTEs os quais são anticorpos biespecíficos de cadeia simples) que se ligam especificamente a um polipeptídeo EphA2, e não se ligam especificamente a polipeptídeos não EphA2. Preferencialmente, anticorpos e domínios de ligação de EphA2-BiTEs que se ligam especificamente a um polipeptídeo EphA2 não reagem com outros antígenos não relacionados. Em avanços específicos, anticorpos anti-EphA2 da invenção se ligam a um

polipeptídeo EphA2 com pouca ou nenhuma reatividade cruzada com outros antígenos não relacionados, como medido por teste padrão conhecido na arte, tal como um teste ELISA. Em certos avanços, anticorpos e domínios de ligação de

5 EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 podem reagir cruzadamente com antígenos relacionados (e.g., outros tipos de receptores de Eph da família A e/ou B de receptores de Eph). Um peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo ou domínio de ligação que

10 se liga imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 pode ser ligar a outros peptídeos, polipeptídeos, ou proteínas com menor afinidade como determinado por, e.g., testes imuno ou outros testes conhecidos na arte para detectar a afinidade de ligação. Anticorpos ou domínios de ligação

15 que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 podem reagir cruzadamente com antígenos relacionados. Preferencialmente, anticorpos ou fragmentos desses que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 podem ser identificados, por exemplo, por testes imuno ou outras

20 técnicas conhecidas daqueles especialistas na arte. Um anticorpo, ou fragmento desse, se liga especificamente a um polipeptídeo EphA2 quando este se liga a um polipeptídeo EphA2 com maior afinidade do que a qualquer antígeno reativo como determinado usando técnicas experimentais,

25 tais como testes radioimuno (RIAs) e testes imunossorventes ligados a enzimas (ELISAs). See, e.g., Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York nas páginas 332-336 para uma discussão relacionada a especificidade de anticorpo. Em outro avanço, um anticorpo

que se liga a um polipeptídeo EphA2, que é uma proteína de fusão, se liga imuno especificamente ao fragmento da proteína de fusão que é um polipeptídeo EphA2. Preferencialmente, anticorpos e domínios de ligação de EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 modulam apenas uma atividade(s) EphA2 e não afetam significativamente outras atividades. Em um avanço específico, anticorpos e domínios de ligação de EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 são preferencialmente anticorpos de cadeia simples (e.g., scFvs compreendendo um domínio VH e um domínio VL), que podem ter uma baixa taxa de K_{off} (e.g., K_{off} menor do que $3 \times 10^{-2} s^{-1}$).

Como aqui usado, o termo "se liga imuno especificamente a CD3" e termos análogos referem-se a agentes protéicos que se ligam especificamente a CD3 ou a uma subunidade dessa, e não se ligam especificamente a outros antígenos. Preferencialmente, anticorpos e domínios de ligação de EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a CD3 não reagem cruzadamente com antígenos não relacionados.

Como aqui usado, o termo "em combinação" no contexto de administração de uma terapia refere-se ao uso de mais de uma terapia. O uso do termo "em combinação" não restringe a ordem na qual as terapias são administradas a um sujeito com uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2. Uma primeira terapia pode ser administrada antes (e.g., 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos,

30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, ou 12 semanas antes), concomitantemente ou
5 concorrentemente com, ou subsequente a (e.g., 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, ou 12 semanas depois) a
10 administração de uma segunda terapia a um sujeito que tinha, tem, ou é susceptível a uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2. Qualquer terapia adicional pode ser administrada em qualquer ordem com as outras terapias adicionais. Em certos avanços,
15 EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em combinação com uma ou mais terapias (e.g., peptídeos que não EphA2-BiTEs atualmente administrados para tratar, prevenir e/ou gerenciar a desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2, tais como, por exemplo,
20 agentes analgésicos, agentes anestésicos, antibióticos, agentes antivirais, agentes antifúngicos, agentes anti-protozoários, agentes imunomoduladores).

Como aqui usado, os termos "aumentado" ou "sobre-
25 expressado" ou "sobre-expressão" com respeito à expressão de EphA2 refere-se a um aumento na expressão de EphA2 na células de um sujeito com uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2, relativa ao nível de expressão de EphA2 em células normais de dito

sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população de células normais, saudáveis como medido por qualquer método conhecido na arte, incluindo mas não limitado a testes RIAs, ELISA, análise de *Western Blot*,
5 citometria de fluxo, ou imunohistoquímica usando anticorpos que se ligam imuno especificamente a EphA2. Em um avanço específico, o nível de expressão de EphA2 na células de um sujeito com uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 é aumentado em pelo menos 10%,
10 pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% ou
15 pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 3,5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 4,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 7 vezes ou pelo menos 10 vezes relativo ao nível de expressão de EphA2 nas células normais de dito sujeito,
20 células de um sujeito normal, saudável e/ou a população de células normais, saudáveis.

Como aqui usado, os termos "criança" ou "infantil" ou variações desses referem-se a um ser humano de menos de 24
25 meses de idade, preferencialmente de menos de 12 meses, de menos de 6 meses, de menos de 3 meses, de menos de 2 meses, ou de menos de 1 mês de idade.

Como aqui usado, os termos "criança nascida prematuramente," ou "criança prematura", ou variações desses, referem-se a um ser humano nascido com menos de 40 semanas de tempo de gestação, preferencialmente menos de 35
5 semanas de tempo de gestação, quem é de menos de 6 meses de idade, preferencialmente menos de 3 meses de idade, mais preferencialmente menos de 2 meses de idade, e mais preferencialmente menos de 1 mês de idade.

10 Como aqui usado, o termo "isolado" no contexto de uma molécula orgânica ou inorgânica (seja uma molécula pequena ou grande), que não um agente protéico ou um ácido nucléico, refere-se a uma molécula orgânica ou inorgânica substancialmente livre de uma molécula orgânica ou
15 inorgânica diferente. Preferencialmente, uma molécula orgânica ou inorgânica é 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 99% livre de uma segunda molécula orgânica ou inorgânica diferente. Em um avanço preferencial, uma molécula orgânica e/ou inorgânica é isolada.

20

Como aqui usado, o termo "isolado" no contexto de um agente protéico (e.g., um peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão, ou anticorpo) refere-se a um agente protéico que é substancialmente livre de material celular ou proteínas
25 contaminantes da fonte de células ou tecidos dos quais é derivado, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos quando quimicamente sintetizado. A frase "substancialmente livre de material celular" inclui preparações de um agente protéico nas quais o agente

protéico é separado de componentes celulares das células das quais é isolado ou produzido recombinantemente. Assim, um agente protéico que é substancialmente livre de material celular inclui preparações de um agente protéico tendo
5 menos do que cerca de 30%, 20%, 10%, ou 5% (por peso seco) de proteína heteróloga, polipeptídeo, peptídeo, ou anticorpo (também referidos como uma "proteína contaminante"). Quando o agente protéico é recombinantemente produzido, ele é também preferencialmente
10 substancialmente livre de meio de cultura, *i.e.*, o meio de cultura representa menos de cerca de 20%, 10%, ou 5% do volume da preparação de agente protéico. Quando o agente protéico é produzido por síntese química, ele é preferencialmente substancialmente livre de precursores
15 químicos ou outros químicos, *i.e.*, é separado de precursores químicos ou outros químicos que são envolvidos na síntese do agente protéico. Dessa maneira, tais preparações de um agente protéico possuem menos do que cerca de 30%, 20%, 10%, 5% (por peso seco) de precursores
20 químicos ou compostos que não o agente protéico de interesse. Em um avanço específico, agentes protéicos aqui descritos são isolados. Em um avanço preferencial, uma molécula EphA2-BiTE da invenção é isolada.

25 Como aqui usado, o termo "isolado" no contexto de moléculas de ácidos nucleicos refere-se a uma molécula de ácido nucleico que é separada de outras moléculas de ácidos nucleicos que estão presentes na fonte natural da molécula de ácido nucleico. Além do mais, uma molécula de ácido

nucléico "isolada", tal como uma molécula de DNAC, é preferencialmente substancialmente livre de outro material celular, ou meio de cultura quando produzida por técnicas recombinantes, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos quando sintetizadas quimicamente. Em um avanço específico, moléculas de ácidos nucleicos são isoladas. Em um avanço preferencial, uma molécula de ácido nucleico codificando uma molécula EphA2-BiTE da invenção é isolada.

10

Como aqui usado, o termo "baixa tolerância" refere-se a um estado no qual o paciente sofre de efeitos colaterais da(s) terapia(s) de forma que o paciente não se beneficia da terapia e/ou não continua a terapia por causa dos efeitos adversos e/ou o dano dos efeitos colaterais superam o benefício do tratamento.

20

Como aqui usado, os termos "administrar", "administrando" e "administração" referem-se aos efeitos benéficos que um sujeito recebe de uma terapia, que não resulta em uma cura de uma desordem. Em certos avanços, a um sujeito é administrado uma ou mais terapias para "administrar" uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção) de forma a prevenir a progressão ou piora da desordem (i.e., segura o progresso da doença).

25

Como aqui usado, o termo "fenótipo celular causador de patologia" refere-se a uma função que uma célula afetada por uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 que causa ou contribui para o estado patológico de dita desordem. Fenótipos celulares causadores de patologia incluem, mas não estão limitados a, interação célula/célula diminuída, deposição de matriz extracelular aumentada, migração aumentada, sobrevivência celular e/ou proliferação de uma célula cancerosa aumentada, uma célula hiperproliferativa, ou uma célula infectada (e.g., uma célula epitelial) por um patógeno/agente infeccioso (e.g., bactéria, vírus, fungo ou protozoário). Um ou mais desses Fenótipos celulares causadores de patologia causam ou contribuem para sintomas em um paciente sofrendo de uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção).

20 Como aqui usado, a frase "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual, ou listada na Farmacopeia Americana (*U.S. Pharmacopeia*), Farmacopeia Européia (*European Pharmacopeia*), ou outras farmacopeias geralmente reconhecidas para uso em animais, e mais particularmente, 25 em humanos.

Como aqui usado, o termo "potencializar" no contexto da administração de uma terapia a um sujeito refere-se a

uma melhora na eficácia de uma terapia em sua dose comum ou aprovada.

Como aqui usado, os termos "prevenir", "prevenindo", e
5 "prevenção" no contexto de terapias administradas a um
sujeito referem-se à redução ou inibição do
desenvolvimento, início, dispersão ou recorrência de uma
desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante
de EphA2 ou um sintoma dessa em um sujeito resultando da
10 administração de uma terapia (e.g., um agente terapêutico
ou profilático), ou a administração de uma combinação de
terapias (e.g., uma combinação de agentes profiláticos ou
terapêuticos). Em um avanço específico, os termos
"prevenir", "prevenindo", e "prevenção" no contexto de
15 terapias administradas a um sujeito referem-se ao aumento
no tempo de recorrência ou uma diminuição na dispersão ou
progressão de uma desordem associada com expressão e/ou
atividade aberrante de EphA2.

20 Como aqui usado, o termo "agente profilático" refere-
se a qualquer agente que pode prevenir o desenvolvimento,
recorrência, dispersão ou início de uma desordem associada
com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou
atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular
25 hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um
sintoma dessa. Em certos avanços, o termo "agente
profilático" refere-se a um EphA2-BiTE. Em certos outros
avanços, o termo "agente profilático" refere-se a um agente
que não um EphA2-BiTE. Preferencialmente, um agente

profilático é um agente que é conhecido por ser útil para ou foi ou é atualmente usado para prevenir ou impedir o início, desenvolvimento, recorrência, progressão e/ou dispersão de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, a desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas dessa.

Como aqui usado, uma "quantidade profilaticamente efetiva" refere-se à quantidade de uma terapia (e.g., um agente profilático) que é suficiente para resultar na prevenção do desenvolvimento, recorrência, dispersão ou início de uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, a desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), ou um sintoma dessa. Uma quantidade profilaticamente efetiva pode se referir à quantidade de uma terapia (e.g., um agente profilático) suficiente para prevenir o desenvolvimento, recorrência, dispersão ou início de uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), ou um sintoma dessa, por exemplo, naqueles tendo sofrido previamente de tal desordem, ou aqueles que são imunocomprometidos ou imunossuprimidos, ou são geneticamente predispostos a tal desordem. Uma quantidade profilaticamente efetiva pode também referir-se à quantidade de uma terapia (e.g., um agente profilático) que provê um benefício profilático na prevenção de uma desordem

associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, a desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), ou um sintoma dessa. Ainda, uma quantidade profilaticamente efetiva com relação a uma
5 terapia (e.g., um agente profilático da invenção) significa quantidade da terapia (e.g., agente profilático) apenas, ou em combinação com uma ou mais outras terapias (e.g., terapias sem EphA2-BiTE atualmente administradas para prevenir a desordem associada com expressão e/ou atividade
10 aberrante de EphA2 (e.g., câncer, a desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), agentes analgésicos, agentes anestésicos, antibióticos, ou agentes imunomoduladores) que provê um benefício profilático na prevenção de desordem associada com expressão e/ou
15 atividade aberrante de EphA2. Usado em conexão com uma quantidade de um EphA2-BiTE da invenção, o termo pode englobar uma quantidade que melhora a profilaxia geral ou intensifica a eficácia profilática de ou sinergia com outra terapia, (e.g., um agente profilático).

20

Como aqui usado, um "protocolo" inclui calendários de dosagem e regimes de dosagem.

Como aqui usado, o termo "refratário" refere-se a uma
25 desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), que é não responsiva a uma ou mais terapias (e.g., terapias atualmente disponíveis). Em certos

avanços, uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção) é refratária a uma terapia
5 significa que pelo menos alguma porção significativa dos sintomas associados com dita desordem não são eliminados ou amenizados por aquela terapia. A determinação de se tal desordem é refratária pode ser feita tanto *in vivo* e/ou *in vitro* por qualquer método conhecido na arte para testar a
10 efetividade de terapia para uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção).

15 Como aqui usado, o termo "efeitos colaterais" engloba efeitos indesejados e adversos de uma terapia (e.g., um agente terapêutico ou profilático). Efeitos adversos são sempre indesejados, mas efeitos indesejados não são necessariamente adversos. Um efeito adverso de uma terapia
20 (e.g., um agente terapêutico ou profilático) pode ser danoso ou desconfortável ou perigoso. Exemplos de efeitos colaterais incluem, mas não estão limitados a, náusea, vômito, anorexia, câimbra abdominal, febre, dor, perda de peso corporal, desidratação, alopecia, dispnéia, insônia,
25 tontura, mucosite, efeitos nervosos e musculares, fadiga, boca ressecada, e perda de apetite, erupções ou inchaços no local de administração, sintomas tipo gripe, tais como febre, calafrios e fadiga, problemas no trato digestivo e reações alérgicas. Efeitos indesejados adicionais

experimentados por pacientes são numerosos e conhecidos na arte. Vários são descritos no *Physicians' Desk Reference* (61st ed., 2007).

5 Como aqui usado, o termo "Fv de cadeia simples" ou "scFv" refere-se a fragmentos de anticorpo compreendendo os domínios VH e VL de um anticorpo, caracterizado pelo fato desses domínios estarem presentes em uma única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende
10 ainda um polipeptídeo ligante entre os domínios VH e VL, o qual permite o scFv formar a estrutura desejada para ligação a antígeno. Métodos para produzir scFvs são bem conhecidos na arte. Para uma revisão de métodos para produzir scFvs, consulte Pluckthun in *The Pharmacology of*
15 *Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Em um avanço específico, os EphA2-BiTEs da invenção são compreendidos de scFvs.

20 Como aqui usado, os termos "sujeito" e "paciente" são usados intercambiavelmente. Como aqui usado, um sujeito é um animal, preferencialmente um mamífero, tal como um mamífero não primata (e.g., vacas, porcos, cavalos, gatos, cachorros, ratos, etc.) e um primata (e.g., macaco (e.g.,
25 macaco *rhesus*, um macaco *cinomolgus* ou chimpanzé) e humano), e mais preferencialmente um humano. Em um avanço, o sujeito é um mamífero, preferencialmente um humano, com uma desordem associada com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2. Tais desordens incluem, mas não estão

limitadas a, câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas, e infecções. Em outro avanço, o sujeito é um mamífero, preferencialmente um humano, com risco de desenvolver uma desordem associada com
5 expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., um mamífero imunocomprometido ou imunossuprimido, ou um mamífero geneticamente predisposto). Em outro avanço, o sujeito não é um mamífero imunocomprometido ou imunossuprimido, preferencialmente um humano. Em outro
10 avanço, o sujeito é um mamífero, preferencialmente um humano, com uma contagem de linfócitos que está abaixo de aproximadamente 500 células/mm³.

Como aqui usado, o termo "sinérgico" refere-se a
15 uma combinação de terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos) que é mais efetiva do que os efeitos aditivos de qualquer duas ou mais terapias simples (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos). Em um aspecto, um efeito sinérgico de uma combinação de terapias (e.g.,
20 uma combinação de agentes profiláticos ou terapêuticos) permite o uso de dosagens menores de uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) e/ou gerenciamento menos freqüente de ditas terapias a um sujeito com uma desordem associada com expressão aberrante
25 (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção). Em alguns avanços, a habilidade para utilizar dosagens menores de terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos) e/ou para

administrar ditas terapias menos frequentemente reduz a toxicidade associada com a administração de ditas terapias a um sujeito sem reduzir a eficácia de ditas terapias na prevenção ou tratamento de uma desordem associada com expressão e/ou atividade (e.g., sobre-expressão) de EphA2 aberrante (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção). Em outro aspecto, um efeito sinérgico pode resultar em eficácia melhorada de terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos) no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção). Em outro aspecto, o efeito sinérgico de uma combinação de terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos) pode evitar ou reduzir efeitos colaterais adversos ou indesejados associados com o uso de qualquer terapia simples.

Como aqui usado, o termo "agente terapêutico" refere-se a qualquer agente que possa ser usado no tratamento e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção) ou um ou mais sintomas dessa. Em certos avanços, o termo "agente terapêutico" refere-se a uma molécula de EphA2-BiTE da invenção. Em certos outros avanços, o termo "agente terapêutico" refere-se a um agente que não uma molécula de EphA2-BiTE da invenção.

Preferencialmente, um agente terapêutico é um agente que é conhecido por ser útil para, ou foi usado ou está sendo atualmente usado para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão
5 aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção) ou um ou mais sintomas dessa.

Como aqui usado, uma "quantidade terapeuticamente
10 efetiva" no contexto de câncer refere-se à quantidade de uma terapia sozinha, ou em combinação com outras terapias, que provenha um benefício terapêutico no tratamento e/ou management de cânceres. Em um aspecto, uma quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade de uma
15 terapia suficiente para destruir, modificar, controlar ou remover tecido canceroso primário, regional ou metastático. Em outro aspecto, uma quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade de uma terapia suficiente para reduzir os sintomas de um câncer. Em outro aspecto, uma
20 quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade de uma terapia suficiente para atrasar ou minimizar a dispersão de câncer. Em um avanço específico, uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma terapia é uma quantidade de uma terapia suficiente para inibir o
25 crescimento ou proliferação de células cancerosas, matar células cancerosas existentes (e.g., causar regressão do câncer), e/ou prevenir a dispersão de células cancerosas para outros tecidos ou áreas (e.g., prevenir metástase). Em outro avanço específico, uma quantidade terapêutica de

uma terapia é uma quantidade de uma terapia suficiente para inibir o crescimento de um tumor em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%,
5 pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% como medido por método padrão conhecido na arte, ou como descrito na Seção 6.4.1
10 abaixo. Usado em conexão com uma quantidade de um EphA2-BiTE da invenção, o termo pode englobar uma quantidade que melhore a terapia geral, reduza ou evite efeitos indesejados, ou intensifique a eficácia terapêutica de ou sinergias com outra terapia. Em um avanço, uma quantidade
15 terapeuticamente efetiva de uma terapia reduz ou evita efeitos indesejados, ou intensifica a eficácia terapêutica de ou sinergias com outra terapia em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%,
20 pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% relativo a um controle (e.g., um controle negativo, tal como um fosfato salino
25 tamponado) em um teste conhecido na arte ou descrito aqui.

Como aqui usado, uma "quantidade terapeuticamente efetiva" no contexto de uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa refere-se à quantidade de

uma terapia sozinha, ou em combinação com outras terapias, que provenha um benefício terapêutico no tratamento e/ou gerenciamento de dita desordem. Em um aspecto, uma quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade

5 de uma terapia suficiente para destruir, modificar, controlar ou remover células afetadas por uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa. Em outro aspecto, uma quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade de uma terapia suficiente para reduzir os

10 sintomas de uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa. Em outro aspecto, uma quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade de uma terapia suficiente para atrasar ou minimizar a dispersão de uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa. Em

15 um avanço específico, a quantidade terapeuticamente efetiva de uma terapia é uma quantidade de uma terapia suficiente para ihibir o crescimento ou proliferação de uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, matar células hiperproliferativas não cancerosas existentes (e.g., causar

20 a regressão da desordem). Em outro avanço específico, uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma terapia é uma quantidade de uma terapia suficiente para inibir o crescimento das células hiperproliferativas não cancerosas em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo

25 menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% como

medido por um método padrão conhecido na arte. Usado em conexão com uma quantidade de um EphA2-BiTE da invenção, o termo pode englobar uma quantidade que melhore a terapia geral, reduza ou evite efeitos indesejados, ou intensifique a eficácia terapêutica de ou sinergias com outra terapia. Em um avanço, uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma terapia reduz ou evita efeitos indesejados, ou intensifica a eficácia terapêutica de ou sinergias com outra terapia em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% relativo a um controle (e.g., um controle negativo, tal como um fosfato salino tamponado) em um teste conhecido na arte ou descrito aqui.

Como aqui usado, uma "quantidade terapeuticamente efetiva" no contexto de uma infecção refere-se àquela quantidade de uma terapia (e.g., um agente terapêutico) suficiente para reduzir a severidade de uma infecção, reduzir a duração de uma infecção, melhorar um ou mais sintomas de uma infecção, prevenir o avanço da infecção, causar regressão da infecção, ou intensificar ou melhorar o(s) efeito(s) terapêutico(s) de outra terapia. Em certos avanços, uma quantidade terapeuticamente efetiva refere-se à quantidade de um agente terapêutico suficiente para reduzir ou inibir a replicação de um patógeno, inibir ou

reduzir a infecção de uma célula por um patógeno, inibir ou reduzir a produção de proteínas patogênicas, inibir ou reduzir a liberação de um patógeno, inibir ou reduzir a dispersão de um patógeno para outros tecidos ou sujeitos, ou melhorar um ou mais sintomas associados com a infecção. Em um avanço, uma quantidade terapeuticamente efetiva de um agente terapêutico reduz a replicação ou dispersão de um patógeno em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% relativo a um controle (e.g., um controle negativo, tal como fosfato salino tamponado) em um teste conhecido na arte ou descrito aqui. Testes que podem ser usados para medir a replicação de um patógeno, e.g., um vírus, incluem, mas não estão limitados a, testes de infectividade e transformação como descrito em, e.g., H.M. Temin and H. Rubin. 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. Virology 17: 669-688; and J.W. Hartley and W.P. Rowe. 1966. Production of altered cell foci in tissue culture by defective Moloney sarcoma virus particles. Proc. Natl. Acad. Sci. 55: 780-786, cada qual é aqui incorporado por referência em sua íntegra.

Como aqui usado, o termo "terapia" refere-se a qualquer protocolo, método e/ou agente que possa ser usado

no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção). Em
5 certos avanços, os termos "terapias" e "terapia" referem-se a uma terapia biológica, terapia de apoio, e/ou outras terapias úteis no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma
10 desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), ou um ou mais sintomas dessa conhecidos de um especialista na arte, tal como uma equipe médica.

Como aqui usado, os termos "tratar", "tratamento" e
15 "tratando" no contexto de administrar uma terapia(s) a um sujeito referem-se à redução ou melhora da progressão, severidade, e/ou duração de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular
20 hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção), e/ou a melhora de um ou mais sintomas dessas resultando da administração de uma ou mais terapias (incluindo, mas não limitado a, a administração de um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos). Em avanços específicos, os
25 termos "tratar", "tratamento" e "tratando" no contexto de administrar uma terapia(s) a um sujeito referem-se à redução ou melhora da progressão, severidade, e/ou duração de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer)

refere-se a uma redução em células cancerosas em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% relativo a um controle (e.g., um controle negativo, tal como fosfato salino tamponado). Em outros avanços, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando" no contexto de administrar uma terapia(s) a um sujeito referem-se à redução ou melhora da progressão, severidade, e/ou duração de uma desordem associada com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer) refere-se a nenhuma mudança em número de células cancerosas, uma redução no tempo de hospitalização, uma redução em mortalidade, ou um aumento no tempo de sobrevivência do sujeito com câncer.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20

FIGS. 1A-1B: Sequências dos domínios VL e VH do anticorpo EA2 anti-EphA2. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do domínio VL (SEQ ID NOS: 1 e 2, respectivamente) são mostradas em (A). As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do domínio VH (SEQ ID NOS: 9 e 10, respectivamente) são mostradas em (B). As sequências de nucleotídeo e de aminoácidos das CDRs são indicadas em negrito e estão sublinhadas. O anticorpo EA2 foi

previamente descrito em U.S. Pat. Pub. No. US 2005-0152899 A1, e é aqui incorporado por referência em sua íntegra.

FIGS. 2A-2B: Sequências dos domínios VL e VH do anticorpo EA5 anti-EphA2. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do domínio VL (SEQ ID NOS: 17 e 18, respectivamente) são mostradas em (A). As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do domínio VH (SEQ ID NOS: 25 e 26, respectivamente) são mostradas em (B). As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das CDRs são indicadas em **negrito** e estão sublinhadas. O anticorpo EA5 foi previamente descrito em U.S. Pat. Pub. No. US 2005-0152899 A1, e é aqui incorporado por referência em sua íntegra.

FIGS. 3A-3B: Estrutura do DNAC de EphA2-BiTE. As inserções clonadas no vetor de expressão pEF-DHFR compreenderam, cada, um líder com um sítio Kozak 5' terminal para eficiência de tradução aumentada e uma sequência sinal secretora (líder de Ig murino de cadeia pesada). O líder é seguido por quatro domínios variáveis de Ig, como listado acima. O peptídeo ligante na junção VL-VH ou VH-VL de anti-EphA2 possui um comprimento de 15 aminoácidos (três repetições do motivo G4S). O peptídeo ligante conectando o EphA2 com a especificidade de ligação a CD3 compreende uma repetição do motivo G4S. Diretamente adjacente ao quarto domínio está uma sequência de C-terminal hexa-histidina (H6) para propósitos de detecção e purificação. Os sítios de enzimas de restrição indicados

foram usados para clonar os constructos EphA2-BiTE no vetor de expressão.

FIGS. 4A-4B: Estrutura do vetor pEF-DHFR usado para expressar os EphA2-BiTEs em células CHO. O vetor pEF-DHFR é um vetor de 5,8 kb com a dihidrofolato redutase murina como marcador de seleção formando uma unidade de transcrição bicistrônica junta com o gene a ser expressado sob o controle do promotor EF1 α humano. O vetor de expressão eucarionte é um derivado do vetor de expressão pMT2PC.

FIGS. 5A-5B: Perfil de eluição de EphA2-BiTE desimmunizado anti-CD3 $\times$ EA2 (VH/VL) contendo frações de proteína de uma coluna de filtração em gel. Pico 1: agregados, pico 2: dímero, pico 3: monômero.

FIGS. 6A-6B: SDS PAGE e marca anti-His *Western blot* de frações de EphA2-BiTE desimmunizado anti-CD3 $\times$ EA2 purificado (VH/VL). A fração de monômero (faixa 7) continha essencialmente EphA2 BiTE puro. Nenhum EphA2-BiTE foi detectável no agregado.

FIGS. 7A-7B: Análise de ligação por citômetro de fluxo de anticorpos parentais anti-CD3 reativos a cinomolgus. PBMC de macacos cinomolgus foram usados para detectar ligação a CD3 de anticorpos parentais cCD3-1 e cCD3-2, ambos conjugados com FITC. As células foram analisadas por citometria de fluxo em um *FACS-Calibur*

(Becton Dickinson, Heidelberg). Como mostrado aqui, ambos anticorpos apresentam ligação distinta à fração de células T de PBMC de cinomolgus.

5 FIG. 8. Evidência para reatividade cruzada de EA2 e EA5 com EphA2 de Rhesus. Fosforilação ativada de anticorpos EA2 e EA5 de EphA2 em células CMMT110/CL, como mostrado no *Western blot*.

10 FIG. 9. Análise de ligação por citometria de fluxo de vários constructos anti-EphA2 subsituem BiTE reagindo com CD3 *macaque*. Apenas aqueles constructos subsituem BiTE baseados em anticorpo CD3 *macaque* cCD3-1 apresentaram forte ligação a CD3 e EphA2. Constructos baseados em cCD3-2
15 apresentam apenas forte ligação a CD3; a ligação EphA2 terminou sendo quase completamente suprimida. Assim, constructos surrogate BiTE baseados em cCD3-1 serão continuados para produção, purificação e análise de atividade citotóxica com células T de cinomolgus.

20 FIG. 10. Análise de ligação por citometria de fluxo de anticorpos parentais anti-EphA2. Foram usadas células A549 expressando EphA2 (linhagem celular de carcinoma pulmonar humano) (A), e células MDA-MB-231 (câncer de mama
25 humano) (B). Células (200.000) foram incubadas com 10 µg/ml do respectivo anticorpo por 30 min em gelo. As células foram subsequente-mente lavadas duas vezes em PBS. A ligação do anticorpo primário foi detectada via um anticorpo Fc-gama murino específico conjugado a

ficoeritrina (Dianova, order no. 115-116-071) diluído 1:100 em 50 µl PBS com 2% FCS. Como controle negativo, um anticorpo irrelevante com o mesmo isotipo foi usado (linha fina). Células foram analisadas por citometria de fluxo em 5 um *FACS-Calibur* (Becton Dickinson, Heidelberg). Como mostrado na figura, mAb B322 apresentou o sinal de ligação mais forte, seguido por EA2 e EA5. As capacidades de ligação dos três anticorpos diferentes são apresentadas em uma sobreposição de histogramas (4° pico da esquerda = 10 anticorpo B322; 3° pico da esquerda = anticorpo EA2; 2° pico da esquerda = anticorpo EA5; pico mais da esquerda - controle).

FIG. 11. Análise imunohistoquímica de ligação a EA2 e 15 EA5 para tecidos normais. (A) Nenhum anticorpo primário. EA5 demonstrou coloração de discos intercalados em tecido de coração (B), elementos musculares vasculares e estromal de múltiplos órgãos (citoplasma), epitélio de colônico (citoplasma), e miométrio uterino. Seções de tecido humano 20 (C) não foram coradas com EA2 se comparado com um isotipo de anticorpo monoclonal 1A7 controle.

FIG. 12. Ligação biespecífica de EphA2-BiTEs em diferentes linhagens celulares como determinado por 25 citometria de fluxo. Células A549 EphA2 positivas (linhagem celular de carcinoma pulmonar humano) e células MDA-MB-231 (linhagem celular de câncer de mama humano), assim como HP-BALL CD3 positivo (linhagem de células T humana) foram usadas.

FIGS. 13A-13B. Potência de lise redirecionada por cinco EphA2-BiTEs em células (A) MDA MB 231 (mama), e (B) A549 (pulmão). O constructo BiTE desimmunizado anti-CD3xEA2(VH/VL) apresentou consistentemente a maior potência em lise redirecionada de linhagens celulares de câncer de mama e pulmão.

FIGS. 14A-14C. Seqüências do EphA2-BiTE desimmunizado anti-CD3(VH-VL) x EA2 (VH-VL). Apresentado em (A) está uma representação de um constructo EphA2-BiTE compreendendo um primeiro domínio de ligação que se liga imunoesspecificamente a CD3 e um segundo domínio de ligação que se liga imunoesspecificamente a EphA2. Também representadas estão seqüências de ligação entre os domínios VH_{CD3} - VL_{CD3} , VL_{CD3} - VH_{EphA2} , e VH_{EphA2} - VL_{EphA2} , respectivamente, na direção 5' a 3' (da esquerda para a direita). As seqüências de aminoácido e de nucleotídeos de cada ligante são representadas por SEQ ID NOS: 27 e 28, 29 e 30, e 31 e 32, respectivamente. Apresentado em (B) está a seqüência de comprimento total da seqüência de nucleotídeos (SEQ ID NO:60) e seqüência de aminoácidos (SEQ ID NO:65) do EphA2-BiTE desimmunizado anti-CD3(VH-VL) x EA2 (VH-VL). Letras em regrito representam os sítios de restrição de enzimas *EcoRI* e *SalI*, respectivamente. Letras maiúsculas em itálico indicam a seqüência líder, e letras duplamente sublinhadas representam o códon de parada. As seqüências ligantes e de marca de Histidina estão sublinhadas.

FIG. 15. A atividade citotóxica de dois grupos diferentes de EphA2 BiTE desimmunizado anti-CD3xEA2 (VH/VL) foi comparada com PBMCs (após a depleção de células CD16 positivas) e células T CD8+ estimuladas como células efetoras. As linhagens celulares EphA2 positivas A549 e MDA-MB231 serviram como células alvo. A razão E:T foi de 10:1; e o tempo de incubação foi de 18 horas. (A) lise de células A549 mediada por EphA2-BiTE com PBMC; (B) lise de células A549 mediada por EphA2-BiTE com células T CD8+ estimuladas; (C) lise de células MDA-MB231 mediada por EphA2-BiTE com PBMC e (D) lise de células MDA-MB231 mediada por células T CD8+ estimuladas.

FIGS. 16A-16B. Variação de atividade citotóxica de EphA2-BiTE com doador de célula efetora. EphA2-BiTE redirecionaram células T de diferentes sujeitos para mediar morte de células tumorais por EphA2+. O teste de citotoxicidade utilizou células alvo SW480 e células T CD3+ isoladas de 49 indivíduos humanos doadores. Para a maioria dos doadores humanos, EphA2-BiTE mediou morte de células tumorais em concentrações muito baixas. O EC50 para EphA2-BiTE esteve entre 1 e 110 ng/ml para todos os doadores de células T testados com uma mediana (barra horizontal) de 24 ng/ml. Assim, para a maioria dos doadores humanos de células T, EphA2-BiTE é uma molécula altamente potente com atividade de matar células observada em concentrações numa faixa baixa de ng/ml.

FIGS. 17A-17D. Especificidade de ligação de célula alvo - proteína de fusão EphA2 solúvel compete por ligação de anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimunizado. A especificidade de ligação de alvo de BiTE desimunizado anti-CD3xEA2 (VH/VL) foi testada em um teste de competição. Como mostrado na figura, a co-incubação de BiTE desimunizado anti-CD3xEA2 (VH/VL) com um excesso de peso de 10 vezes de proteína de fusão EphA2 Fc solúvel bloqueou completamente a ligação do BiTE com células A549 de câncer de pulmão humano. Isso mostra que a ligação de BiTE a células tumorais é mediada especificamente por reconhecimento de EphA2 alvo.

FIG. 18. Especificidade de célula alvo de EphA2-BiTE desimunizado anti-CD3xEA2 (VH/VL): morte de células positivas para antígeno. A atividade citotóxica do BiTE anti-CD3xEA2 desimunizado depende estritamente da expressão de EphA2 nas células alvo B16F10 transfectadas; células B16F10 EphA2 negativas são completamente resistentes a lise mediada por anti-CD3xEA2 desimunizado.

FIGS. 19A-19C. Atividade citotóxica de especificidade de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL) *in vitro*. (A) Especificidade de lise de célula alvo. PBMC enriquecido com células T CD3+ foram incubadas com células SW480 EphA2 positivas (símbolos cheios) ou células SK-MEL-28 EphA2 negativas (símbolos abertos) na presença de diluições em série de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL) (quadrados) ou bscCD19xCD3 (triângulos) por 42 horas a 37°C. (B e C)

Anticorpos parentais para CD3 (DiL2K) e EphA2 (EA2) inibem a lise de bscEphA2xCD3 de células tumorais EphA2 positivas. Células T CD3⁺ foram incubadas em 200 µl de meio de cultura com células SW480 na presença de diluições em série de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL) sozinhas (quadrados abertos), ou na presença de 10 µg (triângulo) ou 100 µg (círculo) de DiL2K no painel B ou EA2 no painel C por 42 horas a 37°C; os resultados são apresentados como a porcentagem de células alvo lisadas. Barras de erro indicam o desvio padrão (SD) de medidas duplicadas. Notar: a magnitude de lise se aproxima de 100% para cada curva de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL).

FIG. 20. Morte de células de carcinoma renal e células de câncer de próstata mediada por EphA2-BiTE. Testes de citotoxicidade demonstraram morte de células tumorais mediada por EphA2-BiTE de células ACHN (A), Caki 2 (B), PC3 (C), e DU145 (D) com valores de EC₅₀ de 3, 30, 6, e 0,8 ng/ml, respectivamente. Um controle negativo BiTE específico para CD19 não redirecionou células T para lisar células alvo.

FIGS. 21A-21B. Efeitos de morte de EphA2-BiTE em níveis de EphA2 em células alvo. (A) Testes de citotoxicidade demonstraram morte de células tumorais mediada por EphA2-BiTE de células SW480 com valor de EC₅₀ de 6 ng/ml. Um controle negativo BiTE específico para CD19 não redirecionou células T para lisar células alvo. (B) Após o término de um teste de citotoxicidade *in vitro*, as

células alvo SW480 que vivas remanescentes foram medidas para a presença de EphA2 ou EphA2-BiTE. A média geométrica de intensidade de fluorescência de células SW480 vivas se coloriu com um isotipo controle, expressão de EphA2 (coloração B233), ou EphA2-BiTE (BiTE) foi plotado versus a dose de BiTE inserido. EphA2-BiTE redirecionou células T para primeiro matar células alvo com alta expressão de níveis de EphA2. De maneira interessante, não matar todas células alvo foram lisadas apesar de EphA2-BiTE estar ligado às células. Assim, morte de células T mediada por EphA2-BiTE da maioria de células EphA2+ alvo, apesar de um subgrupo de células EphA2+ poder ser resistente.

FIGS. 22A-22D. Caracterização de citotoxicidade de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL) *in vitro*. (A) Cinética de lise redirecionada. Células T CD3+ foram incubadas com células SW480 na presença de diluições em série de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL) por 4 horas (quadrado), 18 horas (triângulo), 24 horas (triângulo invertido), ou 42 horas (losango) a 37°C. Barras de erro indicam o desvio padrão. Valores de EC50 foram estimados a partir das curvas e estão listados. (B) Influência de efetor para razão alvo em lise redirecionada. Células T CD3+ foram incubadas com células SW480 em uma razão de 20:1 (quadrado escuro), 10:1 (triângulo escuro), 5:1 (triângulo aberto invertido), 1:1 (losango aberto), 1:2 (círculo cinza), ou 1:5 (quadrado cinza) na presença de diluições em série de anti-CD3xEA2 desimunizado (VH./VL) por 42 horas a 37°C. Barras de erro indicam o desvio padrão. Valores de EC50

foram estimados a partir das curvas e estão listados. (C) Efeitos de sítios de ligação de receptor EphA2 disponíveis no potencial de lise redirecionada. O número estimado de moléculas de EphA2 por célula para linhagem de tumor
5 (linhagens de carcinoma humano HeyA8, SW480, A549 e linhagens de melanoma M14 e A375) foi plotado contra os respectivos valores de EC50 da porcentagem de células alvo lisadas de quatro experimentos separados. O valor de P e r^2 da curva de regressão linear estão listados no gráfico.

10 (D) Efeitos de densidade de superfície de EphA2 em lise redirecionada. Células T CD3+ foram incubadas com as linhagens celulares HeyA8 (quadrados escuros; 107.000 receptores EphA2 por célula), M14 (círculo cinza; 2.400 receptores EphA2 por célula), e nd SKMEL-28 (quadrado
15 aberto; receptores EphA2 estiver abaixo do limite de detecção) na presença de diluições em série de anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH./VL) por 18 horas a 37°C. Barras de erro indicam o desvio padrão. Os valores de EC50 foram estimados a partir das curvas e estão listados.

20 FIG. 23. Estabilidade de EphA2-BiTE desimmunizado anti-CD3xEA2 (VH/VL) em plasma humano. A estabilidade de plasma do BiTE EphA2 específico foi testada sob diferentes condições de incubação seguido por determinação de ED50 de
25 atividade citotóxica em um teste padrão de liberação de cromo 51.

FIGS. 24A-E. Exclusão de epitopo alvo em células não transformadas por anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH/VL).

Microscopia de vídeo foi empregada para visualizar o ataque de células T CD8⁺ contra células MCF10A não transformadas na presença de BiTE desimmunizado anti-CD3 x EA2 (VH/VL) e um BiTE controle excluindo não epitopos. (A) MCF10A não transformadas co-incubadas com células T CD8⁺ (razão E:T de 1:1) e 100 ng/ml de anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH/VL). (B) MCF10A não transformadas co-incubadas com células T CD8⁺ (razão E:T de 1:1) sem BiTE. (C) MCF10A não transformadas co-incubadas com células T CD8⁺ (razão E:T de 1:1) e 100 ng/ml de um BiTE controle pan-carcinoma excluindo não epitopo. (D) Linhagem de células de carcinoma pulmonar A549 co-incubada com células T CD8⁺ (razão de E:T de 1:1) e 100 ng/ml anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH/VL). (E) Mesma configuração como em (D). A sobreposição da figura de microscopia de transmissão e de microscopia de fluorescência na presença de iodeto de propídio e para visualizar células lisada (cinza claro).

FIG. 25. Determinação de afinidade de alvo de anti-CD3xEA2 desimmunizado(VH/VL) por ressonância de *plasmon* de superfície. A formação e dissociação de complexos BiTE/EphA2 foi monitorada por ressonância de *plasmon* de superfície usando um sistema *Biacore 3000*. A K_D é estimada em 45 nM.

25

FIG. 26. Grupos de teste de controle negativo para anti-tum de anti-CD3xEA2 desimmunizado(VH/VL) *in vivo* em modelo SW480. 5×10^6 células SW480 sozinhas ("SW480 apenas" e "anti-CD3xEA2 desimmunizado") ou misturadas com $2,5 \times 10^6$

células T CD3+ humanas ("PBS", "BiTE não-relevante", e "add. células T i.v., PBS") foram injetadas subcutaneamente em camundongos fêmea NOD/SCID. Um grupo de camundongos recebeu $2,5 \times 10^6$ células T CD3+ injetadas intravenosamente ("add. células T, i.v., PBS"). Os camundongos foram tratados diariamente por cinco dias consecutivos com BiTE ("anti-CD3xEA2 desimmunizado apenas"), PBS ("PBS"; "add. células T i.v., PBS"), ou um BiTE não relevante. O volume médio de tumor de seis camundongos/grupo é apresentado.

10

FIG. 27. Tratamento diário com anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH/VL) por cinco dias consecutivos induziu uma inibição dependente de dose de crescimento de tumor SW480 na presença de células T CD3+ efetoras. **Altamente significativo ($p \leq 0,01$); * significativo ($p \leq 0,05$) segundo o teste *T* de Student.

FIG. 28. Nenhum efeito de células T periféricos em efeito antitumoral de anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH/VL). O volume de tumor médio de seis camundongos/grupo é apresentado. ** Altamente significativo ($p \leq 0,01$).

FIG. 29. Sequências de aminoácidos dos domínios VL e VH do anticorpo 233 anti-EphA2. Apresentado em (A) está a sequência de aminoácidos do domínio VL (SEQ ID NO:33). Apresentado em (B) está a sequência de aminoácidos do domínio VH (SEQ ID NO:37). As sequências das CDRs estão no quadro. O anticorpo 233 foi previamente descrito na U.S.

Pat. Pub. No. US 2004-0028685 A1, e é aqui incorporado por referência em sua íntegra.

FIG. 30. Sequências de aminoácidos dos domínios VL e
5 VH do anticorpo 3F2 anti-EphA2. Apresentado em (A) está a
sequência de aminoácidos do domínio VL (SEQ ID NO:41).
Apresentado em (B) está a sequência de aminoácidos do
domínio VH (SEQ ID NO:45). As sequências das CDRs estão no
quadro. O anticorpo 3F2 foi previamente descrito na U.S.
10 Pat. Appn. Ser. No. 11/203.251, preenchida em 15 de agosto
de 2005, e é aqui incorporado por referência em sua
íntegra.

FIG. 31. Mapa linear de sítio de inserção 4H5 scFv no
15 vetor de expressão MD102.

FIGS. 32A-32B. Sequências do clone humanizado 4H5 VH-
VL scFV. Apresentado em (A) está a sequência de
nucleotídeos (SEQ ID NO:67). Apresentado em (B) está a
20 sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:68). As CDRs estão no
quadro. O anticorpo 4H5 foi previamente descrito na U.S.
Pat. Appn. Ser. No. 2005-0048617 A1, e é aqui incorporado
por referência em sua íntegra.

25 FIG. 33A-33B. Sequência de nucleotídeos e de
aminoácidos do VH VL 2A4 scFv. Apresentado em (A) está a
sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO:75). Apresentado em
(B) está a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:76). As
CDRs estão no quadro.

FIGS. 34A-34B. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do VH VL 2E7 scFv. (A) representa a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO:83); e (B) representa a
5 sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:84).

FIGS. 35A-35B. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do VH VL 12E2 scFv. (A) representa a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO:91); e (B) representa a
10 sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:92).

FIG. 36. Titulação por ELISA de sobrenadantes de scFv de variantes combinantes de afinidade otimizada em EphA2 humano imobilizado.

15

FIG. 37. Alinhamento de sequência de aminoácidos dos variantes de afinidade otimizada 2A2, 2E7 e 12E2 com o 4H5 scFv humanizado.

20 FIG. 38. Esta figura representa a sequência dos primers combinatórios (L1, L2, L3, L4, L6, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, e H13) usados na otimização de afinidade de Fab 2G6 (SEQ ID NOS: 99-111, respectivamente).

25 FIG. 39. Alinhamento de sequência de aminoácidos das regiões variáveis de B233 murino, 2G6 humanizado e 3F2 mAbs de afinidade otimizada providas.

FIG. 40. Anticorpos EphA2 anti-humano se ligam a EphA2 de cinomolgus. Anticorpos anti-humanos purificados murinos (EA2) e humanizados (3F2 e 4H5) ligados a EphA2 humano em células SW480 de carcinoma de cólon e EphA2 de cinomolgus expressadas em células CHO transfectadas. Anticorpos ligados foram detectados por citometria de fluxo usando um anticorpo Alexafluor 488 anti-camundongo ou IgG humana (H+L). Anticorpos foram comparados com um anticorpo controle negativo não ligante (R347). EA2, 3F2, e 4H5 ligados a EphA2 humano e de cinomolgus.

FIG. 41. Reconhecimento seletivo de célula tumoral por um subgrupo de anticorpos EphA2. Monocamadas de células mamárias epiteliais não transformadas (MCF-10A) e malignas (MDA-MB-231) foram fixadas e rotuladas com os anticorpos indicados (G5, EA5, EA2, 3F2, ou 4H5), e, então, visualizadas usando microscopia de imunofluorescência. Anticorpos excluídos (yes) ou não excluídos (no) dos sítios de contato célula-célula de células MCF-10A são indicados. Assim, os epitopos EA5 e EA2 são seletivamente excluídos pela arquitetura normal que tipifica células epiteliais não transformadas, mas se torna acessível após transformação maligna.

FIG. 42. Sequências de aminoácidos dos domínios VL e VH de G5. Apresentado em (A) está a sequência de aminoácidos do domínio VL (SEQ ID NO:49). Apresentado em (B) está a sequência de aminoácidos do domínio VH (SEQ ID NO:53). O anticorpo G5 foi previamente descrito na U.S.

Appn. Ser. No. 11/165.023, preenchida em 24 de junho de 2005, e é aqui incorporado por referência em sua íntegra.

FIG. 43. Comparação de potência citotóxica de quatro
5 BiTEs EphA2 específicos feitos a partir de duas corridas de
produção diferentes do anticorpo monoclonal 3F2 humanizado.
Testes citotóxicos *in vitro* compararam a habilidade dos
quatro constructos BiTE anti-EphA2 baseados em 3F2
diferentes para mediar a lise de célula T redirecionada de
10 células MDA-MB-231 EphA2+. A tabela lista valores de
potência (*i.e.*, EC50) valores para cada constructo
purificado a partir de duas corridas de produção separadas.
O constructo BiTE desimmunizado anti-CD3x3F2 (VH/VL)
apresentou consistentemente a maior potência.

15

FIG. 44. Comparação independente de potência
citotóxica de quatro BiTEs anti-EphA2 baseados em 3F2. O
teste citotóxico *in vitro* comparou a habilidade de quatro
constructos BiTE anti-EphA2 baseados em 3F2 diferentes para
20 mediar a lise de célula T redirecionada de células SW480
EphA2+. O constructo BiTE desimmunizado anti-CD3x3F2
(VL/VH) apresentou a maior potência.

FIG. 45. Especificidade de ligação de célula alvo de
25 BiTES anti-EphA2 baseados em 4H5 para células expressando
EphA2+ e CD3+. A especificidade de ligação a alvo dos
vários constructos BiTE baseados em 4H5 foi examinada
usando o teste baseado em citometria de fluxo descrito
acima. Células de câncer de mama MDA MB 231 EphA2+ e

células T humanas *HP Ball* CD3+ foram usadas como células alvo. O BiTE anti-CD3×EA2 desimmunizado (VH/VL) foi usado como controle positivo. Como mostrado na figura, cada um dos constructos EphA2-BiTE baseados em 4H5 se ligou a
5 células expressando ambos EphA2 e CD3.

FIG. 46. Especificidade de ligação a célula alvo dos constructos BiTE 12E2, 2E7 e 2A4 humanizados baseados em 4H5 de afinidade amadurecida. A especificidade de ligação
10 a alvo dos vários constructos BiTE baseados em 4H5. foi examinada usando o teste baseado em citometria de fluxo descrito acima. Células de câncer de mama MDA MB 231 EphA2+ e células T humanas *HP Ball* CD3+ foram usadas como células alvo. Como mostrado na figura, cada um dos
15 constructos EphA2-BiTE baseados em 4H5 se ligou a células expressando ambos EphA2 e CD3.

FIG. 47. Especificidade de ligação a célula alvo de monômeros purificados. Como mostrado na figura, os
20 monômeros purificados dos constructos EphA2-BiTE baseados em 4H5 de afinidade amadurecida se ligou a células de câncer de mama MDA MB 231 EphA2+ e células T humanas *HP Ball* CD3+ alvo em uma concentração de 5 µg/ml usando o teste baseado em citometria de fluxo como descrito acima.

25

FIG. 48. Comparação de potência citotóxica de quatro BiTEs EphA2 específicos do anticorpo monoclonal 4H5 humanizado. Testes de citotoxicidade baseados em liberação de Cromo 51 foram efetuados para determinar a lise de

célula alvo redirecionada pelos vários constructos BiTE anti-EphA2 na presença de células T CD8+ humanas estimuladas. A linhagem de célula tumoral MDA-MB-231 EphA2 positiva foi carregada com Cromo 51 e serviu como células
5 alvo. Os vários constructos BiTE anti-EphA2 foram titulados em uma ampla gama de concentrações. A duração do teste foi de 18 horas, e a razão efetor-alvo de 10:1. As concentrações de EphA2-BiTE requeridas para metade da lise máxima (*i.e.*, EC50) com diferentes grupos de produção foram
10 estimadas usando um modelo de encaixe não linear de quatro parâmetros.

FIG. 49. Esta figura provê uma comparação direta da potência de lise de célula alvo de células MDA-MB-231 dos
15 vários constructos EphA2 3F2 (A) e (B) baseados em 4H5 como medido por um teste de citotoxicidade baseado em Cromo 51.

FIG. 50. Atividade de citotoxicidade induzida por EphA2-BiTEs baseados em 4H5 de afinidade amadurecida 12E4,
20 2E7 e 2A4. Esta figura demonstra a potência de lise de célula alvo dos vários constructos EphA2-BiTE baseados em 4H5 (12E4, 2E7 e 2A4). As células da linha A549 de células tumorais EphA2 positivas foram carregadas com Cromo 51 e serviram como células alvo. Células T CD8+ humanas
25 estimuladas serviram como células efetoras. Os vários constructos BiTE anti-EphA2 foram titulados por uma ampla gama de concentrações. A duração do teste foi de 18 horas, e a razão efetor-alvo de 10:1. As concentrações de EphA2-BiTE requeridas para metade da lise máxima (*i.e.*, EC50) com

diferentes grupos de produção foram estimadas usando um modelo de encaixe não linear de quatro parâmetros.

FIG. 51. Atividade de citotoxicidade induzida por
5 EphA2-BiTEs baseados em 4H5 de afinidade amadurecida 12E4, 2E7 e 2A4. Esta figura demonstra a potência de lise de célula alvo dos vários constructos EphA2-BiTE baseados em 4H5 (12E4, 2E7 e 2A4). As células das linhas A549 de células tumorais EphA2 positivas e SW480 foram carregadas
10 com Cromo 51 e serviram como células alvo. Células T CD8+ humanas estimuladas serviram como células efetoras. Os vários constructos BiTE anti-EphA2 foram titulados por uma ampla gama de concentrações. A duração do teste foi de 18 horas, e a razão efetor-alvo foi de 10:1. As concentrações
15 de EphA2-BiTE requeridas para metade da lise máxima (i.e., EC50) com diferentes grupos de produção foram estimadas usando um modelo de encaixe não linear de quatro parâmetros.

20 FIG. 52. Nenhuma ativação de EphA2 por EphA2-BiTEs baseados em 4H5 como medido por fosforilação de EphA2. Esta figura demonstra que nem o constructo BiTE 2A4 nem o constructo BiTE 2E7 induziram a fosforilação de EphA2 em células expressando EphA2.

25

FIG. 53. Eficácia *in vivo* de constructos EphA2-BiTE baseados em 4H5 de afinidade amadurecida. A potência *in vivo* dos constructos 2A4- e 2E7-BiTE foi avaliada em camundongos NOD/SCID imunodeficientes com um modelo

xenotransplantado de carcinoma de cólon humano. A linhagem celular SW480 de carcinoma de cólon humano foi selecionada para o estabelecimento de um modelo xenotransplantado humano, já que células SW480 expressam EphA2. Os resultados do estudo são apresentados aqui.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como detalhado abaixo, a presente invenção está relacionada a anticorpos biespecíficos de cadeia simples compreendendo um primeiro domínio de ligação que se liga imunoespecificamente ao antígeno CD3 de célula T e um segundo domínio de ligação que se liga imunoespecificamente ao receptor EphA2. Tais anticorpos biespecíficos de cadeia simples são englobados pelo termo "EphA2-BiTEs." A presente invenção está ainda relacionada a métodos e composições projetados para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de desordens associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2. Tais desordens incluem, mas não estão limitadas a, câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas, e infecções. A invenção está ainda relacionada a vetores compreendendo polinucleotídeos codificando os EphA2-BiTEs da invenção, células hospedeiras transformadas dessa maneira, e seu uso na produção de ditos EphA2-BiTEs. A invenção também provê composições, incluindo composições farmacêuticas, compreendendo qualquer dos EphA2-BiTEs, polinucleotídeos ou vetores então mencionados tanto sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos.

Também descritos estão métodos de rastrear para ditos EphA2-BiTEs e kits compreendendo qualquer das composições e reagentes diagnósticos então mencionados.

5 EphA2-BiTEs

A presente invenção provê engajadores de células T biespecíficos (*i.e.*, EphA2-BiTEs (em particular, EphA2-BiTEs os quais são anticorpos biespecíficos de cadeia
10 simples)) que ligam imunoespecificamente EphA2 e o antígeno CD3 de célula T, e métodos de usar os mesmos para tratar, prevenir e/ou gerenciar desordens associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2. Tais desordens incluem, por exemplo, câncer, desordens celulares
15 hiperproliferativas não cancerosas, e infecções. Em um aspecto, os EphA2-BiTEs são mais eficientes em eliminar células que expressam EphA2 de forma aberrante do que anticorpos EphA2 específicos conhecidos na arte. Em um
20 aspecto específico, os EphA2-BiTEs são mais eficientes em eliminar células cancerosas expressando EphA2 (em particular, células cancerosas malignas expressando EphA2) do que anticorpos EphA2 conhecidos na arte. Em outro aspecto, os EphA2-BiTEs são mais eficientes em eliminar células hiperproliferativas não cancerosas expressando
25 EphA2 do que anticorpos EphA2 conhecidos na arte. Ainda em outro aspecto, os EphA2-BiTEs da invenção são mais eficientes em eliminar células infectadas expressando EphA2 (em particular, células infectadas com o vírus respiratório sincitial; "RSV") do que anticorpos EphA2 conhecidos na

arte. Em outro aspecto, dosagens menores de EphA2-BiTEs do que anticorpos EphA2 específicos conhecidos na arte são necessárias para tratar, prevenir e/ou gerenciar desordens associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2.

5

Os BiTEs EphA2 específicos da presente invenção compreendem um primeiro domínio de ligação que se liga imunoespecificamente ao antígeno CD3 de célula T e um segundo domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a EphA2 (doravante "EphA2-BiTEs" ou "moléculas EphA2-BiTE"). Em um avanço, o primeiro domínio de ligação se liga imunoespecificamente a CD3. Em um avanço específico, o primeiro domínio de ligação se liga imunoespecificamente a uma ou mais de qualquer subunidade de CD3 (e.g., a subunidade gama, delta, zeta, ou eta). Em um avanço preferencial, o primeiro domínio de ligação se liga imunoespecificamente à subunidade épsilon (ϵ) de CD3. Em um avanço específico, o primeiro domínio de ligação se liga imunoespecificamente à subunidade épsilon (ϵ) de CD3 quando dita subunidade é complexada com a subunidade delta de CD3. Em outro avanço, o domínio de ligação que se liga a CD3 é desimunizado. Em outro avanço específico, o segundo domínio de ligação se liga imunoespecificamente ao domínio extracelular de EphA2. Em um avanço preferencial, o segundo domínio de ligação dos EphA2-BiTEs, os quais são usados no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de câncer, se liga imunoespecificamente a epitopos em EphA2 que são seletivamente expostos e/ou aumentados em células cancerosas, mas não em células não cancerosas. Em outro

avanço preferencial, o segundo domínio de ligação dos EphA2-BiTEs da invenção se liga imunoespecificamente a epitopos em EphA2 que são seletivamente expostos e/ou aumentados em células hiperproliferativas não cancerosas, 5 mas não em células normais. Em outro avanço preferencial, o segundo domínio de ligação de EphA2-BiTEs se liga imunoespecificamente a epitopos em EphA2 que são seletivamente expostos e/ou aumentados em células infectadas, mas não em células não infectadas.

10

A presente invenção provê EphA2-BiTEs nos quais o primeiro domínio de ligação compreende um domínio variável pesado (VH) em um domínio variável leve (VL) de um anticorpo que se liga imunoespecificamente ao antígeno CD3 15 de célula T e um segundo domínio de ligação que compreende um domínio VH e um domínio VL de um anticorpo que se liga imunoespecificamente a EphA2. Em um avanço específico, os domínios VH e VL do primeiro domínio de ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente que permite que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação ao antígeno CD3 de célula T. Ainda para este avanço, tal 20 ligante pode compreender, por exemplo, a sequência GEGTSTGS(G₂S)₂GGAD (SEQ ID NO.:57). Em outro avanço específico, os domínios VH e VL do segundo domínio de 25 ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente que permite que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação a EphA2. Ainda para este avanço, tal ligante pode compreender, por exemplo, a sequência (G₄S)₃ (SEQ ID NO:59). Em outro avanço específico, o primeiro e

segundo domínios de ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente que permite que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação ao antígeno CD3 de célula T e a EphA2. Ainda para este avanço, tal ligante
5 pode compreender, por exemplo, a sequência G₄S (SEQ ID NO:58). Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção possui a sequência de aminoácidos de (SEQ ID NO:65). Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção compreende um anticorpo de domínio único.

10

De acordo com o avanço o parágrafo precedente, a ligação é covalente. Em um avanço específico, os ligantes da invenção compreendem resíduos de serina e glicina. Os ligantes dos EphA2-BiTEs, e.g., o ligante entre os domínios
15 VH e VL do primeiro domínio de ligação que se liga a CD3, o ligante entre os domínios VH e VL do segundo domínio de ligação que se liga a EphA2, e o ligante entre o primeiro domínio de ligação que se liga a CD3 e o segundo domínio de ligação que se liga a EphA2 pode ser de qualquer
20 comprimento suficiente para que permita que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação aos antígenos CD3 e EphA2, respectivamente. Em certos avanços, os ligantes da invenção compreendem um comprimento de pelo menos 5 resíduos, pelo menos 10 resíduos, pelo menos 15 resíduos,
25 pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos ou mais. Em outros avanços, os ligantes da invenção compreendem um comprimento entre 2-4 resíduos, entre 2-4 resíduos, entre 2-6 resíduos, entre 2-8 resíduos, entre 2-10 resíduos, entre 2-12 resíduos, entre 2-14

resíduos, entre 2-16 resíduos, entre 2-18 resíduos, entre 2-20 resíduos, entre 2-22 resíduos, entre 2-24 resíduos, entre 2-26 resíduos, entre 2-28 resíduos, ou entre 2-30 resíduos. Em certos avanços, o primeiro domínio de ligação
5 é 5' ao segundo domínio de ligação. Em outros avanços, o segundo domínio de ligação é 5' ao primeiro domínio de ligação. Em certos avanços, o primeiro e segundo domínios de ligação são anticorpos de cadeia simples. Em um avanço específico, o primeiro e segundo domínios de ligação
10 compreendem Fvs de cadeia simples (scFvs).

Em outro avanço específico, a invenção provê um anticorpo biespecífico de cadeia simples compreendendo (a) um primeiro domínio variável de cadeia pesada e um primeiro
15 first domínio variável de cadeia leve, cada um de um anticorpo que liga imunoesspecificamente a cadeia ϵ de CD3, dito primeiro domínio variável de cadeia pesada ligado covalentemente a dito primeiro domínio variável de cadeia leve por um primeiro ligante de comprimento suficiente
20 (e.g., GEGTSTGS(G₂S)₂GGAD (SEQ ID NO.:57)) de forma que dito primeiro domínio variável de cadeia pesada e dito primeiro domínio variável de cadeia leve se dobrem para formar um primeiro domínio de ligação que liga a subunidade ϵ de CD3; e (b) um segundo domínio variável de cadeia pesada e um
25 segundo domínio variável de cadeia leve de um anticorpo que liga imunoesspecificamente um epitopo de EphA2 exposto na superfície da célula, dito segundo domínio variável de cadeia pesada covalentemente ligado a dito segundo domínio variável de cadeia leve por um segundo ligante de

comprimento suficiente (e.g., (G₄S)₃ (SEQ ID NO:59)) de forma que dito segundo domínio variável de cadeia pesada e dito segundo domínio variável de cadeia leve se dobrem para formar um segundo domínio de ligação que liga dito epitopo
 5 de EphA2, caracterizado pelo fato de dito primeiro domínio de ligação e dito segundo domínio de ligação serem covalentemente ligados por um terceiro ligante de um comprimento (e.g., G₄S (SEQ ID NO:58)) de forma que dito primeiro domínio de ligação e dito segundo domínio de
 10 ligação se dobrem independentemente um do outro.

Em avanços específicos, os EphA2-BiTEs da invenção compreendem qualquer dos seguintes arranjos na direção 5' a 3':
 15 (1) VH_{CD3}-VL_{CD3}-VH_{EphA2}-VL_{EphA2}; (2) VL_{CD3}-VH_{CD3}-VH_{EphA2}-VL_{EphA2}; (3) VL_{CD3}-VH_{CD3}-VL_{EphA2}-VH_{EphA2}; (4) VH_{CD3}-VL_{CD3}-VL_{EphA2}-VH_{EphA2}; (5) VH_{EphA2}-VL_{EphA2}-VH_{CD3}-VL_{CD3}; (6) VL_{EphA2}-VH_{EphA2}-VH_{CD3}-VL_{CD3}; (7) VL_{EphA2}-VH_{EphA2}-VL_{CD3}-VH_{CD3}; ou (8) VH_{EphA2}-VL_{EphA2}-VL_{CD3}-VH_{CD3}. Ver, e.g., FIG. 14A para uma representação genérica dos constructos EphA2-BiTE da invenção.

20

Como é bem conhecido, um fragmento de anticorpo que contém um domínio completo de reconhecimento e ligação a antígeno, em certas circunstâncias pode consistir de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um domínio
 25 variável de cadeia leve (VH e VL) em associação não covalente. Nessa configuração que corresponde àquela encontrada em anticorpos nativos, as três regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação a

antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação a antígeno para o anticorpo. Regiões ferramenta (FRs) flanqueando as CDRs possuem uma estrutura terciária que é essencialmente conservada em imunoglobulinas nativas em espécies tão diversas como humanos e camundongos. Essas FRs servem para segurar as CDRs e sua orientação apropriada. Os domínios constantes não são necessários para a função de ligação, mas podem auxiliar em estabilizar a interação VH-VL. Mesmo um domínio variável simples (ou meio de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) possui a habilidade para reconhecer e ligar antígeno com alta estabilidade conformacional (ver, e.g., Dumoulin et al., 2002, Protein Science 11:500-515). Dessa forma, dito domínio do domínio de ligação de um EphA2-BiTE da invenção podem compreender um par de domínios VH-VL tanto das mesmas ou de diferentes imunoglobulinas. A ordem dos domínios VH e VL na cadeia polipeptídica não é decisiva para a presente invenção; a invenção engloba todos os arranjos possíveis dos domínios variáveis. É importante, contudo, que os domínios VH e VL estejam arrançados de forma que o domínio de ligação a antígeno possa se dobrar corretamente para reconhecer e ligar o antígeno. Em um avanço específico, os domínios do domínio de ligação a EphA2 podem ser da mesma ou de uma imunoglobulina diferente.

Dessa maneira, os EphA2-BiTEs da invenção podem compreender qualquer arranjo do domínio variável pesado e domínio variável leve de cada anticorpo (e.g., os domínios

VH e VL de um anticorpo que se liga imuno especificamente a CD3 e os domínios VH e VL de um anticorpo que se liga imuno especificamente a outro antígeno de interesse (e.g., EphA2)), e cada domínio pode estar localizado na porção N terminal ou C terminal da molécula BiTE. Por exemplo, e não por meio de limitação, uma molécula EphA2-BiTE da invenção pode compreender os seguintes arranjos como destacado na seguinte tabela:

Posição N terminal	Posição C terminal
EA2 (VL/VH)	anti-CD3 desimunizado (VH/VL)
EA2 (VH/VL)	
EA5 (VL/VH)	anti-CD3 desimunizado (VH/VL)
EA5 (VH/VL)	
anti-CD3 desimunizado (VH/VL)	EA2 (VL/VH)
	EA2 (VH/VL)
anti-CD3 desimunizado (VH/VL)	EA5 (VL/VH)
	EA5 (VH/VL)

10

Ditos domínios de ligação discutidos acima são preferencialmente conectados por um ligante flexível, preferencialmente por um polipeptídeo ligante disposto entre ditos domínios, caracterizado pelo fato de que polipeptídeo ligante compreende aminoácidos plurais,

15

hidrofílicos, ligados a peptídeo de um comprimento suficiente para sobrepujar a distância entre a extremidade C terminal de um de ditos domínios compreendendo ditos domínios de ligação e a extremidade N terminal de outros ditos domínios compreendendo ditos domínios de ligação quando o polipeptídeo da invenção assume uma conformação adequada para se ligar quando disposto em solução aquosa. Preferencialmente, dito polipeptídeo ligante compreende uma pluralidade de resíduos de glicina, alanina e/ou serina. É ainda preferível que dito polipeptídeo ligante compreenda uma pluralidade de cópias consecutivas de uma sequência de aminoácidos. Usualmente, o polipeptídeo ligante compreende de 1 a 15 aminoácidos, apesar de que polipeptídeos ligantes de mais de 15 aminoácidos possam também funcionar. Em certos avanços, os ligantes da invenção compreendem um comprimento de pelo menos 5 resíduos, pelo menos 10 resíduos, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos ou mais. Em outros avanços, os ligantes da invenção compreendem um comprimento entre 2-4 resíduos, entre 2-4 resíduos, entre 2-6 resíduos, entre 2-8 resíduos, entre 2-10 resíduos, entre 2-12 resíduos, entre 2-14 resíduos, entre 2-16 resíduos, entre 2-18 resíduos, entre 2-20 resíduos, entre 2-22 resíduos, entre 2-24 resíduos, entre 2-26 resíduos, entre 2-28 resíduos, ou entre 2-30 resíduos. Exemplos de ligantes que podem ser usados de acordo com os métodos da invenção são encontrados em FIG. 3 (SEQ ID NOS.:57-59).

Em um avanço da invenção, um anticorpo ou ligante que se liga imuno especificamente a EphA2 pode compreender uma porção da molécula BiTE. Por exemplo, a VH e/ou VL (preferencialmente um scFV) de um anticorpo que se liga
5 imuno especificamente a EphA2 pode ser fusionada a uma porção de ligação a anti-CD3, tal como aquela da molécula descrita acima, criando, assim, um anticorpo biespecífico de cadeia simples que direciona EphA2. Além dos domínios VH e/ou VL de um anticorpo EphA2, outras moléculas que
10 ligam EphA2 podem compreender o EphA2-BiTE, por exemplo receptores ou ligantes (e.g., uma Efrina).

Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção é um anticorpo biespecífico de cadeia simples que compreende
15 um primeiro domínio de ligação que se liga imuno especificamente CD3, e um segundo domínio de ligação que se liga imuno especificamente EphA2. Em um avanço específico, o primeiro domínio de ligação compreende uma versão desimmunizada dos domínios VH e VL de um anticorpo
20 que se liga imuno especificamente a CD3. Também de acordo com este avanço, o segundo domínio de ligação compreende os domínios VH e VL de EA2. Preferencialmente, o arranjo das regiões variáveis de um EphA2-BiTE da invenção é o seguinte: VH-VL no domínio de ligação CD3, e VH-VL no
25 domínio de ligação EphA2. Também de acordo com este avanço, em um avanço específico, o segundo domínio de ligação compreende o domínio VH e/ou VL de EA2, EA3, EA4, EA5, 3F2, 4H5, 2A4, 2E7, 12E2, Eph099B-102.147, Eph099B-

208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, Eph101.530.241, 233 ou G5.

Métodos de produzir os anticorpos, dos quais os EphA2-
5 BiTES (em particular, os EphA2-BiTES que são anticorpos
biespecíficos de cadeia simples) da invenção são derivados,
são bem conhecidos na arte e podem ser encontrados, por
exemplo, em US 2004-0091486 A1 (May 13, 2004), US 2004-
0028685 A1 (12 de fevereiro de 2004) e WO 99/5440 (e
10 referências aí reveladas), cada qual é aqui incorporada por
referência em sua íntegra. Para informações relacionadas a
variantes 2A4, 2E7 e 12E2 de anticorpo agonísticos EphA2 de
afinidade otimizada, ver também U.S. Provisional Appn.
No.60/751.964, preenchida em 21 de dezembro de 2005,
15 intitulada "Afinity Optimized EphA2 Agonistic Antibodies
and Methods of Use Thereof," que é aqui incorporada por
referência em sua íntegra.

EphA2 Anticorpos

20

Como discutido acima, a invenção engloba engajadores
biespecíficos de células T (i.e., EphA2-BiTES (em
particular, EphA2-BiTES que são anticorpos biespecíficos de
cadeia simples) compreendendo pelo menos dois domínios de
25 ligação específicos para os antígenos EphA2 e CD3,
respectivamente. Os EphA2-BiTES da invenção compreendem um
primeiro domínio de ligação que se liga ao antígeno CD3 de
célula T e um segundo domínio de ligação que se liga a um
polipeptídeo EphA2 ou a um fragmento desse.

Em um avanço específico, o domínio de ligação que se liga imuno especificamente a EphA2 é um Fv de cadeia simples (scFv). Como aqui usado, o termo "Fv de cadeia simples" ou "scFv" refere-se a fragmentos de anticorpo compreendendo os domínios VH e VL de um anticorpo, caracterizado pelo fato de que esses domínios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende, ainda, um polipeptídeo ligante entre os domínios VH e VL que permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação a antígeno. Métodos para produzir scFvs são bem conhecidos na arte. Para uma revisão de métodos para produzir scFvs, ver Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Em um avanço, o domínio de ligação de um EphA2-BiTE que se liga imuno especificamente a EphA2 é derivado de um scFV produzido a partir de qualquer anticorpo, incluindo os anticorpos EphA2 aqui descritos.

20

Em avanços específicos, os anticorpos EphA2 usados para gerar os EphA2-BiTEs incluem moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, i.e., moléculas que contêm um domínio de ligação a antígeno que se liga imuno especificamente a um antígeno EphA2, e.g., uma ou mais regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo anti-EphA2. Os anticorpos EphA2 dos quais o domínio de ligação a EphA2 dos EphA2-BiTEs são derivados

25

podem ser de qualquer tipo (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

5 Em outros avanços específicos, os anticorpos EphA2 usados para gerar os EphA2-BiTEs englobados pela invenção são EA2 (ver FIG. 1), EA3, EA4, EA5 (ver FIG. 2), 3F2 (ver FIG. 30), 4H5 (ver FIG. 32), 2A4 (FIG. 33), 2E7 (FIG. 34), 12E2 (FIG. 35), Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-10
10 210.248, Eph099B-233.152, Eph101.530.241, 233 (FIG. 29) e G5 (FIG. 42). Ver também, e.g., U.S. Patent Pub. Nos. US 2004-0091486 A1 (May 13, 2004), US 2004-0028685 A1 (Feb. 12, 2004), US 2005-0059592 A1 (Mar. 17, 2005), US 2005-0048617 A1, U.S. Appn. Ser. Nos. 11/165.023, preenchida em
15 24 de junho de 2005 e 11/203.251, preenchida em 15 de agosto de 2005, cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra. Anticorpos EA2 produtores de hibridomas (linhagem EA2.31) e EA5 (linhagem EA5.12) da invenção foram depositados com a American Type Culture Collection (ATCC,
20 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) em 22 de maio de 2002, e designados os números de acesso PTA-4380 e PTA-4381, respectivamente e incorporados por referência. Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, e Eph099B-210.248 foram depositados com a ATCC em 7 de agosto de 2002 e designados
25 os números de acesso (PTA-4572, PTA-4573, e PTA-4574, respectivamente). Eph099B-233.152 foi depositado com a ATCC em 12 de maio de 2003 e designado o número de acesso PTA-5194, e Eph101.530.241 foi depositado com a ATCC em 26 de setembro de 2002 e designado o número de acesso PTA-

4724. Todos os depósitos anteriormente mencionados foram feitos sob as condições do Tratado de Budapeste sobre Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Propósitos de Procedimentos de Patentes (*Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedures*), e os números de acesso e datas correspondentes aos respectivos anticorpos são aqui incorporados por referência em sua íntegra.

10

Em um avanço específico, os anticorpos usados para criar os EphA2-BiTEs usando os métodos da invenção são versões humanas ou humanizadas dos anticorpos EphA2 mencionados anteriormente. Tais anticorpos EphA2 humanizados e métodos de produção são descritos em, e.g., U.S. Patent Appln. Publn. No. US 2005-0048617 A1, e Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36:43-60, cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra. Em outro avanço específico, o anticorpo EphA2 usado para gerar um EphA2-BiTE da invenção é EA2. Ainda em outro avanço específico, os anticorpos usados para criar um EphA2-BiTE usando os métodos da invenção são versões humanizadas com afinidade otimizada dos anticorpos mencionados anteriormente. De acordo com este avanço, o domínio de ligação que se liga imuno especificamente a EphA2 de um EphA2-BiTE da invenção é derivado de 2A4, 2E7 e 12E2. Para informações relacionadas com variantes 2A4, 2E7 e 12E2 de anticorpos agonísticos EphA2 de afinidade otimizada, ver também U.S. Provisional Appn. No. 60/751.964, preenchida em 21 de dezembro de 2005,

intitulada "Afinity Optimized EphA2 Agonistic Antibodies and Methods of Use Thereof", que é aqui incorporada por referência em sua íntegra.

5 As seqüências de alguns anticorpos EphA2 são descritas nas FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37 ou 39, ou nas publicações descrevendo as seqüências dos anticorpos EphA2 citados acima. Métodos para preparar os anticorpos EphA2 dos quais os EphA2-BiTEs da invenção são gerados estão
10 descritos, por exemplo, em U.S. Patent Pub. Nos. US 2004-0091486 A1 (13 de maio de 2004), US 2004-0028685 A1 (12 de fevereiro de 2004), US 2005-0059592 A1 (17 de março de 2005), US 2005-0048617 A1, U.S. Appn. Ser. Nos. 11/165.023, preenchida em 24 de junho de 2005 e 11/203.251, preenchida
15 em 15 de agosto de 2005, cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra.

 A presente invenção provê EphA2-BiTEs derivados de anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um
20 polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos podem compreender uma CDR VH tendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer uma das CDRs VH sublinhadas, por exemplo, nas FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37 ou 39, ou nas publicações descrevendo os anticorpos EphA2 citados
25 acima. Em particular, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a EphA2, domínio de ligação este compreende (ou alternativamente, consiste de) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDRs VH tendo uma seqüência de

aminoácidos de qualquer das CDRs VH listadas em, por exemplo, FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37 ou 39, ou nas publicações descrevendo as seqüências dos anticorpos EphA2 citados acima.

5

A presente invenção provê EphA2-BiTEs derivados de anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos podem compreender uma CDR VL tendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer uma das CDRs VL sublinhadas, por exemplo, nas FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37 ou 39, ou nas publicações descrevendo os anticorpos EphA2 citados acima. Em particular, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a EphA2, domínio de ligação este compreende (ou alternativamente, consiste de) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDRs VL tendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer das CDRs VL listadas, por exemplo, nas FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37 ou 39, ou nas publicações descrevendo as seqüências dos anticorpos EphA2 citados acima.

A presente invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a EphA2, domínio de ligação este que compreende (ou alternativamente consiste de) uma CDR1 VH e uma CDR1 VL; uma CDR1 VH uma CDR2 VL; uma CDR1 VH e uma CDR3 VL; uma CDR2 VH e uma CDR1 VL; CDR2 VH e CDR2 VL; uma CDR2 VH e uma CDR3 VL; uma CDR3 VH e uma CDR1 VH; uma CDR3 VH e uma CDR2

VL; uma CDR3 VH e uma CDR3 VL; uma VH1 CDR1, uma CDR2 VH e uma CDR1 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH e uma CDR3 VL; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR1 VL, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR2 VL; 5 uma CDR2 VH, uma CDR2 VH e uma CDR3 VL; uma CDR1 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR1 10 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR1 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR3 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR1 VH, uma CDR3 VH, uma 15 CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR2 VL e uma CDR3 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e 20 uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR3 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR1 VL, uma CDR2 VL, e uma CDR3 VL; uma CDR1 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL, uma CDR2 VL, e uma CDR3 VL; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL, uma CDR2 VL, e uma CDR3 VL; ou 25 qualquer combinação dessas das CDRs VH e CDRs VL descritas, por exemplo, nas FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37 ou 39, ou nas publicações descrevendo as seqüências dos anticorpos EphA2 citados acima.

Em outros avanços, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imunoesspecificamente a EphA2, domínio de ligação este que compreende (ou alternativamente consiste de) um domínio VH e um domínio VL de qualquer dos anticorpos EphA2 mencionados anteriormente *supra*, e por exemplo como descrito nas FIGS. 1, 2, 29, 30, 32, 33, 34, 35 ou 37, ou nas publicações descrevendo as seqüências dos anticorpos EphA2 citados acima. Em um avanço específico, os domínios VH e VL são de anticorpos 2A4, 2E7 e 12E2. Ver, e.g., FIGS. 33, 34, 35 e 37.

Em um avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imunoesspecificamente a EphA2, domínio de ligação este é derivado de anticorpos que se ligam imunoesspecificamente a um polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma taxa de associação constante ou taxa k_{on} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de pelo menos $10^4 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $10^5 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $1,5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $2,5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $10^6 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $10^7 M^{-1}s^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, ou pelo menos $10^8 M^{-1}s^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^5 a $10^8 M^{-1}s^{-1}$, e uma faixa de cerca de $1,5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ a $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, em uma faixa de cerca de 2×10^5 a $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de $4,5 \times 10^5$ a $10^7 M^{-1}s^{-1}$. Em certos avanços, um anticorpo que se liga imunoesspecificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{on} de pelo menos $10^4 M^{-1}s^{-1}$,

pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ como determinado por um teste de ressonância de plasmon de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a EphA2, domínio de ligação este é derivado de anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma taxa k_{off} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, ou menos de 10^{-10} s^{-1} , ou em uma faixa de cerca de 10^{-3} to 10^{-10} s^{-1} , em uma faixa de cerca de 10^{-4} to 10^{-8} s^{-1} , ou em uma faixa de cerca de 10^{-5} to 10^{-8} s^{-1} . Em certos avanços, um anticorpo que se liga imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{off} de 10^{-2} s^{-1} , ou menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, ou menos de 10^{-4} s^{-1} , como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

25

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a EphA2, domínio de ligação é derivado de anticorpos que se ligam imuno especificamente a um

polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma constante de afinidade ou K_a (k_{on}/k_{off}) de pelo menos 10^2 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^3 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^4 M^{-1} ,
 5 pelo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^5 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^6 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^7 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^8 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^9 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{10} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, pelo
 10 menos 10^{11} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{12} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{13} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{14} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{15} M^{-1} , ou pelo menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^2 a $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, em uma faixa de cerca de 10^4 a 1
 15 $\times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^5 a $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-
 20 BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a EphA2, domínio de ligação este é derivado de anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma constante de dissociação ou K_d
 25 (k_{off}/k_{on}) de menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-12} M ,

menos de 5×10^{-12} M, menos de 10^{-13} M, menos de 5×10^{-13} M, menos de 10^{-14} M, menos de 5×10^{-14} M, menos de 10^{-15} M, ou menos de 5×10^{-15} M ou em uma faixa de cerca de 10^{-2} M to 5×10^{-5} M, em uma faixa de cerca de 10^{-6} to 10^{-15} M, ou em uma
 5 faixa de cerca de 10^{-8} to 10^{-14} M, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em um avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2,
 10 caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma taxa de constante de associação ou taxa de k_{on} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de pelo menos $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos 5
 15 $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^5 a $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em uma faixa de cerca de $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em uma faixa de cerca de 2×10^5 a $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou em uma faixa
 20 de cerca de $4,5 \times 10^5$ a $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Em certos avanços, um EphA2-BiTE que se liga imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{on} de pelo menos $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos 5×10^6
 25 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imuno-especificamente a um polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma taxa k_{off} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, ou menos de 10^{-10} s^{-1} , ou em uma faixa de cerca de 10^{-3} a 10^{-10} s^{-1} , em uma faixa de cerca de 10^{-4} a 10^{-8} s^{-1} , ou em uma faixa de cerca de 10^{-5} a 10^{-8} s^{-1} . Em certos avanços, um EphA2-BiTE que se liga imuno-especificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{off} de 10^{-2} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, ou menos de 10^{-4} s^{-1} , como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imuno-especificamente a um polipeptídeo EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma constante de afinidade ou K_a ($k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$) de pelo menos 10^2 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^3 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^4 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^5 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^6 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^7 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^8 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^9 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{10} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{11} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{12} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$.

¹, pelo menos 10^{13} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{14} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{15} M^{-1} , ou pelo menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^2 a $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, em uma faixa de cerca de 10^4 a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, ou em uma
5 faixa de cerca de 10^5 a $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo
10 EphA2, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma constante de dissociação ou K_d ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) de menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times$
15 10^{-9} M , menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-12} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, menos de 10^{-13} M , menos de $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, menos de 10^{-14} M , menos de $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, menos de 10^{-15} M , ou menos de $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ ou em uma faixa de cerca de 10^{-2} M a $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, em uma
20 faixa de cerca de 10^{-6} a 10^{-15} M , ou em uma faixa de cerca de 10^{-8} a 10^{-14} M , como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Anticorpos CD3

25

Em avanços específicos da invenção, os EphA2-BiTEs compreendem um domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a antígeno de célula T CD3. Dito antígeno de célula T CD3 pode ser de qualquer espécie

(e.g., humano). Em um avanço específico, os EphA2-BiTEs da invenção compreendem um domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a uma ou mais subunidades de CD3 (e.g., a subunidade gama, delta, zeta, ou eta). Em um avanço preferencial, o primeiro domínio de ligação se liga imunoespecificamente à subunidade épsilon (ϵ) de CD3. Em um avanço específico, o primeiro domínio de ligação se liga imunoespecificamente à subunidade épsilon (ϵ) de CD3 quando dita subunidade é complexada com a subunidade delta de CD3.

10 Em um avanço específico, o domínio de ligação CD3 de um EphA2-BiTE da invenção é desimunizado. Abordagens de desimunização são bem conhecidas na arte e estão descritas em, e.g., International Pub. Nos. WO 00/34317 (e em particular, pp. 1-14); WO 98/52976 (e em particular, 15 Exemplos 1-6 nas pp. 18-38); WO 02/079415 (em particular, pp. 2-8 e Exemplos 1-10 nas pp. 15-43); e WO 92/10755 (e em particular, pp. 6-9), cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra.

20 Em um avanço específico, o domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a CD3 é um Fv de cadeia simples (scFv). Como aqui usado, o termo "Fv de cadeia simples" ou "scFv" refere-se a fragmentos de anticorpos compreendendo os domínios VH e VL de um anticorpo, caracterizado pelo 25 fato desses domínios estarem presentes em uma única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende ainda um polipeptídeo ligante entre os domínios VH e VL que permite que scFv forme a estrutura desejada para ligação a antígeno. Métodos para produzir scFvs são bem conhecidos

na arte. Para uma revisão de métodos para produzir scFvs ver Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Em um avanço, os EphA2-BiTEs da
5 invenção são derivados de scFvs produzidos de qualquer dos anticorpos EphA2 descritos abaixo.

Em avanços específicos, os anticorpos CD3 usados para gerar os EphA2-BiTEs incluem moléculas de imunoglobulina e
10 porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, i.e., moléculas que contêm um domínio de ligação a antígeno que se liga imuno especificamente a um antígeno CD3, e.g., uma ou mais regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo anti- CD3. Os
15 anticorpos CD3 dos quais o domínio de ligação a CD3 dos EphA2-BiTEs são derivados podem ser de qualquer tipo (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) ou subclasse de moléculas de imunoglobulina. Tais anticorpos CD3 podem ser de qualquer
20 espécie (e.g., rato, camundongo, homem, etc.).

Em um avanço específico, o domínio de ligação CD3 de um EphA2-BiTE da invenção pode ser produzido como descrito em International Publication No. WO 99/54440 (p. 3 e Figure
25 8), que é aqui incorporada por referência em sua íntegra. Anticorpos anti-CD3 dos quais dito domínio de ligação é derivado são também descritos, por exemplo, em Kipriyanov, 1998, Int. J. Cancer 77:763-772 (p. 763-765); Dreier et

al., 2002, Int. J. Cancer 100:690-697 (p. 691), cada qual é aqui incorporado por referência em sua íntegra.

A presente invenção provê EphA2-BiTEs derivados de anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos podem compreender uma CDR VH tendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer das CDRs VH descritas, por exemplo, nas publicações descrevendo os anticorpos CD3 ou fragmentos de ligação citados acima. Em particular, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a CD3, domínio de ligação este que compreende (ou alternativamente, consiste de) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDRs VH tendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer das CDRs VH descritas, por exemplo, nas publicações descrevendo os anticorpos CD3 ou fragmentos de ligação citados acima.

A presente invenção provê EphA2-BiTEs derivados de anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos podem compreender uma CDR VL tendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer das CDRs VL descritas, em por exemplo, as publicações descrevendo os CD3 anticorpos ou fragmentos de ligação citados acima. Em particular, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a CD3, domínio de ligação este que compreende (ou alternativamente, consiste de) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDRs VL tendo

uma sequência de aminoácidos de qualquer das CDRs VL descritas, por exemplo, nas publicações descrevendo os anticorpos CD3 ou fragmentos de ligação citados acima.

5 A presente invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a polipeptídeo CD3, domínio de ligação este que compreende (ou alternativamente consiste de) uma CDR1 VH e uma CDR1 VL; uma CDR1 VH e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH e uma VL CDR3; 10 uma CDR2 VH e uma CDR1 VL; CDR2 VH e CDR2 VL; uma CDR2 VH e uma VL CDR3; uma CDR3 VH e uma CDR1 VH; uma CDR3 VH e uma CDR2 VL; uma CDR3 VH e uma VL CDR3; uma VH1 CDR1, uma CDR2 VH e uma CDR1 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH e uma VL CDR3; uma CDR2 VH, uma 15 CDR3 VH e uma CDR1 VL, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR2 VL; uma CDR2 VH, uma CDR2 VH e uma VL CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e 20 uma CDR2 VL; uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR1 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH e uma VL CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR2 VL e uma VL

CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma CDR2 VL; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL e uma VL CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR2 VH, uma CDR1 VL, uma CDR2 VL, e uma VL CDR3; uma CDR1 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL, uma CDR2 VL, e uma VL CDR3; uma CDR2 VH, uma CDR3 VH, uma CDR1 VL, uma CDR2 VL, e uma CDR3 VL; ou qualquer combinação dessas das CDRs VH e CDRs VL dos CD3 anticorpos descritos acima.

10 Em outros avanços, a invenção provê EphA2-BiTEs derivados de anticorpos que se ligam imunoespecificamente a CD3, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos podem compreender um domínio VH e um domínio VL de um anticorpo CD3 descrito acima.

15

Em um avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, domínio de ligação este que é derivado de anticorpos que se ligam

20 imunoespecificamente a um CD3, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma constante de taxa de associação ou taxa k_{on} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de pelo menos $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2,5 \times$

25 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^5 to $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, em uma faixa de cerca de $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, em uma faixa de cerca de 2×10^5 a $1 \times$

$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de $4,5 \times 10^5$ a $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em certos avanços, um anticorpo que se liga imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{on} de pelo menos $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos 5 $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

10 Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno especificamente a CD3, domínio de ligação este que é derivado de anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos
15 anticorpos possuem uma taxa k_{off} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de
20 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, ou menos de 10^{-10} s^{-1} , ou em uma faixa de cerca de 10^{-3} a 10^{-10} s^{-1} , em uma faixa de cerca de 10^{-4} a 10^{-8} s^{-1} , ou em uma faixa de cerca de 10^{-5} a 10^{-8} s^{-1} . Em certos avanços, um anticorpo que se liga imuno especificamente a um
25 polipeptídeo EphA2 possui uma k_{off} de 10^{-2} s^{-1} , de menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, ou menos de 10^{-4} s^{-1} , como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno-especificamente a CD3, domínio de ligação este que é derivado de anticorpos que se ligam imuno-especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma constante de afinidade ou K_a (k_{on}/k_{off}) de pelo menos 10^2 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^3 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^4 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^5 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^6 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^7 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^8 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^9 M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{10} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{11} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{12} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{13} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{14} M^{-1} , pelo menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, pelo menos 10^{15} M^{-1} , ou pelo menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^2 to $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, em uma faixa de cerca de 10^4 to $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^5 to $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs compreendendo um domínio de ligação que se liga imuno-especificamente a CD3, domínio de ligação este que é derivado de anticorpos que se ligam imuno-especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos anticorpos possuem uma constante de dissociação ou K_d (k_{off}/k_{on}) de menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de

10^{-6} M, menos de 5×10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 5×10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 5×10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 5×10^{-10} M, menos de 10^{-11} M, menos de 5×10^{-11} M, menos de 10^{-12} M, menos de 5×10^{-12} M, menos de 10^{-13} M, menos de 5×10^{-13} M, menos de 10^{-14} M, menos de 5×10^{-14} M, menos de 10^{-15} M, ou menos de 5×10^{-15} M ou em uma faixa de cerca de 10^{-2} M a 5×10^{-5} M, em uma faixa de cerca de 10^{-6} a 10^{-15} M, ou em uma faixa de cerca de 10^{-8} a 10^{-14} M, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em um avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma constante de taxa de associação ou taxa k_{on} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de pelo menos $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^5 a $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, em uma faixa de cerca de $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, em uma faixa de cerca de 2×10^5 a $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de $4,5 \times 10^5$ a $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em certos avanços, um EphA2-BiTE que se liga imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{on} de pelo menos $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou pelo menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma taxa k_{off} (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag) de menos de $10^{-3} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-3} s^{-1}$, menos de $10^{-4} s^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $10^{-5} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-5} s^{-1}$, menos de $10^{-6} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-6} s^{-1}$, menos de $10^{-7} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-7} s^{-1}$, menos de $10^{-8} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-8} s^{-1}$, menos de $10^{-9} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-9} s^{-1}$, ou menos de $10^{-10} s^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^{-3} a $10^{-10} s^{-1}$, em uma faixa de cerca de 10^{-4} a $10^{-8} s^{-1}$, ou em uma faixa de cerca de 10^{-5} a $10^{-8} s^{-1}$. Em certos avanços, um EphA2-BiTE que se liga imuno especificamente a um polipeptídeo EphA2 possui uma k_{off} de $10^{-2} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-3} s^{-1}$, ou menos de $10^{-4} s^{-1}$, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

20

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma constante de afinidade ou K_a (k_{on}/k_{off}) de pelo menos $10^2 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^2 M^{-1}$, pelo menos $10^3 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^3 M^{-1}$, pelo menos $10^4 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^4 M^{-1}$, pelo menos $10^5 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^5 M^{-1}$, pelo menos $10^6 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^6 M^{-1}$, pelo menos $10^7 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^7 M^{-1}$, pelo menos $10^8 M^{-1}$, pelo menos 5×10^8

M⁻¹, pelo menos 10⁹ M⁻¹, pelo menos 5 X 10⁹ M⁻¹, pelo menos 10¹⁰ M⁻¹, pelo menos 5 X 10¹⁰ M⁻¹, pelo menos 10¹¹ M⁻¹, pelo menos 5 X 10¹¹ M⁻¹, pelo menos 10¹² M⁻¹, pelo menos 5 X 10¹² M⁻¹, pelo menos 10¹³ M⁻¹, pelo menos 5 X 10¹³ M⁻¹, pelo menos 10¹⁴ M⁻¹, pelo menos 5 X 10¹⁴ M⁻¹, pelo menos 10¹⁵ M⁻¹, ou pelo menos 5 X 10¹⁵ M⁻¹, ou em uma faixa de cerca de 10² a 5 X 10⁵ M⁻¹, em uma faixa de cerca de 10⁴ a 1 X 10¹⁰ M⁻¹, ou em uma faixa de cerca de 10⁵ a 1 X 10⁸ M⁻¹, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

10

Em outro avanço específico, a invenção provê EphA2-BiTEs que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, caracterizado pelo fato de que ditos EphA2-BiTEs possuem uma constante de dissociação ou K_d (k_{off}/k_{on}) de menos de 10⁻⁵ M, menos de 5 X 10⁻⁵ M, menos de 10⁻⁶ M, menos de 5 X 10⁻⁶ M, menos de 10⁻⁷ M, menos de 5 X 10⁻⁷ M, menos de 10⁻⁸ M, menos de 5 X 10⁻⁸ M, menos de 10⁻⁹ M, menos de 5 X 10⁻⁹ M, menos de 10⁻¹⁰ M, menos de 5 X 10⁻¹⁰ M, menos de 10⁻¹¹ M, menos de 5 X 10⁻¹¹ M, menos de 10⁻¹² M, menos de 5 X 10⁻¹² M, menos de 10⁻¹³ M, menos de 5 X 10⁻¹³ M, menos de 10⁻¹⁴ M, menos de 5 X 10⁻¹⁴ M, menos de 10⁻¹⁵ M, ou menos de 5 X 10⁻¹⁵ M ou em uma faixa de cerca de 10⁻² M a 5 X 10⁻⁵ M, em uma faixa de cerca de 10⁻⁶ a 10⁻¹⁵ M, ou em uma faixa de cerca de 10⁻⁸ a 10⁻¹⁴ M, como determinado por um teste de ressonância de *plasmon* de superfície.

25

Conjugados EphA2-BiTE

A presente invenção está relacionada ainda a engajadores biespecíficos de células T (*i.e.*, EphA2-BiTEs (em particular, EphA2-BiTEs que são anticorpos biespecíficos de cadeia simples) compreendendo pelo menos 5 um domínio adicional, dito domínio estando ligado por ligações covalentes ou não covalentes. O domínio adicional pode ser de uma especificidade ou função pré-definida. Dessa maneira, a presente invenção está relacionada ao uso dos EphA2-BiTEs da invenção fusionados de forma 10 recombinante ou quimicamente conjugados (incluindo ambas conjugações covalentes e não covalentes) a um polipeptídeo heterólogo (ou fragmento desse, preferencialmente a um polipeptídeo de pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 15 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos) para gerar proteínas de fusão. A fusão não precisa necessariamente ser direta, mas pode ocorrer através de seqüências ligantes. Por exemplo, anticorpos podem ser usados para direcionar polipeptídeos heterólogos 20 para tipos de células em particular, tanto *in vitro* ou *in vivo*, fusionando ou conjugando os anticorpos para anticorpos específicos para receptores de superfície de célula em particular. Ver *e.g.*, International Publication WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., 1994, *Immunol.* 25 *Lett.* 39:91-99; U.S. Patent 5.474.981; Gillies et al., 1992, *PNAS* 89:1428-1432; e Fell et al., 1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452, que são aqui incorporados por referência em sua íntegra.

A presente invenção inclui ainda composições compreendendo polipeptídeos heterólogos fusionados ou conjugados a fragmentos de EphA2-BiTEs. Por exemplo, os polipeptídeos heterólogos podem ser fusionados ou
5 conjugados a um fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, ou fragmento desses. Métodos para fusionar ou conjugar polipeptídeos a fragmentos de anticorpos são conhecidos na arte. Ver, e.g., U.S. Patent Nos. 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851,
10 e 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; International Publication Nos. WO 96/04388 e WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; e Vil et al., 1992, *PNAS* 89:11337-11341 (ditas referências incorporadas por referência em sua
15 íntegra).

Proteínas de fusão adicionais, e.g., de qualquer dos EphA2-BiTEs mencionados anteriormente, podem ser gerados através de técnicas de embaralhamento de genes,
20 embaralhamento de motivos, embaralhamento de éxons, e/ou embaralhamento de códon (coletivamente referidos como "embaralhamento de DNA"). Embaralhamento de DNA pode ser empregado para alterar as atividades de anticorpos da invenção (e.g., anticorpos com maiores afinidades ou
25 menores taxas de dissociação). Ver, em geral, U.S. Patent Nos. 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; e 5.837.458, e Patten et al., 1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson, et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; e Lorenzo and

Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308 (cada dessas patentes e publicações são aqui incorporadas por referência em sua íntegra). EphA2-BiTEs, ou os EphA2-BiTEs codificados, podem ser alterados sendo sujeitos a mutagênese randômica por PCR de *error-prone*, inserção randômica de nucleotídeo ou outros métodos antes de recombinação. Um ou mais fragmentos de um polinucleotídeo codificando um anticorpo ou fragmento de anticorpo, fragmentos estes que se ligam imuno-especificamente a EphA2 podem ser recombinados com um ou mais componentes, motivos, seções, partes, domínios, fragmentos, etc. de uma ou mais moléculas heterólogas.

Além do mais, os EphA2-BiTEs ou fragmentos desses podem ser fusionados a seqüências marcadores, tais como um peptídeo para facilitar a purificação. Em avanços preferidos, a seqüência de aminoácidos marcadora é um peptídeo de hexa-histidina, tal como a marca (tag) provida em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outras, várias das quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz et al., 1989, *PNAS* 86:821, por exemplo, hexa-histidina provê a purificação conveniente da proteína de fusão. Outras marcas peptídicas úteis para purificação incluem, mas não estão limitadas a, a marca hemaglutinina "HA", que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., 1984, *Cell* 37:767) e a marca "flag".

Em outros avanços, EphA2-BiTEs da presente invenção ou fragmentos ou variantes desses são conjugados a um agente diagnóstico ou detectável. Tais EphA2-BiTEs podem ser úteis para monitorar ou fazer um prognóstico do desenvolvimento ou progressão de um câncer como parte de um procedimento de teste clínico, tal como determinar a eficácia de uma terapia em particular. Adicionalmente, tais anticorpos podem ser úteis para monitorar ou fazer um prognóstico do desenvolvimento ou progressão de uma condição pré-cancerosa associada com células que sobre-expressam EphA2 (e.g., neoplasia prostática intraepitelial de alta graduação(PIN), fibroadenoma da doença fibrocística de mama, ou composto de nevi). Em um avanço, um epitopo de anticorpo EphA2 exposto é conjugado a um agente diagnóstico ou detectável. Em um avanço mais específico, o anticorpo é um EphA2-BiTE.

Tais diagnose e detecção podem ser conseguidos combinando o anticorpo a substâncias detectáveis incluindo, mas não limitadas a várias enzimas, tais como, mas não limitado a, peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; grupos prostéticos, tais como, mas não limitados a, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; materiais fluorescentes, tais como, mas não limitados a, umbeliferone, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloreto de dansil ou ficoeritrina; materiais luminescentes, tais como, mas não limitados a, luminol; materiais bioluminescentes,

tais como, mas não limitados a luciferase, luciferina, e aequorina; materiais radioativos, tais como, mas não limitados a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolínio (^{153}Gd , ^{159}Gd), gálio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germânio (^{68}Ge), hólmio (^{166}Ho), índio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), iodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantânio (^{140}La), lutécio (^{177}Lu), manganês (^{54}Mn), molibdênio (^{99}Mo), paládio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodímio (^{142}Pr), promécio (^{149}Pm), rênio (^{186}Re , ^{188}Re), ródio (^{105}Rh), rutênio (^{97}Ru), samário (^{153}Sm), escândio (^{47}Sc), selênio (^{75}Se), estrôncio (^{85}Sr), enxofre (^{35}S), tecnécio (^{99}Tc), titânio (^{201}Ti), estanho (^{113}Sn , ^{117}Sn), trítio (^3H), xenônio (^{133}Xe), itérbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), ítrio (^{90}Y), zinco (^{65}Zn); metais emissores de pósitrons usando várias tomografias de emissão de pósitrons, e íons metálicos não radioativos paramagnéticos.

Em um avanço, a localização de um EphA2-BiTE para um tecido(s) doente(s) (e.g., um tumor) pode ser determinada detectando-se uma forma rotulada do EphA2-BiTE no tecido.

Em um avanço específico, um EphA2-BiTE rotulado é detectado *in vivo* em um sujeito de acordo com um método compreendendo as etapas de: (a) administrar ao sujeito uma quantidade efetiva de um EphA2-BiTE rotulado, e (b) detectar o EphA2-BiTE rotulado no sujeito após um intervalo de tempo suficiente para permitir que o EphA2-BiTE se concentre em sítios no sujeito onde EphA2 é expressado. De acordo com este avanço, o EphA2-BiTE rotulado pode ser administrado ao sujeito de acordo com qualquer método adequado na arte, por exemplo, parenteralmente ou intraperitoneamente. Ainda, de

acordo com este avanço, a quantidade efetiva do EphA2-BiTE rotulado é a quantidade que permite a detecção do EphA2-BiTE no sujeito. Essa quantidade irá variar de acordo com o sujeito em questão, o rótulo usado, e o método de
5 detecção empregado. Por exemplo, é entendido na arte que o tamanho do sujeito e o sistema de imagem usado irá determinar a quantidade de EphA2-BiTE rotulado necessária para detectar o EphA2-BiTE em um sujeito usando meios de imageamento. No caso de um EphA2-BiTE radio-rotulado para
10 um humano, a quantidade de EphA2-BiTE rotulado administrado é medido em termos de radioatividade, por exemplo a partir de cerca de 5 até 20 milicuries de ^{99}Tc . O intervalo de tempo após a administração do EphA2-BiTE rotulado que é suficiente para permitir que EphA2-BiTE rotulado se
15 concentre em sítios no sujeito onde o EphA2 é expressado irá variar dependendo de diversos fatores, por exemplo, o tipo de rótulo usado, o modo de administração, e a parte do corpo do sujeito da qual é obtida a imagem. Em um avanço em particular, o intervalo de tempo que é suficiente é de 6
20 a 48 horas, 6 a 24 horas, ou 6 a 12 horas. Em outro avanço, o intervalo de tempo é de 5 a 20 dias ou 5 a 10 dias.

A presença de um EphA2-BiTE rotulado pode ser
25 detectada no sujeito usando meios de imageamento conhecidos na arte. Em geral, os meios de imageamento empregados dependem do tipo de rótulo usado. Especialistas serão capazes de determinar os meios apropriados para detectar um rótulo em particular. Métodos e dispositivos que podem ser

usados incluem, mas não estão limitados a, tomografia computadorizada (CT), varredura com escâner do corpo inteiro, tal como tomografia de emissão de posição (PET), imagem de ressonância magnética (MRI), e sonografia. Em um
5 avanço específico, o EphA2-BiTE é rotulado com um radioisótopo e é detectado no paciente usando um instrumento cirúrgico em resposta a radiação (Thurston et al., U.S. Patent No. 5.441.050). Em outro avanço, o EphA2-BiTE é rotulado com um composto fluorescente e é detectado
10 no paciente usando um instrumento de escâner de resposta a fluorescência. Em outro avanço, o EphA2-BiTE é rotulado com um metal emissor de pósitrons e é detectado no paciente usando tomografia de emissão de pósitrons. Ainda em outro avanço, o EphA2-BiTE é rotulado com um rótulo paramagnético
15 e é detectado em um paciente usando imagem de ressonância magnética (MRI).

A presente invenção engloba ainda usos de EphA2-BiTEs ou fragmentos desses conjugados a um agente terapêutico.

20

Um EphA2-BiTE da invenção pode ser conjugado a um componente terapêutico não macromolecular, tal como uma citotoxina, e.g., um agente citostático ou citocida, um agente terapêutico ou um íon metálico radioativo, e.g.,
25 alfa-emissores. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial a células. Exemplos incluem paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromet de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina,

daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina, e ciclofosfamida e
 5 análogos ou homólogos desses. Agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, antimetabólitos (e.g., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (e.g., mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina
 10 (BCNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cisdiclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclina (e.g., daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (e.g.,
 15 dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (e.g., vincristina e vinblastina).

Ainda, um EphA2-BiTE pode ser conjugado a um agente
 20 terapêutico ou arranjo de droga que modifica uma dada resposta biológica. Agentes terapêuticos ou arranjos de droga não devem ser contruídos como limitados a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, o arranjo de droga pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma
 25 atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina de cólera, ou toxina de difteria; uma proteína, tal como fator de necrose tumoral, α -interferon, β -interferon, fator de crescimento de nervo,

fator de crescimento derivado de plaqueta, ativador de tecido plasminogênico, um agente apoptótico, e.g., TNF- α , TNF- β , AIM I (ver, International Publication No. WO 97/33899), AIM II (ver, International Publication No. WO 97/34911), Fas Ligand (Takahashi et al., 1994, *J. Immunol.*, 6:1567), e VEGI (ver, International Publication No. WO 99/23105), um agente trombótico ou um agente anti-angiogênico, e.g., angiostatina ou endostatina; ou, um modificador de resposta biológica, tal como, por exemplo, uma linfoquina (e.g., interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina -6 ("IL-6"), fator estimulador de granulócito de colônia de macrófagos ("GM-CSF"), e fator estimulador de granulócito de colônia ("G-CSF")), ou um fator de crescimento (e.g., hormônio de crescimento ("GH")).

Além do mais, um EphA2-BiTE pode ser conjugado a componentes terapêuticos, tais como materiais radioativos ou queladores macrocíclicos úteis para conjugar íons de radiometais (para exemplos de materiais radioativos, ver acima). Em certos avanços, o queladore macrocíclico é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que pode ser anexado ao anticorpo via um molécula ligante. Tais moléculas ligantes são comumente conhecidas na arte e descritas em Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.* 4:2483-90; Peterson et al., 1999, *Bioconjug. Chem.* 10:553; e Zimmerman et al., 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26:943-50 cada um é incorporado por referência em sua íntegra.

Em um avanço específico, o EphA2-BiTE conjugado compreende um domínio que liga preferencialmente um epitopo de EphA2 exposto em células cancerosas, mas não em células
5 não cancerosas, ou em células infectadas, mas não em células não infectadas (i.e., anticorpo de epitopo de EphA2 exposto), e um segundo domínoi que liga preferencialmente CD3.

10 Técnicas para conjugar componentes terapêuticos a anticorpos são bem conhecidas. Moieties podem ser conjugados a anticorpos por qualquer método conhecido na arte, incluindo, mas não limitado a ligação de aldeído/Schiff, ligação de sulfidril, ligação ácido-lábile,
15 ligação de cis-aconitil, ligação de hidrazona, ligação enzimaticamente degradável (ver, em geral, Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:171-216). Técnicas adicionais para conjugar componentes terapêuticos a anticorpos são bem conhecidas, ver, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies
20 For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53
25 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The

Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58.

5 Métodos para fusionar ou conjugar anticorpos a componentes polipeptídicos são conhecidos na arte. Ver, e.g., U.S. Patent Nos. 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, e 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; International Publication Nos. WO 96/04388 e WO 91/06570;

10 Ashkenazi et al., 1991, *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; e Vil et al., 1992, *PNAS* 89:11337- 11341. A fusão de um anticorpo a um componente não precisa ser necessariamente direta, mas pode ocorrer através de seqüências ligantes. Tais moléculas ligantes

15 são comumente conhecidas na arte e descritas em Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.* 4:2483-90; Peterson et al., 1999, *Bioconjug. Chem.* 10:553; Zimmerman et al., 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26:943-50; Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:171-216, cada qual é aqui incorporado por

20 referência em sua íntegra.

EphA2-BiTEs podem ser também anexados a suportes sólidos, que são particularmente úteis para testes imuno ou purificação do antígeno alvo. Tais suportes sólidos

25 incluem, mas não estão limitados a, vidro, celulose, poliacrilamida, náilon, polistireno, cloreto de polivinil ou polipropileno.

Polinucleotídeos EphA2-BiTE da invenção

A presente invenção provê as seqüências dos polinucleotídeos codificando os EphA2-BiTES aqui descritos. Em um avanço específico, os polinucleotídeos da invenção
5 que codificam os EphA2-BiTES compreendem uma primeira seqüência de nucleotídeos codificando um primeiro domínio de ligação e uma segunda seqüência de nucleotídeos codificando um segundo domínio de ligação, e seqüências de nucleotídeos codificando seqüências ligantes que ligam o
10 primeiro e o segundo domínios de ligação. Ver, e.g., FIG. 3 para uma representação geral de um constructo de polinucleotídeo EphA2-BiTE. A presente invenção também provê seqüências de polinucleotídeos codificando EphA2-BiTES nos quais as seqüências de nucleotídeos codificando o
15 primeiro e/ou segundo domínio de ligação hibridiza às seqüências de nucleotídeos de um ou mais domínios variáveis de um anticorpo anti-EphA2 conhecido na arte ou aqui descrito (e.g., EA2, 4H5, 2A4, 2E7 ou 12E2) e/ou um anticorpo anti-CD3 conhecido na arte ou aqui descrito.

20

Em um avanço, EphA2-BiTES produzidos a partir de polinucleotídeos que hibridizam a polinucleotídeos codificando EphA2-BiTES que modulam a expressão de EphA2 e/ou induzem a lise redirecionada de células sobre-
25 expressando EphA2 por células T em um teste bem conhecido à arte ou aqui descrito. Em outro avanço, EphA2-BiTES usados nos métodos da invenção incluem polipeptídeos produzidos a partir de polinucleotídeos que hibridizam a polinucleotídeos codificando fragmentos de EphA2-BiTES.

Condições para hibridização incluem, mas não estão limitadas a, condições de hibridização estringentes, tais como hibridização a DNA ligado a filtro em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguido por
5 uma ou mais lavagens em 0,2X SSC/0,1% SDS a cerca de 50-65°C, condições altamente estringentes, tais como hibridização a DNA ligado a filtro em 6X SSC a cerca de 45°C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,1X SSC/0,2% SDS a cerca de 60°C, ou quaisquer outras condições de
10 hibridização estringentes conhecidas daqueles especialistas na arte (ver, por exemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY nas páginas 6.3.1 a 6.3.6 e 2.10.3).

15

Uma vez que a sequência de nucleotídeos do EphA2-BiTE usado nos métodos da invenção é determinada, a sequência de nucleotídeos pode ser manipulada usando métodos bem conhecidos na arte para a manipulação de sequências de
20 nucleotídeos, e.g., técnicas de DNA recombinante, mutagênese sítio direcionada, PCR, etc. (ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY e Ausubel et al., eds.,
25 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, que são ambos aqui incorporados por referência em sua íntegra), para gerar polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos diferente, por exemplo para criar substituições, deleções, e/ou inserções de aminoácidos.

Em avanços específicos, tais polipeptídeos possuem pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, ou pelo menos 6 substituições, deleções, e/ou
5 inserções de aminoácidos. Incluídas dentre possíveis substituições estão substituições conservativas, nas quais a sequência de aminoácidos é modificada substituindo um ou mais aminoácidos com aminoácidos diferentes que possuem características químicas ou estruturas similares e/ou não
10 alteram de modo significativo a função biológica do peptídeo.

Técnicas padrão conhecidas daqueles especialistas na arte podem ser usadas para introduzir mutações na sequência
15 de nucleotídeos codificando um EphA2-BiTE da invenção, incluindo, por exemplo, mutagênese sítio direcionada e mutagênese mediada por PCR que resulta em substituições de aminoácidos. Preferencialmente, os derivados incluem menos de 25 substituições de aminoácidos, menos de 20
20 substituições de aminoácidos, menos de 15 substituições de aminoácidos, menos de 10 substituições de aminoácidos, menos de 5 substituições de aminoácidos, menos de 4 substituições de aminoácidos, menos de 3 substituições de aminoácidos, ou menos de 2 substituições de aminoácidos
25 relativo à molécula original. Em um avanço preferencial, os derivados possuem substituições conservativas de aminoácidos são feitos em um ou mais resíduos de aminoácidos não essenciais previstos. Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma na qual o resíduo de

aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral com carga similar. Famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais com carga similar foram definidas na arte. Essas famílias incluem

5 aminoácidos com cadeias laterais básicas (e.g., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (e.g., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (e.g., asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (e.g.,

10 glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais polares beta-ramificadas (e.g., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e.g., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente,

15 mutações podem ser introduzidas randomicamente junto de toda ou parte da sequência codificadora, tais como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser rastreados para atividade biológica para identificar mutantes que retém atividade. Após a mutagênese, o EphA2-

20 BiTE codificado pode ser inserido em um vetor de expressão e expressado (e.g., em uma célula hospedeira heteróloga) e a atividade da proteína pode ser determinada como descrito abaixo.

25 A presente invenção também engloba o uso de anticorpos biespecíficos de cadeia simples compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer dos EphA2-BiTEs aqui descritos com mutações (e.g., uma ou mais substituições de aminoácidos) nas regiões ferramenta ou variáveis do

primeiro e/ou segundo domínio de ligação. Preferencialmente, essas mutações mantêm ou intensificam a avidéz e/ou afinidade dos EphA2-BiTEs para EphA2 e/ou CD3 aos quais se ligam imuno especificamente. Técnicas padrão
5 conhecidas daqueles especialistas na arte (e.g., testes imuno ou testes ELISA) podem ser usados para testar o grau de ligação entre um polipeptídeo EphA2-BiTE e seu parceiro de ligação.

10 Métodos de Produzir EphA2-BiTEs

Expressão Recombinante de um EphA2-BiTE

Os EphA2-BiTEs da invenção podem ser produzidos por
15 qualquer método conhecido na arte ou aqui descrito, em particular, por síntese química ou preferencialmente, por técnicas de expressão recombinante descritas *supra* (ver, e.g., WO 99/54440, que é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Ver também a Seção 6, *infra*, para exemplos
20 detalhados de métodos para produzir EphA2-BiTEs da invenção.

Os polinucleotídeos da invenção podem ser usados sozinhos ou como parte de um vetor para expressar os
25 polipeptídeos da invenção (e.g., EphA2-BiTEs) em células, por exemplo, em terapia gênica ou diagnose de desordens associadas com expressão aberrante (e.g., sobre-expressão) e/ou atividade de EphA2 (e.g., câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa ou uma infecção). Os

polinucleotídeos ou vetores contendo a(s) sequência(s) de DNA codificando qualquer dos polipeptídeos da invenção é introduzido nas células que, ao contrário, produzem o polipeptídeo de interesse (e.g., um EphA2-BiTE). A terapia

5 gênica, que é baseada em introduzir genes terapêuticos em células por técnicas *ex-vivo* ou *in-vivo*, é uma das mais importantes aplicações de transferência de genes.

Dessa forma, a expressão recombinante de um EphA2-BiTE

10 da invenção requer a construção de um vetor de expressão contendo uma sequência de polinucleotídeos que codifica o EphA2-BiTE. Ver, e.g., FIG. 3. Os polinucleotídeos codificando os EphA2-BiTEs aqui descritos podem ser obtidos e seqüenciados por qualquer método conhecido na arte. Por

15 exemplo, um polinucleotídeo codificando um EphA2-BiTE usando nos métodos da invenção pode ser reunido a partir de oligonucleotídeos quimicamente sintetizados (e.g., como descrito em Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17:242), que, resumidamente, envolve a síntese de oligonucleotídeos

20 se sobrepondo contendo fragmentos da sequência codificando o polipeptídeo, o anelamento e ligação desses oligonucleotídeos, e, então, a amplificação dos oligonucleotídeos ligados por PCR.

25 Uma vez que um polinucleotídeo codificando um EphA2-BiTE da invenção tenha sido obtido, o vetor para a produção da molécula EphA2-BiTE pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante usando técnicas bem conhecidas na arte. Assim, métodos para preparar uma proteína expressando-se um

polinucleotídeo contendo uma sequência de nucleotídeos codificando EphA2-BiTE são aqui descritos. Métodos que são bem conhecidos daqueles especialistas na arte podem ser usados para construir vetores de expressão contendo

5 seqüências codificadoras de EphA2-BiTE e sinais apropriados de controle de transcrição e de tradução. Esses métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, e recombinação genética *in vivo*. A invenção provê, assim, vetores replicáveis

10 compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um EphA2-BiTE da invenção, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, um domínio variável de cadeia leve ou pesada de um anticorpo ou um fragmento desses, ou uma cadeia pesada ou leve de CDR, operacionalmente ligada a um promotor.

15 Tais vetores podem incluir a sequência de nucleotídeos codificando a região constante da molécula de anticorpo (ver, e.g., International Publication Nos. WO 86/05807 e WO 89/01036; e U.S. Patent No. 5.122.464) e o domínio variável do anticorpo podem ser clonados em tal vetor para expressão

20 da cadeia pesada inteira, cadeia leve inteira, ou ambas cadeias pesadas e leves inteiras.

O vetor de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células

25 transfectadas são, então, cultivadas por técnicas convencionais para produzir um EphA2-BiTE da invenção. Assim, a invenção inclui células hospedeiras contendo um polinucleotídeo codificando um EphA2-BiTE da invenção, fragmentos desse (e.g., primeiro e/ou segundo domínios de

ligação de um EphA2-BiTE), operacionalmente ligados a um promotor heterólogo.

Uma variedade de sistemas de expressão hospedeiro-
5 vetor pode ser utilizada para expressar os EphA2-BiTEs da invenção ou fragmentos desses (e.g., uma primeiro e/ou segundo domínio de ligação de um EphA2-BiTE) (ver, e.g., U.S. Patent No. 5.807.715). Tais sistemas de expressão de hospedeiro representam veículos pelos quais as seqüências
10 codificadoras de interesse podem ser produzidas e subsequente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as seqüências de nucleotídeos codificadoras apropriadas, expressam uma molécula de EphA2-BiTE da
15 invenção *in situ*. Essas incluem, mas não estão limitadas a microorganismos, tais como bactérias (e.g., *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com DNA recombinante de bacteriófago, vetores de expressão de DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo contendo seqüências codificadoras de EphA2-
20 BiTE; leveduras (e.g., *Saccharomyces Pichia*) transformadas com vetores de expressão recombinantes de leveduras contendo seqüências codificadoras de EphA2-BiTE; sistemas de células de insetos infectados com vetores de expressão recombinantes de vírus (e.g., bacilovírus) contendo
25 seqüências codificadoras de EphA2-BiTE; sistemas de células vegetais infectados com vetores de expressão recombinantes de vírus (e.g., vírus de mosaico de couve-flor, CaMV; vírus de mosaico de tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão recombinantes de plasmídios (e.g., plasmídeo Ti)

contendo seqüências codificadoras de EphA2-BiTE; ou sistemas de células de mamíferos (e.g., células COS, CHO, BHK, 293, NS0, e 3T3) ancorando constructos de expressão recombinantes contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (e.g., promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (e.g., o promotor de adenovírus tardio; o promotor de vírus vaccinia 7,5K). Preferencialmente, células bacterianas, tais como *Escherichia coli*, e mais preferencialmente, células eucariontes, são usadas para a expressão de uma molécula de EphA2-BiTE recombinante. Por exemplo, células de mamíferos, tais como células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vetor, tal como o elemento promotor de gene inicial intermediário principal de citomegalovírus humano é um sistema de expressão efetivo para anticorpos (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; e Cockett et al., 1990, *BioTechnology* 8:2). Em um avanço específico, a expressão de seqüências de nucleotídeos codificando EphA2-BiTEs é regulada por um promotor constitutivo, promotor induzido ou promotor específico de tecido. Alternativamente, os polinucleotídeos da invenção podem ser expressados em um sistema de expressão de planta transgênica, tal como, por exemplo, o sistema LEX System™ descrito em U.S. Patent No. 6.040.498, aplicação internacional publicada em 18 de fevereiro de 1999 (WO 99/07210), e aplicação internacional publicada em 7 de fevereiro de 2002 (WO 02/10414). Outro sistema de expressão de planta transgênica que pode ser utilizado para os polinucleotídeos da invenção é a tecnologia

Plantibodies™ descrita em U.S. Patent Nos. 5.202.422; 5.639.947; 5.959.177; e 6.417.429.

Em sistemas bacterianos, um número de vetores de
5 expressão pode ser vantajosamente selecionados dependendo
do uso pretendido para a molécula de EphA2-BiTE ou
fragmento dessa sendo expressada. Por exemplo, quando uma
grande quantidade de tal proteína deve ser produzida, para
a geração de composições farmacêuticas de uma molécula de
10 EphA2-BiTE, vetores que direcionem a expressão de níveis
altos de produtos de proteína de fusão que são prontamente
purificados podem ser desejados. Tais vetores incluem, mas
não estão limitados a, o vetor de expressão pUR278 de *E.*
coli (Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791), no qual a
15 sequência codificadora de EphA2-BiTE pode ser ligada
individualmente no vetor no quadro com a região
codificadora lac Z de forma que uma proteína de fusão seja
produzida; vetores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic
Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J.
20 Biol. Chem. 24:5503-5509); e similares. Vetores pGEX podem
ser também usados para expressar polipeptídeos estrangeiros
como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST).
Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser
facilmente purificadas a partir de células lisadas pode
25 adsorção e ligação a gotas de matriz de glutathione-agarose
seguido por eluição na presença de glutathione livre. Os
vetores pGEX são projetados para incluir sítios de clivagem
de trombina ou protease fator Xa de forma que o produto
gênico alvo clonado possa ser liberado a partir do

componente de GST. Outro sistema microbiano que pode ser usado para expressar os polinucleotídeos da invenção é a tecnologia de Expressão Pfênex que é baseada em novas linhagens de *Pseudomonas fluorescens*, como descrito em Squires et al., BioProcess Int'l p. 54 dezembro de 2004; e Squires et al., Specialty Chemicals julho/agosto de 2004.

Em um sistema de inseto, vírus de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) é usado como um vetor para expressar genes estrangeiros. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificadora de EphA2-BiTE pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo o gene de poliedrina) do vírus e colocadas sob controle de um promotor AcNPV (por exemplo o promotor de poliedrina).

Em células hospedeiras de mamíferos, um número de sistemas de expressão baseados em vírus pode ser utilizado. Em casos onde um adenovírus é usado como vetor de expressão, a sequência codificadora de EphA2-BiTE de interesse pode ser ligada a um complexo de controle de transcrição/tradução de adenovírus, e.g., o promotor tardio e sequência líder triparticionada. Esse gene quimérico pode ser, então, inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção em uma região não essencial do genoma viral (e.g., região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula EphA2-BiTE em hospedeiros infectados (e.g., ver Logan & Shenk, 1984, PNAS 81:355-359). Sinais

específicos de iniciação podem ser também necessários para tradução eficiente de seqüências codificadoras de EphA2-BiTE inseridas. Esses sinais incluem o códon de iniciação ATG e seqüências adjacentes. Adicionalmente, o códon de iniciação deve estar em fase com o quadro de leitura da seqüência codificadora desejadas para assegurar a tradução de toda inserção. Esses sinais exógenos de controle de tradução e códons de iniciação podem ser de uma variedade de origens, tanto naturais e sintéticos. A eficiência de expressão pode ser intensificada pela inclusão de elementos intensificadores de transcrição apropriados, terminadores de transcrição, etc. (ver, e.g., Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

Além disso, uma linhagem de célula hospedeira que modula a expressão das seqüências inseridas, ou modifica e processa o produto gênico da maneira específica desejada pode ser escolhida. Tais modificações (e.g., glicosilação) e processamento (e.g., clivagem) de produtos de proteína podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes possuem mecanismos característicos e específicos para processamento pós-tradução e modificação de proteínas e produtos gênicos. Linhas de células, ou sistemas hospedeiros apropriados, podem ser escolhidas para assegurar a modificação e o processamento corretos da proteína estrangeira expressada. Nesta extensão, células hospedeiras eucariontes que possuem o maquinário celular para processamento correto do transcrito primário, glicosilação, e fosforilação do produto gênico pode ser

usado. Tais células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não estão limitadas a células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, NS1, e T47D, NS0 (uma linha de células de mieloma murino que não
5 produz endogenamente qualquer cadeia de imunoglobulina), CRL7030 e células HsS78BsT.

Para produção de alto rendimento e longo prazo de proteínas recombinantes, expressão estável é preferida.
10 Por exemplo, linhagens celulares que expressam estavelmente a molécula EphA2-BiTE podem ser construídas. Ao invés de usar vetores de expressão que contêm origens de replicação virais, células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão
15 apropriados (e.g., promotor, intensificador, seqüências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável. Após a introdução do DNA estrangeiro, células construídas podem ser deixadas crescenedo por 1-2 dias em um meio enriquecido e, então,
20 são trocadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídio recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídio em seus cromossomos e cresçam para formar loci que, ao contrário, podem ser clonados e expandidos em
25 linhas celulares. Este método pode ser vantajosamente usado pra construir linhas celulares que expressem a molécula de EphA2-BiTE. Tais linhas celulares construídas podem ser particularmente úteis no rastreamento e avaliação

de composições que interagem diretamente ou indiretamente com a molécula de EphA2-BiTE.

Um número de sistemas de seleção pode ser usado, incluindo, mas não limitados a, timidina quinase de vírus simplex de herpes (Wigler et al., 1977, *Cell* 11:223), glutamina sintase, hipoxantina guanina fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202), e adenina fosforribosiltransferase (Lowy et al., 1980, *Cell* 22:8-17) genes podem ser empregados em células tk-, gs-, hgp^rt- ou aprt-, respectivamente. Também, resistência antimetabólito pode ser usada como a base de seleção para os seguintes genes: *dhfr*, que confere resistência a metotrexato (Wigler et al., 1980, *PNAS* 77:357; O'Hare et al., 1981, *PNAS* 78:1527); *gpt*, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, *PNAS* 78:2072); neo, que confere resistência à aminoglicosida G-418 (Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573; Mulligan, 1993, *Science* 260:926; e Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191; May, 1993, *TIB TECH* 11:155-); e *hygro*, que confere resistência a higromicina (Santerre et al., 1984, *Gene* 30:147). Métodos comumente conhecidos na arte de tecnologia de DNA recombinante podem ser rotineiramente aplicados para selecionar o clone recombinante desejado, e tais métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A

Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); e nos capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1, que são
5 aqui incorporados por referência em sua íntegra.

Os níveis de expressão de uma molécula de EphA2-BiTE podem ser aumentadas por amplificação de vetor (para uma revisão, ver Bebbington and Hentschel, The use of vetores
10 based on gene amplification for the expressão of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Quando um marcador no sistema vetor expressando EphA2-BiTE é amplificável, aumentar o nível de inibidor presente na cultura de células
15 hospedeiras irá aumentar o número de cópias do gene marcador. Já que a região amplificada é associada com o gene de EphA2-BiTE, a produção do EphA2-BiTE também irá aumentar (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

20 A célula hospedeira por ser co-transfectada com dois vetores de expressão da invenção, o primeiro vetor codificando um primeiro domínio de ligação de um EphA2-BiTE ou um domínio pesado variável de um anticorpo (e.g., um anticorpo anti-EphA2 ou um anticorpo anti-CD3) e o segundo
25 vetor codificando um segundo domínio de ligação de um EphA2-BiTE ou um domínio variável leve de um anticorpo (e.g., um anticorpo anti-EphA2 ou um anticorpo anti-CD3). O primeiro e o segundo domínio de ligação do EphA2-BiTE podem ser purificados usando técnicas conhecidas na arte e

os dois domínios podem ser quimicamente ligados por métodos conhecidos na arte.

A célula hospedeira pode ser transfectada com um vetor de expressão da invenção codificando um EphA2-BiTE da invenção. O vetor pode conter um único vetor qu codifica, e é capaz de expressar ambos os domínios variáveis leves de um anticorpo (e.g., anticorpo anti-EphA2 ou anticorpo anti-CD3), ou ambos primeiro e segundo domínios de ligação de um EphA2-BiTE (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; e Kohler, 1980, *PNAS* 77:2197). As seqüências codificadoras para os domínios variáveis ou domínios de ligação podem compreender DNAC ou DNA genômico.

Uma vez que um EphA2-BiTE da invenção ou um domínio de ligação desse tenha sido produzido por expressão recombinante, ele pode ser purificado por qualquer método conhecido na arte para purificação de um molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (e.g., troca iônica, afinidade iônica, particularmente por afinidade para o antígeno específico após Proteína A, e cromatografia de coluna de medição), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Ainda, os EphA2-BiTEs da presente invenção ou fragmentos desses podem ser fusionados para seqüências polipeptídicas heterólogas aqui descritas ou, ao contrário, conhecidas na arte para facilitar a purificação.

Em um avanço específico, is EphA2-BiTEs produzidos da invenção de forma recombinante compreendem um primeiro domínio de ligação e um segundo domínio de ligação, caracterizado pelo fato do primeiro domínio de ligação compreender um domínio VH e um domínio VL ligados juntos por um ligante de força suficiente para permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação ao antígeno CD3 de célula T. Em outro avanço específico, o segundo domínio de ligação compreende a domínio VH e um domínio VL, e os domínios VH e VL são ligados juntos por um ligante de força suficiente para permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação a EphA2. Em outro avanço específico, o primeiro e o segundo domínios de ligação são ligados juntos por um ligante de força suficiente para permitir que os domínios se dobrem de forma a permitir a ligação a CD3 e EphA2. Em certos avanços, o primeiro e o segundo domínio de ligação são scFvs. Em outros avanços, o domínio de ligação que se liga a CD3 é desimunizado.

20

Métodos Profiláticos/Terapêuticos

A presente invenção está relacionada a composições farmacêuticas e regimes profiláticos e terapêuticos projetados para tratar, prevenir e/ou gerenciar desordens associadas com a expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas e infecções) e um sujeito, compreendendo administrar um ou mais EphA2-BiTEs.

Em um avanço específico, os EphA2-BiTEs da invenção são administrados a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar desordens associadas com a expressão e/ou
5 atividade aberrante de EphA2 (e.g., câncer, desordens celulares hiperproliferativas não cancerosas e infecções). Em certos avanços, os EphA2-BiTEs da invenção são administrados em combinação com uma ou mais terapias. Em certos avanços, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção são
10 administrados a um mamífero, preferencialmente um humano, concomitantemente com uma ou mais outras terapias. Preferencialmente, tais terapias são úteis para o tratamento de tais desordens. O termo "concomitantemente" não é limitado à administração de terapias exatamente ao
15 mesmo tempo, mas sim, deve significar que os EphA2-BiTEs da invenção e outra terapia são administrados a um sujeito em uma sequência e em um intervalo de tempo de forma que os anticorpos da invenção possam agir juntos com a outra terapia para prover um benefício aumentado em relação a se
20 fossem administrados de outra forma. Por exemplo, cada terapia pode ser administrada ao mesmo tempo ou sequencialmente em qualquer ordem em diferentes momentos; contudo, se não administradas ao mesmo tempo, deveriam ser administradas próximas em tempo o suficiente para prover o
25 efeito terapêutico ou profilático desejado. Cada terapia pode ser administrada separadamente, de qualquer forma apropriada e por qualquer via adequada. Em outros avanços, os EphA2-BiTEs da invenção são administrados antes, concomitantemente ou após cirurgia. Preferencialmente, a

cirurgia remove completamente tumores localizados ou reduz o tamanho de tumores grandes. Cirurgia pode ser também feita como uma medida preventiva ou para aliviar a dor.

5 Em vários avanços, as terapias são administradas em menos de 1 hora de diferença, em cerca de 1 hora de diferença, de cerca de 1 hora a cerca de 2 horas de diferença, de cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de diferença, de cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de
10 diferença, de cerca de 4 horas a cerca de 5 horas de diferença, de cerca de 5 horas a cerca de 6 horas de diferença, de cerca de 6 horas a cerca de 7 horas de diferença, de cerca de 7 horas a cerca de 8 horas de diferença, de cerca de 8 horas a cerca de 9 horas de
15 diferença, de cerca de 9 horas a cerca de 10 horas de diferença, de cerca de 10 horas a cerca de 11 horas de diferença, de cerca de 11 horas a cerca de 12 horas de diferença, não mais do que 24 horas de diferença ou não mais do que 48 horas de diferença. Em avanços preferidos,
20 dois ou mais componentes são administrados na mesma visita do paciente.

As quantidades de dosagem e frequências de administração aqui providas são englobadas pelos termos
25 terapeuticamente efetivo e profilaticamente efetivo. A dosagem e frequência irão variar, ainda, tipicamente de acordo com fatores específicos para cada paciente dependendo das terapias específicas administradas, a severidade e tipo de câncer, a via de administração, assim

como idade, peso corporal, resposta, e histórico médico do paciente. Regimes adequados podem ser selecionados por um especialista na arte considerando tais fatores e seguindo, por exemplo, dosagens relatadas na literatura e recomendadas na referência *Physicians' Desk Reference* (61st ed., 2007).

População de Pacientes

10 Pacientes com Câncer

A invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar câncer administrando a um sujeito uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, os EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em combinação com uma ou mais outras terapias. O sujeito é um animal, preferencialmente um mamífero, tal como um não primata (e.g., vacas, porcos, cavalos, gatos, cachorros, ratos, etc.) e um primata (e.g., macaco, tal como um macaco cinomolgus e um humano). Em um avanço preferencial, o

15
20

sujeito é um humano.

Exemplos específicos de cânceres que podem ser tratados pelos métodos englobados pela invenção incluem, mas não estão limitados a, cânceres que sobre-expressam EphA2. Em um avanço adicional, o câncer é de origem epitelial. Exemplos de tais cânceres são câncer de pulmão, cólon, próstata, mama, e pele. Cânceres adicionais estão

25

litados como exemplo e não por limitação na Seção 5.4.1.2, *infra*. Em avanços particulares, métodos da invenção podem ser usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar metástase de tumores primários.

5

Os métodos e composições da invenção compreendem a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção a sujeitos/pacientes sofrendo de ou esperados de sofrer de câncer, e.g., possuem uma predisposição genética para um tipo particular de câncer, foram expostos a agente cancerígeno, ou estão em remissão de um câncer em particular. Como aqui usado, "câncer" refere-se a cânceres primários ou metastáticos. Tais pacientes podem ou não ter sido previamente tratados para câncer. Os métodos e composições da invenção podem ser usados como qualquer linha de terapia, e.g., uma primeira, segunda, terceira, etc. linha de terapia. Incluído na invenção está também o tratamento de pacientes recebendo outras terapias para câncer e os métodos e composições da invenção podem ser usados antes que ocorram efeitos adversos ou intolerância dessas outras terapias para câncer. A invenção também engloba métodos para administrar um ou mais EphA2-BiTEs da invenção para tratar, prevenir e/ou gerenciar sintomas em pacientes refratários. Em um certo avanço, um câncer ser refratário a uma terapia significa que pelo menos alguma porção significativa das células cancerosas não são mortas ou têm sua divisão aprisionada. A determinação de se as células cancerosas são refratárias pode ser feita tanto *in vivo* ou *in vitro* por qualquer método conhecido na arte para

testar a efetividades da(s) terapia(s) em células cancerosas, usando meios aceitos na arte de "refratário" em tal contexto. Em vários avanços, um câncer é refratário onde o número de células cancerosas não foi reduzido
5 significativamente, ou aumentou. A invenção também engloba métodos para administrar um ou mais EphA2-BiTEs para prevenir o começo ou recorrência de câncer em pacientes predispostos a ter câncer.

10 Em avanços em particular, os EphA2-BiTEs da invenção, ou outro terapêuticos que reduz a expressão de EphA2, são administrados para reverter a resistência ou sensibilidade reduzida de células cancerosas a certos terapêuticos hormonais, radiação e agentes terapêuticos químicos, dessa
15 maneira, sensibilizando novamente as células cancerosas a um ou mais desses agentes, os quais podem ser, então, administrados (ou continuar a ser administrados) para tratar ou administrar câncer, incluindo prevenir metástases.

20

Em avanços alternados, a invenção provê métodos para tratar câncer de pacientes administrando-se um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com qualquer outra terapia ou a pacientes que foram mostrados refratários a
25 outros tratamentos, mas não a estes tratamentos. Em certos avanços, os pacientes sendo tratados pelos métodos da invenção são pacientes já sendo tratados com quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, ou terapia biológica/imunoterapia. Dentre esses pacientes estão

pacientes refratários e aqueles com câncer apesar do tratamento com terapias para câncer existentes. Em outros avanços, os pacientes foram tratados e não possuem atividade de doença e um ou mais EphA2-BiTEs da invenção
5 são administrados para prevenir a recorrência de câncer.

Em avanços preferidos, o tratamento existente é quimioterapia. Em avanços em particular, o tratamento existente inclui administração de quimioterapias incluindo,
10 mas não limitado a, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiuréia, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosouréias, cisplatina, carboplatina, mitomicina, dacarbazina, procarbizina, etoposidas, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina,
15 daunorubicina, dactinomomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginase, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, etc. Dentre esses pacientes estão pacientes tratados com radioterapia, terapia hormonal e/ou terapia biológica/imunoterapia. Também entre esses
20 pacientes estão aqueles que passaram por cirurgia para o tratamento de câncer.

Alternativamente, a invenção também engloba métodos para tratar pacientes fazendo ou que fizeram radioterapia.
25 Entre esses estão pacientes sendo tratados ou previamente tratados com quimioterapia, terapia hormonal e/ou terapia biológica/imunoterapia. Também entre esses pacientes estão aqueles que passaram por cirurgia para o tratamento de câncer.

Em outros avanços, a invenção engloba métodos para tratar pacientes fazendo ou que fizeram terapia hormonal e/ou terapia biológica/imunoterapia. Entre estes estão
5 pacientes sendo tratados ou que foram tratados com quimioterapia e/ou radioterapia. Também entre esses pacientes estão aqueles que passaram por cirurgia para o tratamento de câncer.

10 Adicionalmente, a invenção também provê métodos de tratamento de câncer como uma alternativa a quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, e/ou terapia biológica/imunoterapia onde a terapia foi mostrada ou pode
15 ser muito tóxica, i.e., resulta em efeitos colaterais inaceitáveis ou insuportáveis para o sujeito sendo tratado. O sujeito sendo tratado com os métodos da invenção pode, opcionalmente, ser tratado com outros tratamentos para
câncer, tais como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal ou terapia biológica, dependendo de qual
20 tratamento foi visto por ser inaceitável ou insuportável.

Em outros avanços, a invenção provê a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sem quaisquer outras terapias para câncer para o tratamento de câncer, mas a
25 quem foi mostrado por ser refratário a tais tratamentos. Em avanços específicos, pacientes refratários a outras terapias para câncer são administrados com um ou mais EphA2-BiTEs da invenção na ausência de terapias para câncer.

Em outros avanços, pacientes com uma condição pré-cancerosa associada com células que sobre-expressam EphA2 podem ser administrados EphA2-BiTEs da invenção para tratar a desordem e diminuir a probabilidade de que a desordem irá progredir para câncer maligno. Em avanços específicos, a condição pré-cancerosa é neoplasia intraepitelial prostática de alta graduação (PIN), fibroadenoma de mama, doença fibrocística, ou composto de nevi.

Cânceres

Cânceres e desordens relatadas que podem ser tratadas, prevenidas e/ou gerenciadas por métodos e composições da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a: leucemias, tais como, mas não limitadas a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, tais como, leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, e eritroleucemia e síndrome mielodisplástica; leucemias crônicas, tais como, mas não limitadas a, leucemia mielocítica crônica (granulocítica), leucemia linfocítica crônica, leucemia de células capilares; policitemia vera; linfomas, tais como, mas não limitados a síndrome de Hodgkin, linfoma não de Hodgkin; mielomas múltiplos, tais como, mas não limitados a mieloma múltiplo latente, mieloma não secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células do plasma, plasmacitoma solitário e plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gamopatia monoclonal de

significância indeterminada; gamopatia monoclonal benigna; doença de cadeia pesada; sarcomas de tecido ósseo e conectivo, tais como, mas não limitados a sarcoma ósseo, osteossarcoma, condrossarcoma, sarcoma de Ewing, tumor 5 maligno de célula gigante, fibrossarcoma de osso, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tecidos moles, angiossarcoma (hemangiossarcoma), fibrossarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiossarcoma, lipossarcoma, linfangiossarcoma, neurilemoma, rabdomiossarcoma, sarcoma sinuvial; tumores 10 cerebrais, tais como, mas não limitados a, glioma, astrocitoma, glioma de tronco cerebral, ependimoma, oligodendroglioma, tumor não glial, neurinoma acústico, craniofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primário; câncer de mama 15 incluindo, mas não limitado a adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequenas), carcinoma intraductal, câncer de mama medular, câncer de mama mucino, câncer de mama tubular, câncer de mama papilar, doença de Paget, e câncer de mama inflamatório; câncer adrenal, tal como, mas não 20 limitado a, feocromocitoma e carcinoma adrenocortical; câncer de tiróide, tal como, mas não limitado a câncer de tiróide papilar ou folicular, câncer de tiróide medular e câncer de tiróide anaplástico; câncer pancreático, tal como, mas não limitado a, insulinoma, gastrinoma, 25 glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, e tumor de célula carcinóide ou islet; cânceres pituitários tais como, mas não limitados a, doença de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia, e diabetes insípida; cânceres de olho, tais como, mas não limitados a, melanoma

ocular, tal como melanoma de íris, melanoma coroidal, e melanoma de corpo ciliar, e retinoblastoma; cânceres vaginais, tais como, carcinoma de célula escamosa, adenocarcinoma, e melanoma; câncer de vulva, tal como

5 carcinoma de célula escamosa, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de célula basal, sarcoma, e doença de Paget; cânceres cervicais, tais como, mas não limitados a, carcinoma de célula escamosa, e adenocarcinoma; cânceres uterinos, tais como, mas não limitados a, carcinoma de

10 endométrio e sarcoma uterino; cânceres ovarianos, tais como, mas não limitados a, carcinoma epitelial ovariano, tumor *borderline*, tumor de célula germinal, e tumor de estroma; cânceres de esôfago, tais como, mas não limitados a, câncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenóide

15 cístico, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrucoso, e carcinoma de célula oat (células pequenas); cânceres de estômago, tais como, mas não limitados a, adenocarcinoma, fungo (polipóide), ulcerante, de dispensão

20 superficial, de dispersão difusa, linfoma maligno, lipossarcoma, fibrossarcoma, e carcinossarcoma; cânceres de cólon; cânceres retais; cânceres de fígado, tais como, mas não limitados a, carcinoma hepatocelular e hepatoblastoma; cânceres de vesícula biliar, tais como, adenocarcinoma;

25 colangiocarcinomas, tais como, mas não limitados a, papillares, nodulares, e difusos; cânceres de pulmão, tais como, câncer de pulmão que não de célula pequena, carcinoma de célula escamosa (carcinoma epidermóide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes e câncer de pulmão de célula

pequena; cânceres de testículo, tais como, mas não limitados a, tumor germinal, seminoma, anaplástico, clássico (típico), espermatocítico, nonseminoma, carcinoma embrional, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de

5 saco vitelínico), cânceres de próstata, tais como, mas não limitados a, adenocarcinoma, leiomiossarcoma, e rabdomiossarcoma; cânceres penais; cânceres orais, tais como, mas não limitados a, carcinoma de célula escamosa; cânceres basais; cânceres de glândulas salivares, tais

10 como, mas não limitados a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermóide, e carcinoma adenocístico; cânceres de faringe, tais como, mas não limitados a, câncer de célula escamosa, e verrucoso; cânceres de pele, tais como, mas não limitados a, carcinoma de célula basal, carcinoma de célula

15 escamosa e melanoma, melanoma de dispersão superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso; cânceres de rim, tais como, mas não limitados a, carcinoma de célula renal, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrossarcoma, câncer de célula transicional (pélvis renal

20 e/ ou uterino); tumor de Wilms; cânceres de bexiga, tais como, mas não limitados a, carcinoma de célula transicional, câncer de célula escamosa, adenocarcinoma, carcinossarcoma. Além disso, cânceres incluem

25 mixossarcoma, sarcoma osteogênico, endoteliossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, mesotelioma, sinovióma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma bronquiogênico, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar e adenocarcinomas papilares (para uma revisão de tais

desordens, ver Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

Dessa forma, os métodos e composições da invenção são também úteis no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma variedade de cânceres ou outras doenças proliferativas anormais, incluindo (mas não limitadas a) os seguintes: carcinoma, incluindo aquele da bexiga, mama, cólon, rim, fígado, pulmão ovário, pâncreas, estomago, cervix, tiróide e pele; incluindo carcinoma de célula escamosa; tumores hematopoiéticos de linhagem linfóide, incluindo leucemia, leucemia aguda linfocítica, leucemia aguda linfoblástica, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoiéticos de linhagem mielóide, incluindo leucemias mielógenas agudas e crônicas e leucemia promielocítica; tumores de origem mesenquimal, incluindo fibrossarcoma e rabdomiossarcoma; outros tumores, incluindo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma e glioma; tumores do sistema nervoso central e periférico, incluindo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, e schwannomas; tumores de origem mesenquimal, incluindo fibrossarcoma, rabdomiossarcoma, e osteossarcoma; e outros tumores, incluindo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, câncer folicular de tiróide e teratocarcinoma. É ainda contemplado que cânceres causados por aberrações em apoptose também poderiam ser tratados

pelos métodos e composições da invenção. Tais cânceres podem incluir, mas não são limitados a, linfomas foliculares, carcinomas com mutações p53, tumores dependentes de hormônios de mama, próstata e ovário, e de
5 lesões pré-cancerosas, tais como polipose familiar adenomatosa, e síndromes mielodisplásticas. Em avanços específicos, mudanças na malignidade ou desproliferativas (tais como metaplasias e displasias), ou desordens celulares hiperproliferativas, são tratadas ou prevenidas
10 na pele, pulmão, cólon, mama, próstata, bexiga, rim, pâncreas, ovário, ou útero. Em outros avanços específicos, sarcoma, melanoma, ou leucemia são tratados ou prevenidos.

Em avanços específicos, os cânceres a serem tratados,
15 prevenidos e/ou gerenciados pelos métodos e composições da invenção são de origem epitelial. Em outros avanços, o câncer é maligno e sobre-expressa EphA2. Em um avanço específico, o câncer compreende células que expressam EphA2 de maneira aberrante. Em outros avanços, a desordem a ser
20 tratada é uma condição pré-cancerosa associada com células que sobre-expressam EphA2. Em um avanço específico, a condição pré-cancerosa é neoplasia intraepitelial prostática de alta graduação (PIN), fibroadenoma de mama, doença fibrocística, ou composto de nevi.

25

Em avanços específicos, os métodos e composições da invenção são usados para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de cânceres de mama, cólon, ovariano, pulmão, e próstata e câncer de pele, tal como melanoma.

Tratamento de Câncer de Mama

Em avanços específicos, a pacientes com câncer de mama
5 é administrada uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-
BiTEs da invenção. Em outro avanço, os EphA2-BiTEs da
invenção podem ser administrados em combinação com uma
quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para
terapia de câncer de mama incluindo, mas não limitados a:
10 doxorubicina, epirubicina, a combinação de doxorubicina e
ciclofosfamida (AC), a combinação de ciclofosfamida,
doxorubicina e 5-fluorouracil (CAF), a combinação de
ciclofosfamida, epirubicina e 5-fluorouracil (CEF),
herceptina, tamoxifen, a combinação de tamoxifen e
15 quimioterapia citotóxica, taxanas (tais como docetaxel e
paclitaxel). Em um avanço adicional, EphA2-BiTEs da
invenção podem ser administrados com taxanas mais
doxorubicina padrão e ciclofosfamida para tratamento com
adjuvante de câncer de mama localizado nodo positivo.

20

Em um avanço específico, a pacientes com fibroadenoma
pré-canceroso de mama ou doença fibrocística é administrado
um EphA2-BiTE da invenção para tratar a desordem e diminuir
a probabilidade de que esta irá progredir para câncer de
25 mama maligno.

Tratamento de Câncer de Cólon

Em avanços específicos, a pacientes com câncer de cólon é administrada uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, os anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação com uma
5 quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para terapia de câncer de cólon, incluindo, mas não limitados a: a combinação de 5-FU e leucovorina, a combinação de 5-FU e levamisola, irinotecan (CPT-11) ou a combinação de irinotecan, 5-FU e leucovorina (IFL).

10

Tratamento de Câncer de Próstata

Em avanços específicos, a pacientes com câncer de próstata é administrada uma quantidade efetiva de um ou
15 mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, os EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para terapia de câncer de próstata incluindo, mas não limitado a: radioterapia por feixe externo, implantação
20 intersticial de radioisótopos (i.e., I^{125} , paládio, irídio), leuprolida ou outros agonísticos LHRH, antiandrógenos não esteróides (flutamida, nilutamida, bicalutamida), antiandrógenos esteróides (acetato de ciproterona), a combinação de leuprolida e flutamida, estrogênios, tais
25 como DES, clorotrianiseno, etinil estradiol, estrogênios conjugados U.S.P., DES-disfosfato, radioisótopos, tais como estrôncio-89, a combinação de radioterapia por feixe externo e estrôncio-89, terapias hormonais de segunda linha, tais como, aminoglutetimida, hidrocortisona,

retirada de flutamida, progesterona, e quetoconazole, prednisona em dose baixa, ou outros regimes de quimioterapia relatados por produzir melhora subjetiva nos sintomas e redução no nível de PSA, incluindo docetaxel, paclitaxel, estramustina/docetaxel, estramustina/etoposida, estramustina/vinblastina, e estramustina/paclitaxel.

Em um avanço específico, a pacientes com neoplasia prostática intraepitelial pré-cancerosa de alta graduação (PIN) é administrado um EphA2-BiTE da invenção para tratar a desordem e diminuir a probabilidade de que isto irá progredir para câncer de próstata maligno.

Tratamento de Melanoma

Em avanços específicos, a pacientes com melanoma é administrada uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, os EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para terapia para câncer melanoma incluindo, mas não limitados a: dacarbazina (DTIC), nitrosouréias, tais como, carmustina (BCNU) e lomustina (CCNU), agentes com atividade modesta de agente único, incluindo vinca alcalóides, compostos de platina, e taxanas, o regime Dartmouth (cisplatina, BCNU, e DTIC), alfa-interferon (IFN-A), e interleuquina-2 (IL-2). Em um avanço específico, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção pode ser administrada em combinação com perfusão de membro hipertérmica isolada

(ILP) com *melfalan* (L-PAM), com ou sem fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa) a pacientes com múltiplas metástases cerebrais, metástases ósseas, e compressão de medula espinhal para alcançar alívio de sintomas e algum encolhimento do tumor com radioterapia.

Em um avanço específico, a pacientes com composto de nevi pré-canceroso é administrado um EphA2-BiTE da invenção para tratar a desordem e diminuir a probabilidade de que irá progredir para melanoma maligno.

Tratamento de Câncer de Ovário

Em avanços específicos, a pacientes com câncer de ovário é administrada uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, os EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para terapia para câncer de ovário incluindo, mas não limitados a: radioterapia intraperitoneal, tais como terapia com P^{32} , radioterapia abdominal e pélvica total, cisplatina, a combinação de paclitaxel (Taxol) ou docetaxel (Taxotere) e cisplatina ou carboplatina, a combinação de ciclofosfamida e cisplatina, a combinação de ciclofosfamida e carboplatina, a combinação de 5-FU e leucovorina, etoposida, doxorubicina lipossomal, gemcitabina ou topotecan. É contemplado que uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é administrada em combinação com a administração de Taxol para pacientes com

doença refratária a platina. Incluído está o tratamento de pacientes com câncer de ovário refratários incluindo a administração de: ifosfamida em pacientes com doença que é refratária a platina, hexametilmelamina (HMM) como
5 quimioterapia de recuperação após a falha dos regimes de combinação baseados em platina, e tamoxifen em pacientes com níveis detectáveis de receptor de estrogênio citoplasmático em seus tumores.

10 Tratamento de Cânceres de Pulmão

Em avanços específicos, a pacientes com câncer de pulmão de células pequenas é administrada uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro
15 avanço, os EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para terapia de câncer de pulmão incluindo, mas não limitados a: radioterapia torácica, cisplatina, vincristina, doxorubicina, e etoposida,
20 sozinhas ou em combinação, a combinação de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina/etoposida, e cisplatina (CAV/EP), mitigação local com terapia de laser endobronquial, stents endobronquiais, e/ou braquiterapia.

25 Em outros avanços específicos, a pacientes com câncer de pulmão que não de células pequenas é administrada uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais outros agentes úteis para terapia de câncer de pulmão incluindo,

mas não limitados a: radioterapia paliativa, a combinação de cisplatina, vinblastina e mitomicina, a combinação de cisplatina e vinorelbina, paclitaxel, docetaxel ou gemcitabina, a combinação de carboplatina e paclitaxel, 5 radioterapia intersticial para lesões endobronquiais ou radiocirurgia estereotática.

Outros Agentes Profiláticos/Terapêuticos

10 Em alguns avanços, a terapia por administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é combinada com a administração de uma ou mais terapias, tais como, mas não limitadas a, quimioterapias, radioterapias, terapias hormonais, e/ou terapias biológicas/imunoterapias. Agentes 15 profiláticos ou terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, moléculas protéicas, incluindo, mas não limitadas a, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, incluindo proteínas modificadas após a tradução, anticorpos etc.; ou moléculas pequenas (de menos de 1000 daltons), compostos 20 inorgânicos ou orgânicos; ou moléculas de ácidos nucleicos incluindo, mas não limitadas a, DNA de dupla-fita ou fita simples, ou RNA de dupla-fita ou fita simples, assim como moléculas de ácidos nucleicos de hélice tripla. Agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser derivados de 25 qualquer organismo conhecido (incluindo, mas não limitado a, animais, plantas, bactérias, fungos, e protistas, ou vírus) ou de uma biblioteca de moléculas sintéticas. Tais terapias podem ser administradas antes, concomitantemente,

ou após a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção.

Em um avanço específico, os métodos da invenção englobam a administração de um EphA2-BiTE da invenção em combinação com a administração de um ou mais agentes profiláticos/terapêuticos que são inibidores de quinases, tais como, mas não limitados a, ABL, ACK, AFK, AKT (e.g., AKT-1, AKT-2, and AKT-3), ALK, AMP-PK, ATM, Auroral, Aurora2, bARK1, bArk2, BLK, BMX, BTK, CAK, CaM quinase, CDC2, CDK, CK, COT, CTD, DNA-PK, EGF-R, ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4, ERK (e.g., ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7), ERT-PK, FAK, FGR (e.g., FGF1R, FGF2R), FLT (e.g., FLT-1, FLT-2, FLT-3, FLT-4), FRK, FYN, GSK (e.g., GSK1, GSK2, GSK3-alpha, GSK3-beta, GSK4, GSK5), quinases receptoras de proteína G combinada (GRKs), HCK, HER2, HKII, JAK (e.g., JAK1, JAK2, JAK3, JAK4), JNK (e.g., JNK1, JNK2, JNK3), KDR, KIT, receptor de IGF-1, IKK-1, IKK-2, INSR (receptor de insulina), IRAK1, IRAK2, IRK, ITK, LCK, LOK, LYN, MAPK, MAPKAPK-1, MAPKAPK-2, MEK, MET, MFPK, MHCK, MLCK, MLK3, NEU, NIK, alfa receptor de PDGF, beta receptor de PDGF, PHK, PI-3 quinase, PKA, PKB, PKC, PKG, PRK1, PYK2, p38 quinases, p135tyk2, p34cdc2, p42cdc2, p42mapk, p44mpk, RAF, RET, RIP, RIP-2, RK, RON, RS quinase, SRC, SYK, S6K, TAK1, TEC, TIE1, TIE2, TRKA, TXK, TYK2, UL13, VEGFR1, VEGFR2, YES, YRK, ZAP-70, e todos subtipos dessas quinases (ver e.g., Hardie and Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, I and II, Academic Press, San Diego, Calif.). Em avanços preferidos, um EphA2-BiTE da invenção é

administrado em combinação com a administração de um ou mais agentes profiláticos/terapêuticos que são inibidores de quinases receptoras de Eph (e.g., EphA2). Em um avanço mais preferencial, um EphA2-BiTE da invenção é administrado
5 em combinação com a administração de um ou mais agentes profiláticos/terapêuticos que são inibidores de EphA2.

Em outro avanço específico, os métodos da invenção englobam a administração de um EphA2-BiTE da invenção em
10 combinação com a administração de um ou mais agentes profiláticos/terapêuticos que são inibidores de angiogênese, tais como, mas não limitados a: Angiostatina (fragmento plasminogenico); antitrombina III antiangiogênica; Angiozyme; ABT-627; Bay 12-9566; Benefina;
15 Bevacizumab; BMS-275291; inibidor derivado de cartilagem (CDI); CAI; fragmento complemento de CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinases; fragmento de Heparina hexassacarídea; HMV833;
20 gonadotropina coriônica humana (hCG); IM-862; alfa/beta/gama Interferon; proteína induzida por Interferon (IP-10); Interleuquina-12; Kringle 5 (fragmento plasminogênico); Marimastat; inibidores de Metaloproteinase (TIMPs); 2-Metoxeestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-
25 1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inibidor de ribonuclease de placenta; inibidor de Plasminogen ativador; Platelet fator-4 (PF4); Prinomastat; fragmento de Prolactina de 16kD; proteína relacionada com Proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinóides; Solimastat;

esqualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahydrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; fator de crescimento beta de transformação (TGF- β); Vasculostatina; Vasostatina
 5 (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD6474; inibidores de farnesil transferase (FTI); e bisfosfonatos.

Em outro avanço específico, os métodos da invenção englobam a administração de um EphA2-BiTE da invenção em
 10 combinação com a administração de um ou mais agentes profiláticos/terapêuticos que são agentes anti-câncer, tais como, mas não limitados a: acivicina, aclarubicina, hidrocloreto de acodazola, acronina, adozelesina, aldesleuquina, altretamina, ambomicina, acetato de
 15 ametantrona, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozola, antramicina, asparaginase, asperlina, azacitidina, azetepa, azotomicina, batimastat, benzodepa, bicalutamida, hidrocloreto de bisantreno, dimesilato de bisnafida, bizelesina, sulfato de bleomicina, brequinar sódio,
 20 bropirimina, busulfan, cactinomicina, calusterona, caracemida, carbetimer, carboplatina, carmustina, hidrocloreto de carubicina, carzelesina, cedefingol, chlorambucil, cirolemicina, cisplatina, cladribina, crisnatol mesilato, ciclofosfamida, citarabina,
 25 dacarbazina, dactinomicina, hidrocloreto de daunorubicina, decarbazina, decitabina, dexormaplatina, dezaguanina, dezaguanina mesilato, diaziquona, docetaxel, doxorubicina, hidrocloreto de doxorubicina, droloxifeno, droloxifeno citrato, propionato de dromostanolona, duazomicina,

edatrexato, hidrocloreto de eflornitina, elsamitrucina, enloplatina, enpromato, epipropidina, hidrocloreto de epirubicina, erbulozola, hidrocloreto de esorubicina, estramustina, estramustina sódio fosfato, etanidazola, 5 etoposida, fosfato de etoposida, etoprina, hidrocloreto de fadrozola, fazarabina, fenretinida, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluorouracil, flurocitabina, fosquidona, sódio fostriecina, gemcitabina, hidrocloreto de gemcitabina, hidroxauréia, hidrocloreto de idarubicina, ifosfamida, 10 ilmofofina, interleuquina 2 (incluindo interleuquin 2 recombinante, ou rIL2), alfa-2a interferon, alfa-2b interferon, alfa-n1 interferon, alfa-n3 interferon, beta-I a interferon, gama-I b interferon, iproplatina, hidrocloreto de irinotecan, acetato de lanreotida, 15 letrozola, acetato de leuprolida, hidrocloreto de liarozola, lometrexol sódio, lomustina, hidrocloreto de losoxantrona, masoprocol, maitansina, hidrocloreto de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalan, menogaril, mercaptopurina, 20 metotrexato, sódio metotrexato, metoprina, meturedapa, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitomalcina, mitomicina, mitosper, mitotano, hidrocloreto de mitoxantrona, ácido micofenólico, nitrosouréias, nocodazola, nogalamicina, ormaplatina, oxisuran, 25 paclitaxel, pegaspargase, peliomicina, pentamustina, sulfato de peplomicina, perfosfamida, pipobroman, piposulfan, hidrocloreto de piroxantrona, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, hidrocloreto de procarbazona, puromicina, hidrocloreto de

puromicina, pirazofurina, riboprina, rogletimida, safingol,
 hidrocloreto de safingol, semustina, simtrazeno, sódio
 esparfosato, esparsomicina, hidrocloreto de espirogermânio,
 espiromustina, espiroplatina, estreptonigrina,
 5 estreptozocina, sulofenur, talisomicina, sódio tecogalan,
 tegafur, hidrocloreto de teloxantrona, temoporfina,
 teniposida, teroxirona, testolactona, tiamiprina,
 tioguanina, tiotepa, tiazofurina, tirapazamina, toremifeno
 citrato, acetato de trestolona, fosfato de triciribina,
 10 trimetrexato, trimetrexato glucuronato, triptorelina,
 hidrocloreto de tubulozole, mostarda de uracil, uredepa,
 vapreotida, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato
 de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de
 vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de
 15 vinleurosina, vinorelbina tartrato, sulfato de vinrosidina,
 sulfato de vinzolidina, vorozola, zeniplatina, zinostatina,
 hidrocloreto de zorubicina. Outras drogas anti-câncer
 incluem, mas não estão limitadas a: 20-epi-1,25
 dihidroxivitamina D3, 5-etiniluracil, abiraterona,
 20 aclarubicina, acilfulveno, adecipenol, adozelesina,
 aldesleuquina, ALL-TK antagonistas, altretamina,
 ambamustina, amidox, amifostina, ácido aminolevulínico,
 amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozola,
 andrografolida, inibidores de angiogênese, antagonista D,
 25 antagonista G, antarelix, proteína-1 anti-dorsal
 morfogenética, antiandrógenos, antiestrógenos,
 antineoplastona, afidicolina glicinato, moduladores de gene
 de apoptose, reguladores de apoptose, ácido apurínico, ara-
 CDP-DL-PTBA, arginina deaminase, asulacrina, atamestano,

atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina
 3, azasetrona, azatoxina, azatirosina, derivados de
 bacatina III, balanol, batimastat, BCR/ABL antagonistas,
 benzoclorinas, benzoilstaurosporina, derivados de beta
 5 lactam, beta-aletina, betaclamicina B, ácido betulínico,
 inibidor de bFGF, bicalutamida, bisantreno,
 bisaziridinilspermina, bisnafida, bistrateno A, bizelesina,
 breflato, bropirimina, budotitana, butionina sulfoximina,
 calcipotriol, calfostin C, derivados de camptotecina,
 10 canaripox IL-2, capecitabina, carboxamida-amino-triazola,
 carboxiamidotriazola, CaRest M3, CARN 700, inibidor
 derivado de cartilagem, carzelesina, inibidores de caseína
 quinase (ICOS), castanospermina, cecropina B, cetorelix,
 cloroquinoxalina sulfonamida, cicaprost, cis-porfirina,
 15 cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazola,
 colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo
 de combretastatina, conagenina, crambescidina 816,
 crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A,
 curacina A, ciclopentantraquinonas, cicloplatam,
 20 cipemicina, citarabina ocfosfato, fator citolítico,
 citostatina, dacliximab, decitabina, dehidrodidemnina B,
 deslorelina, dexametasona, dexifosfamida, dexrazoxano,
 dexverapamil, diaziquona, didemnina B, didox,
 dietilnorspermina, dihidro-5-azacitidina, dihidrotaxol,
 25 dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol,
 dolasetron, doxifluridina, droloxifeno, dronabinol,
 duocarmicina SA, ebselen, ecomustina, edelfosina,
 edrecolomab, eflornitina, elemeno, emitefur, epirubicina,
 epristerida, análogo de estramustina, agonistas de

estrogênio, antagonistas de estrogênio, etanidazola,
 fosfato de etoposida, exemestano, fadrozola, fazarabina,
 fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol,
 flezelastina, fluasterona, fludarabina, hidrocloreto de
 5 fluorodaunorunicina, forfenimex, formestano, fostriecina,
 fotemustina, gadolínio texafirina, nitrato de gálio,
 galocitabina, ganirelix, inibidores de gelatinase,
 gemcitabina, inibidores de glutatona, hepsulfam,
 heregulina, hexametileno bisacetamida, hipericina, ácido
 10 ibandrônico, idarubicina, idoxifeno, idramantona,
 ilmofofina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod,
 peptídeos imunoestimulantes, inibidor de receptor de fator
 de crescimento-1 tipo insulina, agonistas de interferon,
 interferons, interleuquinas, iobenguana, iododoxorubicina,
 15 ipomeanol, iroplact, irsogladina, isobengazola,
 isohomohalicondrina B, itasetron, jasplakinolida,
 cahalalida F, lamellarina-N triacetato, lanreotida,
 leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinan,
 leptolstatina, letrozola, fator inibidor de leucemia,
 20 leucócito alfa interferon,
 leuprolida+estrogênio+progesterona, leuprorelina,
 levamisola, liarozola, análogo de poliamina linear,
 peptídeo dissacarídeo lipofílico, compostos lipofílicos de
 platina, lissoclinamida 7, lobaplatina, lombricina,
 25 lometrexol, lonidamina, losoxantrona, lovastatina,
 loxoribina, lurtotecan, texafirina de lutécio, lisofilina,
 peptídeos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat,
 masoprocol, maspina, inibidores de matrilisina, inibidores
 de matriz de metaloproteinase, menogaril, merbarona,

meterelina, metioninase, metoclopramida, inibidor de MIF,
 mifepristona, miltefosina, mirimostim, RNA de dupla-fita
 com falta de correspondência, mitoguazona, mitolactol,
 análogos de mitomicina, mitonafida, saporina de fator de
 5 crescimento de mitotoxina fibroblástica, mitoxantrona,
 mofaroteno, molgramostim, anticorpo monoclonal,
 gonadotrofina coriônica humana, monofosforil lipídeo A+sk
 de parede celular de miobacterium, mopidamol, inibidor de
 gene de resistência a drogas múltiplas, terapia baseada em
 10 supressor 1 de tumor múltiplo, agente anticâncer mostarda,
 micaperoxida B, extrato de parede celular micobacteriana,
 miriaporona, N-acetildinalina, benzamidas N-substituídas,
 nafarelina, nagrestip, naloxona+pentazocina, napavina,
 nafterpina, nartograstim, nedaplatina, nemorubicina, ácido
 15 neridrônico, endopeptidase neutra, nilutamida, nisamicina,
 moduladores de óxido nítrico, nitróxido antioxidante,
 nitrulina, O6-benzilguanina, octreotida, oquicenona,
 oligonucleotídeos, onapristona, ondansetron, ondansetron,
 oracina, indutor de citoquina oral, ormaplatina, osaterona,
 20 oxaliplatina, oxaunomicina, paclitaxel, análogos de
 paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina,
 palmitoilrizoxina, ácido pamidrônico, panaxitriol,
 panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargase,
 peldesina, pentosan sódio polissulfato, pentostatina,
 25 pentrozola, perflubron, perfosfamida, álcool perilil,
 fenazinomicina, fenilacetato, inibidores de fosfatase,
 picibanil, hidrocloreto de pilocarpina, pirarubicina,
 piritrexim, placetina A, placetina B, inibidor de ativador
 de plasminogen, complexo de platina, compostos de platina,

complexo platina-triamina, sódio porfímero, porfiromicina, prednisona, propil bis-acridona, prostaglandina J2, inibidores de proteasoma, modulador imune baseado em proteína A, inibidor de proteína quinase C, inibidores de

5 proteína quinase C, microalgal, inibidores de proteína tirosina fosfatase, inibidores de purina nucleosídeo fosforilase, purpurinas, pirazoloacridina, conjugado piridoxilado hemoglobina polioxietileno, raf antagonistas, raltitrexato, ramosetron, inibidores de ras farnesil

10 proteína transferase, inibidores de ras, inibidor de ras-GAP, reteliptina demetilada, rênio Re 186 etidronato, rizoxina, ribozimas, RII retinamida, rogletimida, rohituquina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, saintopina, SarCNU, sarcofitol A, sargramostim,

15 Sdi 1 mimetics, semustina, inibidor 1 derivado de senescência, oligonucleotídeos senso, inibidores de sinal de transdução, moduladores de sinal de transdução, proteína de ligação a antígeno de cadeia simples, sizofiran, sobuzoxano, borocaptato de sódio, fenilacetato de sódio,

20 solverol, proteína de ligação de somatomedina, sonermina, ácido esparfósico, espicamicina D, espiromustina, esplenopentina, espongistatina 1, esqualamina, inibidor de células-tronco, inibidor de divisão de células-tronco, estipiamida, inibidores de estromelisina, sulfinosina,

25 antagonista de peptídeo intestinal superativo vasoativo, suradista, suramina, swainsonina, glicosaminoglicanas sintéticas, talimustina, tamoxifen metiodida, tauromustina, taxol, tazaroteno, sódio tecogalan, tegafur, telurapirílio, inibidores de telomerase, temoporfina, temozolomida,

teniposida, tetraclorodecaoxida, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiocoralina, tioguanina, trombopoietina, trombopoietina mimética, timalfasina, agonista de receptor de timopoietina, timotrinan, hormônio estimulador de 5 tiróide, tin etil etiopurpurina, tirapazamina, bicloreto de titanoceno, topsentina, toremifeno, fator de célula-tronco totipotente, inibidores de tradução, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, trimetrexato, triptorelina, tropisetron, turosterida, inibidores de tirosina quinase, 10 tirfostinas, inibidores de UBC, ubenimex, fator de inibição de crescimento derivado de sinus urogenital, antagonistas de receptor de uroquinase, vaporeotida, variolina B, sistema vetor, terapia gênica de eritrócito, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, vinorelbina, vinxaltina, VITAXIN®, 15 vorozola, zanoterona, zeniplatina, zilascorb, e zinostatina estimalamer. Drogas anticâncer preferidas adicionais são 5-fluorouracil e leucovorina.

Em avanços mais particulares, a presente invenção 20 também compreende a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com a administração de uma ou mais terapias, tais como, mas não limitadas a, agentes anti-câncer, tais como aqueles descritos na Tabela 1, preferencialmente para o tratamento de cânceres de mama, 25 ovário, melanoma, próstata, cólon e pulmão, como descrito acima.

TABELA 1

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
hidrocloroto de doxorubicina (Adriamicina RDF® e Adriamicina PFS®)	Intravenosa	60-75 mg/m ² no Dia 1	Intervalos de 21 dias
hidrocloroto de epirubicina (Ellence™)	Intravenosa	100-120 mg/m ² no Dia 1 de cada ciclo ou dividido igualmente e dado nos Dias 1-8 do ciclo	Ciclos de 3-4 semanas
Fluorouracil	Intravenosa	Como fornecido: Frascos de 5 ml e 10 ml (contendo 250 e 500 mg fluorouracil respectivamente)	
docetaxel (Taxotere®)	Intravenosa	60- 100 mg/m ² over 1 hora	Uma vez a cada 3 semanas
paclitaxel (Taxol®)	Intravenosa	175 mg/m ² over 3 horas	A cada 3 semanas por 4 cursos (administrado

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
			sequencialmente para quimioterapia de combinação contendo doxorubicina)
citrato de tamoxifen (Nolvadex®)	Oral (tablete)	20-40 mg Dosagens maiores do que 20 mg deveriam ser dadas em doses divididas (manhã e tarde)	Diariamente
Cálcio leucovorina para injeção	Intravenosa ou injeção intramuscular	Como fornecido: Frasco de 350 mg	Dosagem não é clara a partir do texto. PDR 3610
luprolida acetato (Lupron®)	Injeção única subcutânea	1 mg (0,2 ml ou 20 marca de unidade)	Uma vez por dia
Flutamida (Eulexin®)	Oral (cápsula)	250 mg (cápsulas contêm 125 mg de flutamida cada)	3 vezes ao dia em intervalos de 8 horas (750 mg de dosagem diária total)
Nilutamida	Oral	300 mg ou 150 mg	300 mg uma vez

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
(Nilandron®)	(tablete)	(tabletes contêm 50 ou 150 mg de nilutamida cada)	ao dia por 30 dias seguido por 150 mg uma vez ao dia
bicalutamida (Casodex®)	Oral (tablete)	50 mg (tabletes contêm 50 mg de bicalutamida each)	Uma vez por dia
Progesterona	Injeção	USP em óleo sésamo 50 mg/ml	
quetoconazol a (Nizoral®)	Creme	2% creme aplicado uma vez ou duas vezes diariamente dependendo dos sintomas	
Prednisona	Oral (tablete)	Dosagem inicial pode variar de 5 mg a 60 mg por dia dependendo da entidade de doença específica sendo tratada.	
sódio fosfato de	Oral (cápsula)	14 mg/ kg de peso corporal	Dada diariamente em 3 ou 4 doses

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
estramustina (Emcyt®)		(i.e. uma cápsula de 140 mg pode cada 10 kg ou 22 lb de peso corporal)	dividas
etoposida ou VP-16	Intravenosa	5 ml de solução a 20 mg/ ml (100 mg)	
Dacarbazina (DTIC-Dome®)	Intravenosa	2-4,5 mg/kg	Uma vez ao dia por 10 dias. Pode ser repetido em intervalos de 4 semanas
polifeprosan 20 com implante de carmustina (BCNU) (nitrosouréia) (Gliadel®)	Óstia colocada em cavidade de ressecção	8 óstias, cada uma contendo 7,7 mg de carmustina, para um total de 61,6 mg, se o tamanho e formato da cavidade de ressecção permitir	
Cisplatina	Injeção	[n/a em PDR 861] Como fornecido: Solução de 1	

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
		mg/ml em frascos multi-dose de 50mL e 100mL	
Mitomicina	Injeção	Fornecido em frascos de 5 mg e 20 mg (contendo 5 mg e 20 mg mitomicina)	
gemcitabina HCl (Gemzar®)	Intravenosa	Para NSCLC- 2 calendários foram investigados e o calendário ótimo não foi determinado Calendário de 4 semanas - administração intravenosa a 1000 mg/m ² por 30 minutos em calendário de 3 semanas - Gemzar administrado intravenosamente	Calendário de 4 semanas - Dias 1,8 e 15 de cada ciclo de 28 dias. Cisplatina intravenosamente a 100 mg/m ² no dia 1 após a infusão de Gemzar. Calendário de 3 semanas - Dias 1 e 8 de cada ciclo de 21 dias. Cisplatina em dosagem de 100 mg/m ²

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
		a 1250 mg/m ² por 30 minutos	administrada intravenosamente após a administração de Gemzar no dia 1.
Carboplatina (Paraplatin®)	Intravenosa	Terapia de agente único: 360 mg/m ² I.V. no dia 1 (infusão durando 15 minutos ou mais) Other dosage cálculos: terapia de Combinação com ciclofosfamida, Recomendações de Ajuste de Dose, Dosagem de Fórmula, etc.	A cada 4 semanas
Ifosamida (Ifex®)	Intravenosa	1,2 g/m ² diária	5 dias consecutivos Repetir a cada 3 semanas ou após a recuperação de toxicidade hematológica

Agente terapêutico	Administração	Dose	Intervalos
hidroclorato de topotecan (Hycamtin®)	Intravenosa	1,5 mg/m ² por infusão intravenosa por 30 minutos diários	5 dias consecutivos, iniciando no dia 1 do curso de 21 dias

A invenção também engloba a administração dos EphA2-BiTEs da invenção em combinação com radioterapia compreendendo o uso de raios x, raios gama e outras fontes de radiação para destruir as células cancerosas. Em avanços preferidos, o tratamento por radiação é administrado como feixe de radiação externo ou teleterapia caracterizado pelo fato de que a radiação é direcionada a partir de uma fonte remota. Em outros avanços preferidos, o tratamento por radiação é administrado como terapia interna ou braquiterapia caracterizado pelo fato de que uma fonte radioativa é colocada dentro do corpo, perto das células cancerosas ou massa tumoral.

Terapias para câncer e suas dosagens, rotas de administração e uso recomendado são conhecidas na arte e foram descritas em tal literatura como a referência *Physicians' Desk Reference* (61st ed., 2007).

Pacientes com Desordens celulares hiperproliferativas

A presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar a desordem celular hiperproliferativa ou um sintoma dessa, os métodos compreendendo administrar a um sujeito um ou mais EphA2-BiTE da invenção sozinho ou em combinação com terapias que não um EphA2-BiTE. O sujeito é um animal, preferencialmente um mamífero, tal como não primata (e.g., vacas, porcos, cavalos, gatos, cachorros, ratos, etc.) e um primata (e.g., macaco, tal como um macaco cinomolgus ou humano). Em um avanço preferencial, o sujeito é um humano.

Em um avanço específico, a desordem celular hiperproliferativa não é câncer. Exemplos não limitantes de desordens celulares hiperproliferativas a serem tratadas, prevenidas e/ou gerenciadas pelos métodos da invenção são descritos, e.g., in U.S. Pat. Pub. No. 2005-0059592, intitulada "EphA2 and Hyperproliferative Cell Disorders", que é incorporada por referência aqui em sua íntegra. Dessa forma, a invenção também provê composições e métodos projetados para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de desordens celulares hiperproliferativas (exemplos não limitantes de tais desordens estão descritos em, e.g., U.S. Pat. Pub. No. 2005-0059592, intitulada "EphA2 and Hyperproliferative Cell Disorders", que é incorporada por referência aqui em sua íntegra).

Em particular, a presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem celular hiperproliferativa onde a expressão de EphA2 é regulada

positivamente em células afetadas por tal desordem, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, e opcionalmente, uma quantidade
5 efetiva de uma terapia que não um EphA2-BiTE. Em um avanço preferencial, a desordem celular hiperproliferativa a ser tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção são asma, COPD, fibrose pulmonar, asbestose, IPF, DIP, UIP, fibrose renal, fibrose hepática, outras
10 fibroses, bronquial hiper-responsivo, psoríase, dermatite seborréica, fibrose cística, ou uma desordem celular hiperproliferativa endotelial, tal como, restenose, doença vascular hiperproliferativa, síndrome de Behcet, aterosclerose, degeneração macular, ou uma desordem
15 hiperproliferativa de fibroblasto.

Pacientes com Desordens Inflamatória e/ou Autoimune

A presente invenção provê métodos para tratar,
20 administrar e/ou prevenir uma desordem inflamatória ou auto-imune ou um sintoma dessa, os métodos compreendendo administrar a um sujeito um ou mais EphA2-BiTE da invenção sozinho ou em combinação com terapias que não um EphA2-BiTE. O sujeito é preferencialmente um mamífero tal como
25 um primata (e.g., macaco (e.g., um macaco *rhesus*, macaco *cinomolgus* ou chimpanzé), ou humano). Em um avanço preferencial, o sujeito é um humano.

Em particular, a presente invenção provê métodos para tratar, prevenir, e/ou gerenciar uma desordem inflamatória ou auto-imune onde a expressão de EphA2 é regulada positivamente em células afetadas por tal desordem, ditos

5 métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, e opcionalmente, uma quantidade efetiva de uma terapia que não um EphA2-BiTE. Em avanços específicos, a desordem inflamatória ou auto-imune a ser

10 tratada é uma desordem descrita em, e.g., International Publication No. WO 00/78815, International Publication No. WO 02/070007 A1, datada de 12 de setembro de 2002, intitulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin AlphaV

15 Beta3 Antagonists", International Publication No. WO 03/075957 A1, datada de 18 de setembro de 2003, intitulada "The Prevention or Treatment of Cancer Using Integrin AlphaVBeta3 Antagonists in combination with Other Agents", U.S. Patent Pub. No. US 2002/0168360 A1, datada de 14 de

20 novembro de 2002, intitulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists in combination with Other prophylactic or therapeutic Agents", e International Publication No. WO 03/075741 A2, datada de 18 de setembro

25 de 2003, intitulada, "Methods of Preventing or Treating Disorders by Administering an Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonist in combination with an HMG-CoA Reductase Inhibitor or a Bisphosphonate", cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra.

De acordo com esses avanços, os EphA2-BiTEs da invenção são administrados em combinação com uma quantidade efetiva de VITAXIN® (MedImmune, Inc., International Publication No. WO 00/78815, International Publication No. WO 02/070007 A1, datada de 12 de setembro de 2002, intitulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin AlphaV Beta3 Antagonists", International Publication No. WO 03/075957 A1, datada de 18 de setembro de 2003, intitulada "The Prevention or Treatment of Cancer Using Integrin AlphaVBeta3 Antagonists in combination with Other Agents", U.S. Patent Pub. No. US 2002/0168360 A1, datada de 14 de novembro de 2002, intitulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists in combination with Other prophylactic or therapeutic Agents", e International Publication No. WO 03/075741 A2, datada de 18 de setembro de 2003, intitulada, "Methods of Preventing or Treating Disorders by Administering an Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonist in combination with an HMG-CoA Reductase Inhibitor or a Bisphosphonate", cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Em outro avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem inflamatória ou auto-imune ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de siplizumab (MedImmune, Inc.,

International Pub. No. WO 02/069904, que é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Em outro avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem inflamatória ou auto-imune ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de uma agente anti-inflamatório descrito na Seção 5.4.2.4, *infra*.

Pacientes com Infecções

A presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção (em particular, uma infecção intracelular), ou um sintoma dessa, os métodos compreendendo administrar um ou mais EphA2-BiTE da invenção sozinhos ou em combinação com terapias que não um EphA2-BiTE. O sujeito é preferencialmente um mamífero, tal como não primata (e.g., vacas, porcos, cavalos, gatos, cachorros, ratos, etc.) e um primata (e.g., macaco (e.g., macaco *rhesus*, um macaco *cinomolgus* ou chimpanzé) e humano). Em um avanço preferencial, o sujeito é um humano.

Os métodos da invenção compreendem a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção a pacientes sofrendo de ou esperados por sofrer de (e.g., pacientes com uma predisposição genética para ou pacientes que sofreram previamente de) uma infecção. Tais pacientes pode ter sido previamente tratados ou estão sendo atualmente tratados

para a infecção, e.g., com uma terapia sem EphA2-BiTE. Em um avanço adicional, os métodos da invenção compreendem a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção para pacientes que são imunocomprometidos ou imunossuprimidos.

- 5 Em um certo avanço, um EphA2-BiTE não é administrado a pacientes que são imunocomprometidos ou imunossuprimidos. De acordo com a invenção, um EphA2-BiTE pode ser usado como qualquer linha de terapia, incluindo, mas não limitado a, uma primeira, segunda, terceira e quarta linha de terapia.
- 10 Ainda, de acordo com a invenção, um EphA2-BiTE pode ser usado antes de ocorrer qualquer efeito adverso ou intolerância das terapias sem EphA2-BiTE. A invenção engloba métodos para administrar um ou mais EphA2-BiTEs da invenção para prevenir o começo ou recorrência de uma
- 15 infecção.

- Em um avanço, a invenção também provê métodos de tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção como alternativas para terapias atuais. Em um avanço
- 20 específico, a terapia atual foi mostrada ou pode ser muito tóxica (i.e., resulta em efeitos colaterais inaceitáveis ou insuportáveis) para o paciente. Em outro avanço, um EphA2-BiTE diminui os efeitos colaterais se comparado com a terapia atual. Em outro avanço, o paciente foi mostrado
- 25 refratário a uma terapia atual. Em tais avanços, a invenção provê a administração de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sem quaisquer outras terapias anti-infecção. Em certos avanços, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados a um paciente em necessidade ao invés de

outra terapia para tratar uma infecção. Em um avanço, a invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção ativa. Em outro avanço, a invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção latente. Em outro avanço, a invenção provê métodos de prevenir a recorrência de uma infecção aguda. Ainda em outro avanço, a invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção crônica.

10 A presente invenção também engloba métodos para administrar um ou mais EphA2-BiTEs da invenção para tratar, prevenir e/ou gerenciar sintomas de infecções em pacientes que são ou se tornaram refratários a terapias sem EphA2-BiTE. A determinação de ser a infecção é refratária pode
15 ser feita *in vivo* ou *in vitro* por qualquer método conhecido na arte para testar a efetividade de uma terapia em células afetadas na infecção, particularmente células epiteliais, ou em pacientes que são ou se tornaram refratários a terapias sem EphA2-BiTE.

Infecções Virais

Expressão aumentada de EphA2 foi vista sendo associada com infecções por certos patógenos intracelulares, em particular, RSV (ver, e.g., U.S. Appn. Ser. No. 11/259.266,
25 preenchida em 27 de outubro de 2005, intitulada "Use of Modulators of EphA2 and EphrinA1 for the Treatment and Prevention of Infections", que é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Dessa forma, a invenção também

provê composições e métodos projetados para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção por patógeno, incluindo, mas não limitada a, uma infecção viral, tal como, por exemplo, uma infecção por RSV. Um ou mais EphA2-BiTEs da invenção e composições compreendendo ditos EphA2-BiTEs podem ser administrados a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa. Em um avanço preferencial, a infecção viral a ser tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da presente invenção são infecções virais intracelulares. Um ou mais EphA2-BiTEs da invenção e composições compreendendo ditos anticorpos podem ser administrados em combinação com uma ou mais outras terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção a um sujeito predisposto a ou com uma infecção viral útil para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção viral. Exemplos não limitantes de tais terapias incluem os agentes descritos na Seção 5.4.2.5, *infra*.

Em um avanço específico, a invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa, dito método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, a invenção provê um método de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa, dito método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais

EphA2-BiTEs da invenção e uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção.

5 Em certos avanços, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é administrada em combinação com uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) atualmente sendo usadas, tendo sido usadas, ou são conhecidas por
10 serem úteis no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa a um sujeito em necessidade. Terapias para uma infecção viral incluem, mas não estão limitados a, agentes antivirais, tais como, aciclovir, amantadina, oseltamivir, ribaviran,
15 palivizumab, e anamivir. Em certos avanços, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é administrada em combinação com uma ou mais medidas de apoio a um sujeito em necessidade para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa.
20 Exemplos não limitantes de medidas de apoio incluem umidificação do ar por um nebulizador ultra-sônico, epinefrina racêmica aerosolizada, dexametasona oral, fluidos intravenosos, entubação, redutores de febre (e.g., ibuprofen, acetometafina), e terapia antibiótica e/ou
25 antifúngica (i.e., para prevenir ou tratar infecções bacterianas secundárias).

Qualquer tipo de infecção viral ou condição resultante de ou associada com uma infecção viral pode ser tratada,

prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção, ditos métodos compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de
5 outra terapia (e.g., um agente terapêutico ou profilático que não EphA2-BiTEs da invenção). Exemplos de vírus que causam infecções virais incluem, mas não estão limitados a, retrovírus (e.g., vírus linfotrófico de célula T humana (HTLV) tipos I e II e vírus de imunodeficiência adquirida
10 humana (HIV, e.g., HIV-1 e HIV-2)), vírus de herpes (e.g., vírus de herpes simplex (HSV) tipos I e II, vírus Epstein-Barr, HHV6-HHV8, e citomegalovírus), arenavírus (e.g., vírus da febre de lassa), paramixovírus (e.g., vírus de morbilivírus, vírus sincicial respiratório humano,
15 cachumba, hMPV, e pneumovírus), adenovírus, buniavírus (e.g., hantavírus), coronavírus, filovírus (e.g., vírus Ebola), flavivírus (e.g., vírus da hepatite C (HCV), vírus da febre amarela, e vírus da encefalite japonesa), hepadnavírus (e.g., vírus da hepatite B (HBV)),
20 ortomiovírus (e.g., vírus influenza A, B e C e PIV), papovavírus (e.g., papilomavírus), picornavírus (e.g., rinovírus, enterovírus e vírus da hepatite A), poxvírus, reovírus (e.g., rotavírus), togavírus (e.g., vírus da rubéola), e rabdovírus (e.g., vírus da raiva). Respostas
25 biológicas a uma infecção viral incluem, mas não limitadas a, níveis elevados de anticorpos IgE, proliferação e/ou infiltração aumentada de células T, proliferação e/ou infiltração aumentada de células B, hiperplasia epitelial, e produção de mucina. Em um avanço específico, a invenção

também provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar infecções virais que são associadas com ou causam o resfriado comum, faringite viral, laringite viral, viral croup, bronquite viral, *influenza*, doenças virais parainfluenza ("PIV") doenças (e.g., croup, bronquiolite, bronquite, pneumonia), doenças por vírus sincitial respiratório ("RSV"), doenças por metapneumavírus, e doenças por adenovírus (e.g., doença respiratório febril, croup, bronquite, pneumonia), dito método compreendendo 5 administrar uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de outra terapia. 10

Em um avanço específico, infecções por vírus *influenza*, infecções por PIV, infecções por hMPV, infecções 15 por adenovírus, e/ou infecções por RSV, ou um ou mais sintomas dessas são tratados, prevenidos e/ou gerenciados de acordo com os métodos da invenção. Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas 20 dessa, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes antivirais, tais como, mas não limitados a, 25 a, amantadina, rimantadina, oseltamivir, zanamivir, ribaviran, RSV-IVIG (i.e., infusão intravenosa de globulina imune) (RESPIGAM™), e palivizumab e aqueles anticorpos descritos em U.S. Pat. Appn. Ser. Nos. 09/996.288 e 09/996.265, ambos intitulados "Methods of

Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies For Prophylaxis and Treatment", preenchidas em 28 de novembro de 2001. Em certos avanços, a infecção viral tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção não é uma
5 infecção por RSV.

Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por PIV ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo
10 administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais agentes antivirais, tais como, mas não limitados a, amantadina, rimantadina, oseltamivir, zanamivir, ribaviran,
15 e palivizumab. Em outro avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por hMPV ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos da invenção sozinhos ou em combinação
20 com uma quantidade efetiva de um ou mais agentes antivirais, tais como, mas não limitados a, amantadina, rimantadina, oseltamivir, zanamivir, ribaviran, e palivizumab a um sujeito em necessidade dos mesmos. Em outro avanço específico, a invenção provê métodos para
25 tratar, prevenir e/ou gerenciar *influenza*, ditos métodos compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de um agente antiviral, tal como, mas não limitado a, zanamivir (RELENZA®), oseltamivir

(TAMIFLU®), rimantadina, e amantadina (SYMADINE®; SYMMETREL®) a um sujeito em necessidade dos mesmos.

A invenção provê métodos para prevenir o desenvolvimento de asma em um sujeito que sofre ou sofreu de uma infecção viral respiratória, ditos métodos compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de outra terapia. Em um avanço específico, o sujeito é uma pessoa idosa (i.e., um humano que tem 65 anos de idade ou mais velho), um infante nascido prematuramente, um infante, ou uma criança. Em outro avanço específico, o sujeito sofreu ou sofre de infecção por RSV. Em um avanço específico, a infecção não é uma infecção viral respiratória. Em um avanço adicional, a infecção não uma infecção por RSV.

Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma ou mais respostas secundárias a uma infecção viral primária, ditos métodos compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de outras terapias (e.g., outros agentes profiláticos ou terapêuticos). Exemplos de respostas secundárias a uma infecção viral primária, particularmente uma infecção viral respiratória primária, incluem, mas não estão limitadas a, resposta tipo asma a estímulos da mucosa, resistência respiratória total elevada, susceptibilidade aumentada a infecções virais

secundárias, bacterianas, por fungos e por protozoários, e desenvolvimento de tais condições, tais como, mas não limitadas a, pneumonia, croup, e bronquite febril. Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, 5 prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral aguda. Em um avanço adicional, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral latente. Ainda em avanços adicionais, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por HIV ou uma 10 infecção por HBV.

Em um avanço específico, a invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo 15 administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de VITAXIN® (MedImmune, Inc., International Publication No. WO 00/78815, International Publication No. WO 02/070007 A1, 20 datada de 12 de setembro de 2002, intitulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin AlphaV Beta3 Antagonists," International Publication No. WO 03/075957 A1, datada de 18 de setembro de 2003, intitulada "The Prevention or 25 Treatment of Cancer Using Integrin AlphaVBeta3 Antagonists in combination with Other Agents," U.S. Patent Pub. No. US 2002/0168360 A1, datada de 14 de novembro de 2002, intitulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha_v\beta_3$

Antagonists in combination with Other prophylactic or therapeutic Agents", e International Publication No. WO 03/075741 A2, datada de 18 de setembro de 2003, intitulada, "Methods of Preventing or Treating Disorders by

5 Administering an Integrin $\alpha\beta 3$ Antagonist in combination with an HMG-CoA Reductase Inhibitor or a Bisphosphonate", cada qual é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Em outro avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção

10 viral ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de siplizumab (MedImmune, Inc., International Pub. No. WO

15 02/069904, que é aqui incorporada por referência em sua íntegra). Em outro avanço, a invenção provê métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma

20 quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos anti-IL-9, tais como aqueles descritos em U.S. Pat. Pub. No. 20050002934 (Jan. 6, 2005), que é aqui incorporada por referência em sua íntegra. Ainda em outro avanço, a

25 invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade

efetiva de dois ou mais dos seguintes: VITAXIN®, um anticorpo anti-IL-9 e/ou siplizumab.

Em um avanço, uma quantidade efetiva de um ou mais
5 EphA2-BiTEs da invenção é administrada em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos anti-IgE a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa. Em um avanço específico, uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos
10 da invenção é administrada em combinação com uma quantidade efetiva de anticorpo TNX901 anti-IgE a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa. Em um avanço específico, uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos da invenção é
15 administrada em combinação com uma quantidade efetiva de anticorpo rhuMAb-E25 omalizumab anti-IgE a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa. Em outro avanço, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é
20 administrada em combinação com uma quantidade efetiva de anticorpo HMK-12 anti-IgE a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa. Em um avanço específico, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é
25 administrada em combinação com uma quantidade efetiva de anticorpo 6HD5 anti-IgE a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa. Em outro avanço, uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos da invenção é administrada em combinação

com uma quantidade efetiva de anticorpo MAb Hu-901 anti-IgE a um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa.

5 A invenção engloba métodos para prevenir o desenvolvimento de infecções virais, em um paciente esperado por sofrer de uma infecção viral ou em risco crescente de tal infecção, e.g., pacientes com sistemas imune suprimidos (e.g., receptor de transplante de órgãos, 10 pacientes com AIDS, pacientes fazendo quimioterapia, os idosos, infantes nascidos prematuramente, infantes, crianças, pacientes com carcinoma do esôfago com obstrução, pacientes com fístula traqueobronquial, pacientes com doenças neurológicas (e.g., causadas por derrame, esclerose 15 lateral amiotrófica, esclerose múltipla, e miopatias), e pacientes já sofrendo de infecção viral). Os pacientes podem ou não ter sido previamente tratados para uma infecção viral.

20 Os EphA2-BiTEs da invenção, composições, ou combinação terapias da invenção podem ser usados como qualquer linha de terapia, incluindo, mas não limitada a, a primeira, segunda, terceira, quarta, ou quinta linha de terapia, para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou 25 mais sintomas dessa. A invenção também inclui métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral, ou um ou mais sintomas dessa em um paciente fazendo terapias para outras doenças ou desordens associadas com expressão aumentada de EphA2. A invenção engloba métodos de tratar,

prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral, ou um ou mais sintomas dessa em um paciente antes que quaisquer efeitos adversos ou intolerância a terapias sem EphA2-BiTEs da invenção se desenvolvam. A invenção também engloba métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um sintoma dessa em pacientes refratários. Em certos avanços, um paciente com uma infecção viral, é refratário a uma terapia quando a infecção não foi significativamente erradicada e/ou os sintomas não foram significativamente aliviados. A determinação de se um paciente é refratário pode ser feita tanto *in vivo* como *in vitro* por qualquer método conhecido na arte para testar a efetividade de um tratamento de infecções, usando meios aceitos na arte de "refratário" em tal contexto. Em vários avanços, um paciente com uma infecção viral é refratário quando a replicação viral não diminuiu ou aumentou. A invenção também engloba métodos de prevenir o começo ou recorrência de infecções virais em pacientes em risco de desenvolver tais infecções. A invenção também engloba métodos de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um sintoma dessa em pacientes que são susceptíveis a reações adversas a terapias convencionais. A invenção engloba ainda métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral para qual nenhuma terapia antiviral está disponível.

A invenção engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um sintoma dessa em um paciente visto como refratário a terapias sem EphA2-BiTEs

da invenção, mas não está mais nessas terapias. Em certos avanços, os pacientes sendo administrados ou tratados de acordo com os métodos desta invenção são pacientes já sendo tratados com antibióticos, antivirais, antifúngicos, ou
5 outra terapia biológica/imunoterapia. Entre esses pacientes estão pacientes refratários, pacientes que são muito jovens para terapias convencionais, e pacientes com infecções virais recorrentes apesar de administração ou tratamento com terapias existentes.

10

A presente invenção engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral, ou um ou mais sintomas dessa como uma alternativa para outras terapias convencionais. Em avanços específicos, o paciente sendo
15 administrado ou tratado de acordo com os métodos da invenção é refratário a outras terapias ou é susceptível a reações adversas de tais terapias. O paciente pode ser uma pessoa com sistema imunológico suprimido (e.g., pacientes pós-operatórios, pacientes de quimioterapia, e pacientes
20 com doença de imunodeficiência), uma pessoa com função renal ou hepática prejudicada, os idosos, crianças, infantes, infantes nascidos prematuramente, pessoas com desordens neuropsiquiátricas ou aqueles que tomam drogas psicotrópicas, pessoas com histórico de convulsões, ou
25 pessoas em medicação que interagiriam negativamente com agentes convencionais usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção viral ou um ou mais sintomas dessa.

Terapias para infecção viral e suas dosagens, rotas de administração e uso recomendado são conhecidas na arte e foram descritas em tal literatura como a referência *Physicians' Desk Reference* (61st ed., 2007).

5

Infecções bacterianas

A invenção provê um método de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana, em particular uma
10 infecção bacteriana intracelular, ou um ou mais sintomas dessa, dito método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Preferencialmente, células infectadas com as bactérias intracelulares possuem
15 expressão aumentada de EphA2. Em outro avanço, a invenção provê um método de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana ou um ou mais sintomas dessa, dito método compreendendo administrar a um sujeito em
necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de a um ou mais
20 EphA2-BiTEs da invenção e uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos), sem EphA2-BiTEs da invenção. Em um avanço preferencial, as infecções bacterianas a serem tratadas, prevenidas e/ou gerenciadas de acordo com os métodos da
25 presente invenção são infecções bacterianas intracelulares.

Qualquer tipo de infecção bacteriana intracelular ou condição resultante ou associada com uma infecção bacteriana (e.g., uma infecção respiratória) pode ser

tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção. Exemplos de bactérias intracelulares que causam infecções incluem, mas não limitados a, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*,
 5 *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Brucella* sp, *Legionella* sp, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia rickettsii*; *Rickettsia prowazekii*; *Rickettsia typhi*; *Rickettsia tsutsugamushi*; *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia psittaci*; e *Chlamydia pneumoniae*. Em certos
 10 avanços, uma infecção bacteriana intracelular tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção não é uma infecção bacteriana respiratória. Em outros avanços, uma infecção bacteriana intracelular tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos
 15 da invenção não é uma infecção por espécies de *Salmonella*. Ainda em outros avanços, uma infecção bacteriana intracelular tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção não é uma infecção por *Salmonella dublin*.

20

Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana intracelular ou um ou mais sintomas dessa, dito método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do
 25 mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção. Em outro avanço, a invenção provê um método de tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana intracelular ou um ou mais sintomas dessa, dito método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do

mesmo uma quantidade efetiva de a um ou mais EphA2-BiTEs da invenção e uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos), que não EphA2-BiTEs da invenção.

5

Em certos avanços, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana ou um ou mais dos sintomas, ditos métodos compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação e quantidade efetiva de uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos), que não EphA2-BiTEs da invenção, usadas para tratar, prevenir e/ou gerenciar infecções bacterianas. Terapias para infecções bacterianas, particularmente, infecções bacterianas incluem, mas não estão limitadas a, agentes antibacterianos (e.g., aminoglicosidas (e.g., gentamicina, tobramicina, amicacina, netilimicina) aztreonam, cefalosporinas (e.g., cefaclor, cefadroxil, cephaloxina, cefazolina), clindamicina, eritromicina, penicilina (e.g., penicilina V, penicilina cristalina G, penicilina G procaína), espectinomina, e tetraciclina (e.g., clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina)) e terapia de apoio, tal como ventilação suplementar e mecânica. Em certos avanços, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção são administrados em combinação com uma ou mais medidas de apoio a um sujeito em necessidade das mesmas para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana ou um ou mais sintomas dessa. Exemplos não limitantes de medidas de apoio incluem

umidificação do ar por nebulizador ultra-sônico, epinefrina racêmica aerosolizada, dexametasona oral, fluidos intravenosos, entubação, redutores de febre (e.g., ibuprofen, acetometafina), e mais preferencialmente, 5 terapia antibiótica ou antiviral (i.e., para prevenir ou tratar infecções secundárias).

A invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma resposta biológica a uma infecção bacteriana, 10 tal como, mas não limitada a, níveis elevados de anticorpos IgE, proliferação, degranulação, e/ou infiltração de mastócitos, proliferação e/ou infiltração crescente de células B, e proliferação e/ou infiltração crescente de células T, ditos métodos compreendendo administrar a um 15 sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (e.g. um agente terapêutico ou profilático) sem EphA2-BiTEs da invenção. A invenção também provê métodos 20 de tratar, prevenir e/ou gerenciar condições respiratórias causadas por ou associadas com infecções bacterianas, tais como, mas não limitadas a, pneumonia, pneumonia de aspiração recorrente, legionelose, coqueluche, meningite, ou tuberculose, ditos métodos compreendendo administrar a 25 um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção sozinhos ou em combinação com uma quantidade efetiva de outra terapia.

Em um avanço específico, os métodos da invenção são utilizados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana causada por *Mycobacteria* ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo a administração para um sujeito com necessidade de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção só ou em combinação com uma quantidade efetiva de uma ou mais outras terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção.

10

Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma ou mais condições secundárias ou respostas a uma infecção bacteriana primária, preferencialmente uma infecção bacteriana primária, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta em uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção só ou em combinação com uma quantidade efetiva de outras terapias (por exemplo, outros agentes profiláticos ou terapêuticos). Exemplos de condições secundárias ou respostas a uma infecção bacteriana primária, particularmente uma infecção bacteriana, inclui, mas não são limitados a, respostas do tipo asma a estímulo de mucosa, resistência total elevada, susceptibilidade a infecções secundárias virais, bacterianas, fúngicas e protozoários aumentada, e desenvolvimento de tais condições como, por exemplo, mas não limitadas a, pneumonia, crupe, e bronquite febril.

20

25

Em um avanço específico, os métodos da invenção são usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração para um sujeito em

5 necessidade de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de VITAXIN® (MedImmune, Inc., *International Publication No. WO 00/78815, International Publication No. WO 02/070007 A1*, datado de 12 de setembro de 2002, intitulada "Methods of

10 Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin AlphaV Beta3 Antagonists," *International Publication No. WO 03/075957 A1*, datado de 18 de setembro de 2003, intitulada "The Prevention or Treatment of Cancer Using Integrin AlphaVBeta3 Antagonists

15 in Combination with Other Agents", U.S. Patent Pub. No. US 2002/0168360 A1, datado de 14 de novembro de 2002, intitulado "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists in Combination with Other Prophylactic or

20 Therapeutic Agents," e *International Publication No. WO 03/075741 A2*, datada de 18 de setembro de 2003, intitulada, "Methods of Preventing or Treating Disorders by Administering an Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonist in Combination with an HMG-CoA Reductase Inhibitor or a Bisphosphonate",

25 cada qual incorporada aqui por referência em sua íntegra).

Em outro avanço específico, os métodos da invenção são usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos

compreendendo a administração para um sujeito em
necessidade desta em uma quantidade efetiva de um ou mais
EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade
efetiva de siplizumab (MedImmune, Inc., *International Pub.*
5 *No. WO 02/069904*). Em outro avanço, os métodos da invenção
são usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma
infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas desta, ditos
métodos compreendendo a administração para um sujeito em
necessidade desta em uma quantidade efetiva de um ou mais
10 EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade
efetiva de um ou mais anticorpos anti-Il-9 (por exemplo, um
dos anticorpos anti-IL-9 descritos na *U.S. Pat. Pub. No.*
20050002934 (6 de janeiro, 2005), o qual é incorporado aqui
por referência em sua íntegra). Em ainda outro avanço, a
15 invenção provê métodos para tratamento, prevenção e/ou
gerenciamento de uma infecção bacteriana, ou um ou mais
sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração
para um sujeito em necessidade desta em uma quantidade
efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação
20 com uma quantidade efetiva de dois ou mais dos seguintes:
VITAXIN®, siplizumab, e/ou anticorpos anti-Il-9.

A invenção engloba métodos para prevenção do
desenvolvimento de infecção bacteriana, em um paciente o
25 qual se espera sofrer de uma infecção bacteriana ou em
risco aumentado de tal infecção, por exemplo, pacientes
como sistemas imunológicos suprimidos (por exemplo,
recipientes de transplantes de órgãos, pacientes de AIDS,
pacientes submetendo-se a quimioterapia, os mais idosos,

infantes nascidos prematuramente, infantes, crianças, pacientes com carcinoma do esôfago com obstrução, pacientes com fístula traqueobrônquica, pacientes com doenças neurológicas (por exemplo, causadas por derrame, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, e miopatias), e 5 pacientes já sofrendo de uma infecção). Os pacientes podem ou não ter sido previamente tratados para uma infecção.

Os EphA2-BiTEs da invenção ou combinação de terapias 10 da invenção podem ser usadas como qualquer linha de terapia, incluindo mas não limitada às primeira, segunda, terceira, quarta, ou quinta linha de terapias, para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas desta. A invenção também inclui métodos para 15 tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas dessa em um paciente submetendo-se a terapias para outras doenças ou desordens. A invenção engloba métodos para tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção bacteriana, ou um ou mais 20 sintomas desta, em um paciente antes que se desenvolva quaisquer efeitos adversos ou intolerância a outras terapias que não EphA2-BiTEs da invenção. A invenção também engloba métodos para tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção bacteriana ou um sintoma 25 desta em pacientes refratários. Em certos avanços, um paciente com uma infecção bacteriana é refratário a uma terapia quando a infecção não foi significativamente erradicada e/ou os sintomas não foram significativamente aliviados. A determinação de se um paciente é refratário

pode ser feita tanto *in vivo* ou *in vitro* por qualquer método conhecido na arte para ensaiar a efetividade de um tratamento de infecções, usando significados de "refratário" e tal contexto aceitos na arte. Em vários

5 avanços, um paciente com uma infecção bacteriana é refratário quando a replicação bacteriana não é diminuída ou é aumentada. A invenção também engloba métodos de prevenção do começo ou recorrência da infecção bacteriana, em pacientes em risco de desenvolverem tal infecção. A

10 invenção também engloba métodos para tratar, gerenciar e/ou prevenir uma infecção bacteriana, ou um sintoma desta em pacientes que são susceptíveis a reações adversas a terapias convencionais. A invenção engloba ainda métodos para tratar, prevenir, e/ou gerenciar infecções

15 bacterianas, para as quais não há terapia antibacteriana disponível.

A invenção engloba métodos para tratar, prevenir, e/ou gerenciar infecções bacterianas, ou um sintoma desta em um

20 paciente que se mostrou refratário a terapias outras que não EphA2-BiTEs da invenção, mas não estão mais nestas terapias. Em certos avanços, os pacientes sendo gerenciados ou tratados de acordo com os métodos desta invenção são pacientes já sendo tratados com agentes anti-inflamatórios,

25 antibióticos, antivirais, antifúngicos, agentes antiprotozoários, ou outras terapias biológicas/imunoterapias. Entre estes pacientes estão pacientes refratários, pacientes que são muito novos para terapias convencionais, e pacientes com infecções

bacterianas recorrentes apesar do gerenciamento ou tratamento com terapias existentes.

A presente invenção engloba métodos de tratar,
5 prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana, ou um ou
mais sintomas dessa como uma alternativa a outras terapias
convencionais. Em avanços específicos, um paciente sendo
gerenciado ou tratado de acordo com os métodos da invenção
é refratário a outras terapias ou é susceptível a reações
10 adversas destas terapias. O paciente pode ser uma pessoa
com o sistema imunológico suprimido (por exemplo, paciente
pós-operatório, pacientes de quimioterapias, e pacientes
com doença de imunodeficiência), uma pessoa com função
renal ou do fígado comprometidas, os mais idosos, crianças,
15 infantes, infantes nascidos prematuramente, pessoas com
desordens neuropsiquiátricas ou aquelas que tomam drogas
psicotrópicas, pessoas com histórias de convulsão, ou
pessoas sob medicação que teriam interação negativa com
agentes convencionais usados para tratar, prevenir e/ou
20 gerenciar uma infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas
desta.

Terapias para infecções bacterianas e suas dosagens,
rotas de administração e uso recomendado são conhecidos na
25 arte e foram descritos em tais literaturas como a
referência *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007).

Infecções Fúngicas

Um ou mais EphA2-BiTEs da invenção podem ser administradas de acordo com métodos da invenção para um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta. Em um avanço 5 preferido, células infectadas por fungos têm a expressão de EphA2 aumentada. Um ou mais EphA2-BiTEs da invenção podem ser também administradas a um sujeito para tratar, gerenciar, e/ou melhorar uma infecção fúngica e/ou um ou mais sintomas dessa em combinação com uma ou mais outras 10 terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção as quais são úteis para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta. Em um avanço preferido, as infecções fúngicas podem ser tratadas, 15 prevenidas e/ou gerenciadas de acordo com os métodos da presente invenção em infecções fúngicas intracelulares.

Qualquer tipo de infecção fúngica ou condição resultando de ou associada com a infecção fúngica pode ser 20 tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção. Exemplos de fungos que causam infecções fúngicas incluem, mas não são limitados a, espécies de *Absidia* (por exemplo, *Absidia corymbifera* e *Absidia ramosa*), espécies de *Aspergillus*, (por exemplo, *Aspergillus 25 flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus terreus*), *Basidiobolus ranarum*, *Blastomyces dermatitidis*, espécies de *Candida* (por exemplo, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kerr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida*

pseudotropicalis, *Candida quillermondii*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea*, e *Candida tropicalis*), *Coccidioides immitis*, espécies de *Conidiobolus*, *Cryptococcus neoforms*, espécies de *Cunninghamella*, dermatófitos, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporum gypseum*, *Mucor pusillus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Pneumocystis carinii*, espécies de *Rhizopus* (por exemplo, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, e *Rhizopus microsporus*), espécies de *Saccharomyces*, *Sporothrix schenckii*, zigomicetos, e classes como, por exemplo, Zigomicetos, Ascomicetos, os Basidiomicetos, Deuteromicetos, e Oomicetos. Em um avanço específico, a infecção fúngica não é uma infecção fúngica respiratória.

Em um avanço específico, a invenção provê um método para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta em uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção.

Em outro avanço, a invenção provê um método de tratar, prevenir e /ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta em uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção e uma quantidade efetiva de uma ou mais outras terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não os EphA2-BiTEs da invenção.

Em certos avanços, uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos é administrada em combinação com uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos), outras que não os EphA2-BiTEs da invenção, as quais estão correntemente sendo usadas, foram usadas, ou são conhecidas como sendo úteis no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção fúngica, preferencialmente infecção fúngica, para um sujeito em necessidade desta.

10 Terapias para infecções fúngicas incluem, mas não são limitadas a, agentes antifúngicos como, por exemplo, drogas azóis por exemplo, miconazol, cetoconazol (NIZORAL®), acetato de caspofungina (CANCIDAS®), imidazol, triazols (por exemplo, fluconazol (DIFLUCAN®)), e itraconazol

15 (SPORANOX®)), polienos (por exemplo, nistatina, dispersão coloidal de anfotericina B ("ABCD") (AMPHOTEC®), anfotericina B lipossomal (AMBISONE®)), iodeto de potássio (KI), pirimidina (por exemplo, flucitosina (ANCOBON®)), e voriconazol (VFEND®). Em certos avanços, uma quantidade

20 efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção são administrados em combinação com uma ou mais medidas sustentadoras a um sujeito em necessidade desta para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta. Exemplos não limitantes de medidas

25 sustentadoras incluem umidificação do ar por um nebulizador ultra-sônico, epinefrina racêmica aerosolizada, dexametasona oral, fluidos intravenosos, entubação, redutores de febre (por exemplo, ibuprofeno e acetometafina), e terapia antiviral ou antibacteriana (isto

é, para prevenir ou tratar infecções virais ou bacterianas secundárias).

A invenção também provê métodos para tratar, prevenir
5 e/ou gerenciar uma resposta biológica a uma infecção
fúngica como, por exemplo, mas não limitado a, níveis
elevados de anticorpos IgE, níveis elevados de fator de
crescimento nervoso (NGF), proliferação de mastócitos,
degranulação, e/ou infiltração, proliferação aumentada e/ou
10 infiltração de células B, e proliferação aumentada e/ou
infiltração de células T, ditos métodos compreendendo a
administração de uma quantidade efetiva de um ou mais
EphA2-BiTEs só ou em combinação com uma ou mais outras
terapias.

15

Em um avanço específico, a invenção provê métodos para
tratar, prevenir e/ou gerenciar uma ou mais condições
secundárias ou respostas a infecção fúngica primária,
preferencialmente uma infecção fúngica primária, dito
20 método compreendido da administração para um sujeito em
necessidade desta em uma quantidade efetiva de um ou mais
EphA2-BiTEs da invenção só ou em combinação com uma
quantidade efetiva de outras terapias (por exemplo, outros
agentes profiláticos ou terapêuticos). Que não os EphA2-
25 BiTEs da invenção. Exemplos de condições secundárias ou
respostas a infecções fúngicas primárias, particularmente
infecções fúngica primária, mas não são limitadas a,
responsividade do tipo asma a estímulo de mucosa,
resistência total elevada, susceptibilidade aumentada a

infecções secundárias virais, fúngicas, e fúngicas, e desenvolvimento de tais condições como, por exemplo, mas não limitadas a, pneumonia, crupe, e bronquite febril.

5 Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em
10 combinação com uma quantidade efetiva de VITAXIN® (MedImmune, Inc., International Publication No. WO 00/78815, International Publication No. WO 02/070007 A1, datado de 12 de setembro de 2002, intitulado "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders
15 by Administering Integrin AlphaV Beta3 Antagonists," International Publication No. WO 03/075957 A1, datado de 18 de setembro de 2003, intitulado "The Prevention or Treatment of Cancer Using Integrin AlphaVBeta3 Antagonists in Combination with Other Agents," U.S. Patent Pub. No. US
20 2002/0168360 A1, datado de 14 de novembro de 2002, intitulado "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists in Combination with Other Prophylactic or Therapeutic Agent", e International Publication No. WO
25 03/075741 A2, datado de 18 de setembro de 2003, intitulado, "Methods of Preventing or Treating Disorders by Administering an Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonist in Combination with an HMG-CoA Reductase Inhibitor or a Bisphosphonate",

cada qual sendo incorporada aqui por referência em sua íntegra) a um sujeito em necessidade desta.

Em outro avanço, a invenção provê métodos para tratar, 5 prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de siplizumab (MedImmune, Inc., 10 *International Pub. No. WO 02/069904*) a um sujeito em necessidade desta. Em outro avanço, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade 15 desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos anti-IL-9 (por exemplo, um ou mais dos anticorpos anti-IL-9 descritos em *U.S. Pat. Pub. No. 20050002934* (6 de janeiro, 2005)), a qual é incorporada 20 aqui por referência em sua íntegra). Em outro avanço, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais 25 EphA2-BiTEs em combinação com uma quantidade efetiva de dois ou mais do seguinte: VITAXIN®, Siplizumab e/ou anticorpos anti-IL-9.

A invenção engloba métodos para prevenir o desenvolvimento de infecções fúngicas em um paciente o qual se espera sofrer de uma infecção fúngica, ou em risco aumentado de sofrer tal infecção. Tais sujeitos incluem, 5 mas não são limitados a, pacientes com sistemas imunológicos suprimidos (por exemplo, pacientes recipientes de transplantes de órgãos, pacientes de AIDS, pacientes submetendo-se a quimioterapia, pacientes com carcinoma do esôfago com obstrução, pacientes com fístula 10 traqueobrônquica, pacientes com doenças neurológicas (por exemplo, causadas por derrame, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, e miopatias), e pacientes já sofrendo de uma condição, particularmente uma infecção). Os pacientes podem ou não terem sido previamente tratados 15 para uma infecção. Em um avanço específico, o paciente sofre de displasia broncopulmonar, doença do coração congênita, fibrose cística, e/ou imunodeficiência adquirida ou congênita. Em outro avanço específico, o paciente é um 20 infante nascido prematuramente, um infante, uma criança, um humano mais idoso, ou um humano em uma casa de grupo, casa de enfermagem, ou algum outro tipo de instituição. A invenção também engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas dessa em pacientes que são susceptíveis a reações adversas a 25 terapias convencionais antifúngicas para condições para as quais não há terapias disponíveis.

Os EphA2-BiTEs da invenção ou combinação de terapias da invenção podem ser usadas como qualquer linha de

terapia, incluindo mais não limitadas à primeira, segunda, terceira, quarta, ou quinta linha de terapia, para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintoma desta. A invenção também inclui métodos para

5 tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas dessa em um paciente submetendo-se a terapias para outras doenças ou desordens. A invenção engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas dessa em um

10 paciente antes que se desenvolvam quaisquer efeitos adversos ou intolerância a terapias que não com EphA2-BiTEs da invenção. A invenção também engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um sintoma desta em pacientes refratários. Em certos avanços, um

15 paciente com uma infecção fúngica, é refratário à terapia quando a infecção não foi significativamente erradicada e/ou os sintomas não foram significativamente aliviados. A determinação de se um paciente é refratário pode ser feita tanto *in vivo* ou *in vitro* por qualquer método conhecido na

20 arte para ensaiar a efetividade de um tratamento de infecções, usando significados de "refratário" em tal contexto aceitos na arte. Em vários avanços, um paciente com uma infecção fúngica, é refratário quando a replicação fúngica não foi diminuída ou foi aumentada. A invenção

25 também engloba métodos de prevenir o começo ou recorrência de infecções fúngicas, em pacientes sob risco de desenvolver tais infecções. A invenção também engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um sintoma desta em pacientes que são

susceptíveis a reações adversas a terapias convencionais. A invenção engloba adicionalmente métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar infecções fúngicas, para as quais não há terapia antifúngica disponível.

5

A invenção engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica, ou um sintoma desta em um paciente que se provou refratário a terapias que não por EphA2-BiTEs da invenção mas não estão mais nestas terapias.

10 Em certos avanços, os pacientes sendo gerenciados ou tratados de acordo com os métodos desta invenção são pacientes já sendo tratados com antibióticos, antivirais, antifúngicos, ou outra terapia/imunoterapia biológica. Entre estes pacientes estão pacientes refratários, 15 pacientes que são muito novos para terapias convencionais, e pacientes com infecções fúngicas recorrentes apesar do gerenciamento e tratamento com terapias existentes.

A presente invenção provê métodos para tratar, 20 prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas dessa como uma alternativa a outras terapias convencionais. Em avanços específicos, o paciente sendo gerenciado ou tratado de acordo com os métodos da invenção é refratário a outras terapias ou é susceptível a reações 25 adversas de tais terapias. O paciente pode ser uma pessoa com um sistema imunológico suprimido (por exemplo, pacientes pós-operados, pacientes de quimioterapias, e pacientes com doença de imunodeficiência), uma pessoa com função renal ou do fígado comprometidas, os mais idosos,

crianças, infantes, infantes nascidos prematuramente, pessoas com desordens neuropsiquiátricas ou aquelas que tomam drogas psicotrópicas, pessoas com histórias de convulsão, ou pessoas sob medicação que teriam interação
5 negativa com agentes convencionais usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção bacteriana, ou um ou mais sintomas desta.

10 Terapias para infecções fúngicas e suas dosagens, rotas de administração e uso recomendado são conhecidos na arte e foram descritos em tais literaturas como a referência *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007).

Infecções por protozoários

15

Um ou mais EphA2-BiTEs da invenção podem ser administrados de acordo com métodos da invenção para um sujeito para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta. Em um avanço
20 preferido, células infectadas por protozoários têm expressão de EphA2 aumentada. Um ou mais EphA2-BiTEs da invenção também podem ser administrados para um sujeito para tratar, gerenciar, e/ou melhorar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas dessa em combinação com
25 uma ou mais terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção os quais são úteis para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas desta. Em um avanço preferido, as infecções por

protozoários a serem tratadas, prevenidas e/ou gerenciadas de acordo com os métodos da presente invenção são infecções intracelulares por protozoários.

5 Qualquer tipo de infecção por protozoários ou condição resultante de ou associada a uma infecção por protozoários pode ser tratada, prevenida e/ou gerenciada de acordo com os métodos da invenção. Exemplos de protozoários que causam infecções incluem, mas não limitam-se a, *Leishmania*;
10 *Trypanosoma*; *Giardia*; *Trichomonas*; *Entamoeba*; *Dientamoeba*; *Naegleria* e *Acanthamoeba*; *Babesia*; *Plasmodium*; *Isospora*; *Sarcocystis*; *Toxoplasma*; *Enterocytozoon*; *Balantidium*; e *Pneumocystis*.

15 Em um avanço específico, a invenção provê um método para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da
20 invenção. Em outro avanço, a invenção provê um método para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da
25 invenção e uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção.

Em certos avanços, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs é administrada em combinação com uma quantidade efetiva de uma ou mais terapias (por exemplo, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos), que não os
5 EphA2-BiTEs da invenção, os quais estão sendo atualmente usados, foram usados, ou são conhecidos como úteis no tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção por protozoários, a um sujeito em necessidade desta. Em certos avanços, uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-
10 BiTEs da invenção são administradas em combinação com uma ou mais medidas sustentadoras a um sujeito em necessidade desta para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta. Exemplos não limitantes de medidas sustentadoras incluem umidificação do
15 ar por um nebulizador ultra-sônico, epinefrina racêmica aerosolizada, dexametasona oral, fluidos intravenosos, entubação, redutores de febre (por exemplo, ibuprofeno e acetometafina), e terapia antiviral ou antibacteriana (isto é, para prevenir ou tratar infecções virais ou bacterianas
20 secundárias).

A invenção também provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma resposta biológica a uma infecção por protozoários como, por exemplo, mas não limitam-se a,
25 níveis elevados de anticorpos IgE, níveis elevados de fator de crescimento de nervo (NGF), proliferação de mastócitos, degranulação, e/ou infiltração, aumento da proliferação e/ou infiltração de células B, e aumento da proliferação e/ou infiltração de células T, ditos métodos compreendendo

a administração de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs só ou em combinação com uma ou mais terapias.

Em um avanço específico, a invenção provê métodos para
5 tratar, prevenir e/ou gerenciar uma ou mais condições secundárias ou respostas a uma infecção primária, preferencialmente uma infecção primária por protozoários, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais
10 EphA2-BiTEs da invenção só ou em combinação com uma quantidade efetiva de outras terapias (por exemplo, outros agentes profiláticos ou terapêuticos) que não EphA2-BiTEs da invenção.

15 Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da
20 invenção em combinação com uma quantidade efetiva de VITAXIN® (MedImmune, Inc., *International Publication No. WO 00/78815, International Publication No. WO 02/070007 A1*, datado de 12 de setembro de 2002, intitulada "*Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders*
25 *by Administering Integrin AlphaV Beta3 Antagonists*", *International Publication No. WO 03/075957 A1*, datado de 18 de setembro de 2003, intitulada "*The Prevention or Treatment of Cancer Using Integrin AlphaVBeta3 Antagonists in Combination with Other Agents*," U.S. Patent Pub. No. US

2002/0168360 A1, datado de 14 de novembro de 2002, intitulada "*Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists in Combination with Other Prophylactic or Therapeutic Agent*", e International Publication No. WO 03/075741 A2, datado de 18 de setembro de 2003, intitulada, "*Methods of Preventing or Treating Disorders by Administering an Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonist in Combination with an HMG-CoA Reductase Inhibitor or a Bisphosphonate*", cada qual sendo incorporado aqui por referência em sua íntegra) a um sujeito em necessidade desta.

Em outro avanço, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção em combinação com uma quantidade efetiva de siplizumab (MedImmune, Inc., International Pub. No. WO 02/069904) a um sujeito em necessidade desta. Em outro avanço, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs em combinação com uma quantidade efetiva de um ou mais anticorpos anti-IL-9 (por exemplo, os anticorpos anti-IL-9 descritos em U.S. Pat. Pub. No. 20050002934 (Jan. 6, 2005)), a qual é incorporada aqui por referência em sua íntegra). Em outro avanço, a invenção provê métodos para

tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs em
5 combinação com uma quantidade efetiva de dois ou mais do seguinte: VITAXIN®, siplizumab e/ou anticorpos anti-IL-9.

A invenção engloba métodos para prevenir o desenvolvimento de infecções de protozoários em um paciente
10 o qual se espera sofrer de uma infecção por protozoários, ou em risco aumentado de sofrer tal infecção. Tais sujeitos incluem, mas não são limitados a, pacientes com sistemas imunes suprimidos (por exemplo, pacientes recipientes de transplantes de órgãos, pacientes de AIDS, pacientes
15 submetendo-se a quimioterapia, pacientes com câncer, pacientes com fístula traqueobrônquica, pacientes com doenças neurológicas (por exemplo, causadas por derrame, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, e miopatias), e pacientes já sofrendo de uma condição,
20 particularmente uma infecção. Em um avanço específico, o paciente sofre de displasia broncopulmonar, doença do coração congênita, fibrose cística, e/ou imunodeficiência adquirida ou congênita. Em outro avanço específico, o paciente é um infante nascido prematuramente, um infante,
25 uma criança, um humano mais idoso, ou um humano em um grupo residencial, casa de enfermagem, ou algum outro tipo de instituição. A invenção também engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas dessa em pacientes que são susceptíveis a

reações adversas a terapias antiprotozoários convencionais para condições para as quais não há terapias disponíveis.

Os EphA2-BiTEs da invenção ou combinação de terapias da invenção podem ser usados em qualquer linha de terapia, incluindo mais não limitadas à primeira, segunda, terceira, quarta, ou quinta linha de terapia, para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintoma desta. A invenção também inclui métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas dessa em um paciente submetendo-se a terapias para outras doenças ou desordens. A invenção engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários, ou um ou mais sintomas dessa em um paciente antes que se desenvolvam quaisquer efeitos adversos ou intolerância a terapias outras que não EphA2-BiTEs da invenção. A invenção também engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários, ou um sintoma desta em pacientes refratários. Em certos avanços, um paciente com uma infecção por protozoários, é refratário à terapia quando a infecção não foi significativamente erradicada e/ou os sintomas não foram significativamente aliviados. A determinação de se um paciente é refratário pode ser feita tanto *in vivo* ou *in vitro* por qualquer método conhecido na arte para ensaiar a efetividade de um tratamento de infecções, usando significados de "refratário" em tal contexto aceito na arte. Em vários avanços, um paciente com uma infecção por protozoários é refratário quando a

replicação dos protozoários não foi diminuída ou foi aumentada. A invenção também engloba métodos de prevenir o começo ou recorrência de infecções de protozoários, em pacientes sob risco de desenvolver tais infecções. A
5 invenção também engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um sintoma desta em pacientes que são susceptíveis a reações adversas a terapias convencionais. A invenção engloba ainda métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar infecções de
10 protozoários, para as quais não há terapias antiprotozoários disponíveis.

A invenção engloba métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um sintoma desta
15 em um paciente que se provou refratário a terapias que não EphA2-BiTEs da invenção mas não estão mais nestas terapias. Em certos avanços, os pacientes sendo gerenciados ou tratados de acordo com os métodos desta invenção são pacientes já sendo tratados com antibióticos, antivirais,
20 antiprotozoários, ou outra terapia/imunoterapia biológica. Entre estes pacientes estão pacientes refratários, pacientes que são muito novos para terapias convencionais, e pacientes com infecções recorrentes de protozoários apesar do gerenciamento ou tratamento com terapias
25 existentes.

A presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas dessa como uma alternativa a outras

terapias convencionais. Em avanços específicos, o paciente sendo gerenciado ou tratado de acordo com os métodos da invenção é refratário a outras terapias ou é susceptível a reações adversas de tais terapias. O paciente pode ser uma

5 pessoa com um sistema imunológico suprimido (por exemplo, pacientes pós-operados, pacientes de quimioterapias, e pacientes com doença de imunodeficiência), uma pessoa com função renal ou do fígado comprometidas, os mais idosos, crianças, infantes, infantes nascidos prematuramente,

10 pessoas com desordens neuropsiquiátricas ou aquelas que tomam drogas psicotrópicas, pessoas com histórias de convulsão, ou pessoas sob medicação que teriam interação negativa com agentes convencionais usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma infecção fúngica ou um ou mais

15 sintomas desta.

Terapias de infecção por protozoários e suas dosagens, rotas de administração e uso recomendado são conhecidos na arte e foram descritos em tais literaturas como a

20 referência *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007).

Terapias Anti-Inflamatórias

Qualquer agente anti-inflamatório, incluindo agentes

25 úteis em terapias para desordens inflamatórias, bem bom conhecidas a um especialista na arte pode ser usado nas composições e métodos da invenção. Exemplos não limitantes de agentes anti-inflamatórios incluem drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs), drogas anti-

inflamatórias esteroidais, anticolinérgicos (por exemplo, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina, e brometo de ipratrópio (ATROVENT™)), agonistas beta2 (por exemplo, abuterol (VENTOLIN™ e PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™),
5 levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutlaine (BRETHAIRE™ e BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™, e VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™), e salmeterol (SEREVENT™ e SEREVENT DISKUS™)), e metilxantinas (por exemplo, teofilina
10 (UNIPHYL™, THEO-DUR™, SLO-BID™, e TEHO-42™)). Exemplos de NSAIDs incluem, mas não são limitados a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), cetoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DIAPRO™),
15 nabumetona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), cetoprofeno (ACTRON™) e nabumetona (RELAFEN™). Tais NSAIDs funcionam por inibir uma enzima ciclooxigenase (por exemplo, COX-1 e/ou COX-2). Exemplos de drogas anti-
20 inflamatórias esteroidais incluem, mas não são limitados a, glucocorticóides, dexametasona (DECADRON™), corticoesteróides (por exemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISON™ e DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ e
25 PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, e inibidores de eicosanóides (por exemplo, prostaglandinas, tromboxanos, e leucotrienos (por exemplo, montelukaste (SINGULAIR™), zafirlucaste (ACCOLATE™), pranlucaste (ONON™), ou zileutona (ZYFLO™)).

Terapias anti-inflamatórias e suas dosagens, rotas de administração, e uso recomendado são conhecidos na arte e foram descritos em tais literaturas como a referência
5 *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007).

Terapias Antivirais

Qualquer agente antiviral bem conhecido de um
10 especialista na arte pode ser usado nas composições e nos métodos da invenção. Exemplos não limitantes de agentes antivirais incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, anticorpos de proteínas fusionadas, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, e
15 pequenas moléculas que inibem e/ou reduzem a associação de um vírus ao seu receptor, a internalização de um vírus em uma célula, a replicação de um vírus, ou a liberação de vírus de uma célula. Em particular, agentes antivirais incluem, mas não são limitados a, análogos de nucleosídeos
20 (por exemplo, zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluoridina, e ribavirina), foscarneto, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, alfa-interferons e outros interferons, e AZT.

25 Em avanços específicos, o agente antiviral é um agente imunomodulatório que é imunoespecífico para um antígeno viral. Como usado aqui, o termo "antígeno viral" inclui, mas não é limitado a, qualquer peptídeo, polipeptídeo e proteína viral (por exemplo, HIV gp120, HIV nef,

glicoproteína RSV F, glicoproteína RSV G, neuraminidase de vírus influenza, hemaglutinina de vírus influenza, HTLV tax, glicoproteína de vírus herpes simplex (por exemplo, gB, gC, gD, e gE) e antígeno de superfície de hepatite B) que é capaz de eliciar uma resposta imunológica. Anticorpos úteis nesta invenção para o tratamento de uma infecção viral incluem, mas não são limitados a, anticorpos contra antígenos de vírus patogênicos, incluindo como exemplos e não por limitação: adenoviridae (por exemplo, mastadenovírus e aviadenovírus), herpesviridae (por exemplo, herpes simplex vírus 1, herpes simplex vírus 2, herpes simplex vírus 5, e herpes simplex vírus 6), leviviridae (por exemplo, levivírus, fago MS2 de enterobactéria, alolevírus), poxviridae (por exemplo, chordopoxvirinae, parapoxvírus, avipoxvírus, capripoxvírus, leporiipoxvírus, suipoxvírus, molluscipoxvírus, e entomopoxvirinae), papovaviridae (por exemplo, poliomavírus e papilomavírus), paramyxoviridae (por exemplo, paramixovírus, paravírus influenza 1, mobilivírus (por exemplo, vírus do sarampo), rubulavírus (por exemplo, vírus da caxumba), pneumonovirinae (por exemplo, pneumovírus, vírus sincicial respiratório humano), e metapneumovírus (por exemplo, pneumovírus aviário e metapneumovírus humano)), picornaviridae (por exemplo, enterovírus, rinovírus, hepatovírus (por exemplo, vírus da hepatite A humana, cardiovírus, e apthovírus), reoviridae (por exemplo, ortoreovírus, orbivírus, rotavírus, cipovírus, fijivírus, fitoreovírus, e orizavírus), retroviridae (por exemplo, retrovírus do tipo B de mamíferos, retrovírus do

tipo C de mamíferos, retrovírus do tipo C de aves, grupo de retrovírus do tipo B, retrovírus BLV-HTLV, lentivírus (por exemplo vírus 1 da imunodeficiência humana e vírus 2 da imunodeficiência humana), spumavírus), flaviviridae (por exemplo, vírus da hepatite C), hepadnaviridae (por exemplo, vírus da hepatite B), togaviridae (por exemplo, alfavírus (por exemplo, sindbis vírus) e rubivírus (por exemplo, vírus da rubéola)), rhabdoviridae (por exemplo, vesiculovírus, lissavírus, efemerovírus, citorabdovírus, e necleorabdovírus), arenaviridae (por exemplo, arenavírus, vírus da coriomeningite linfocítica, Ippy vírus, e lassa vírus), e coronaviridae (por exemplo, coronavírus e torovírus).

Exemplos específicos de anticorpos disponíveis úteis para o tratamento de uma infecção viral incluem, mas não são limitados a, PRO542 (Progenics) o qual é um anticorpo de fusão CD4 útil para o tratamento de infecção por HIV; Ostavir (*Protein Design Labs, Inc., CA*) o qual é um anticorpo humano útil para o tratamento de vírus da hepatite B; e Protovir (*Protein Design Labs, Inc., CA*) que é um anticorpo IgG1 humanizado útil para o tratamento de citomegalovírus (CMV); e palivizumab (SYNAGIS®; MedImmune, Inc.; *International Publication No. WO 02/43660*) que é um anticorpo humanizado útil para o tratamento de RSV.

Em um avanço específico, os agentes antivirais usados nas composições e métodos da invenção inibem ou reduzem uma infecção por vírus, inibem ou reduzem a replicação de um

vírus que causa uma infecção, ou inibem ou reduzem a disseminação de um vírus que causa uma infecção a outras células ou sujeitos. Em outro avanço específico, os agentes antivirais usados nas composições e métodos da invenção

5 inibem ou reduzem infecção por RSV, hMPV, ou PIV, inibem ou reduzem a replicação de RSV, hMPV, ou PIV, ou inibem ou reduzem a disseminação de RSV, hMPV, ou PIV a outras células ou sujeitos. Exemplos de tais agentes e métodos de tratamento de infecções por RSV, hMPV, e/ou PIV incluem,

10 mas não são limitados a, análogos de nucleosídeos, como, por exemplo, zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, e ribavirina, assim como foscarneto, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, e os alfa-interferons. Ver *U.S. Prov. Patent App. No. 60/398,475* registrada em 25 de julho de 2002, intitulado "*Methods of Treating and Preventing RSV, HMPV, and PIV Using Anti-RSV, Anti-HMPV, and Anti-PIV Antibodies*", e *U.S. Patent App. No. 10/371.122* registrada em 21 de fevereiro de 2003, as quais são incorporadas aqui

15 por referência em sua íntegra.

20

Em avanços específicos, a infecção viral é por RSV e o anti-antígeno viral é um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um antígeno de RSV. Em certos

25 avanços, o anticorpo anti-antígeno de RSV se liga imunoespecificamente a um antígeno do RSV do Grupo A de RSV. Em outros avanços, o anticorpo anti-antígeno de RSV se liga imunoespecificamente a um antígeno do RSV do Grupo B de RSV. Em outros avanços, um anticorpo se liga a um

antígeno de RSV de um Grupo e reage de forma cruzada como antígeno análogo do outro Grupo. Em avanços particulares, o anticorpo anti-antígeno de RSV se liga imuno especificamente a uma nucleoproteína de RSV, fosfoproteína de RSV, proteína de matriz do RSV, pequena proteína hidrofóbica do RSV, polimerase dependente de RNA do RSV, proteína RSV F, e/ou proteína RSV G. Em avanços adicionais específicos, o anticorpo anti-antígeno de RSV liga-se a variantes alélicas de uma nucleoproteína de RSV, uma proteína de nucleocapsídeo do RSV, uma fosfoproteína do RSV, uma proteína de matriz do RSV, uma glicoproteína de adesão do RSV, uma glicoproteína de fusão do RSV, uma proteína do nucleocapsídeo do RSV, uma proteína de matriz do RSV, uma pequena proteína hidrofóbica do RSV, uma polimerase dependente de RNA do RSV, uma proteína RSV F, uma proteína RSV L, uma proteína RSV P, e/ou uma proteína RSV G.

Deve ser reconhecido que anticorpos ligam-se imuno especificamente a um antígeno do RSV são conhecidos na arte. Por exemplo, palivizumab (SYNAGIS®) é um anticorpo monoclonal humanizado presentemente usado para a prevenção de infecção por RSV em pacientes pediátricos. Em um avanço específico, um anticorpo a ser usado com os métodos da presente invenção é palivizumab ou um fragmento ligante de anticorpo deste (por exemplo, um fragmento contendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e preferencialmente, o domínio variável de palivizumab). A sequência de aminoácidos de palivizumab é descrita, por exemplo, em Johnson et al., 1997, J. Infection 176:1215-

1224, e U.S. Patent No. 5,824,307 e International Application Publication No.: WO 02/43660, intitulada "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment", por Young et al., as quais são
5 incorporadas aqui por referência em sua íntegra.

Um ou mais anticorpos ou fragmentos ligantes de antígeno destes que se ligam imunoesspecificamente a um antígeno do RSV compreendem um domínio Fc com uma afinidade maior pelo receptor FcRn do que o domínio Fc de palivizumab também podem ser usados de acordo com a invenção. Tais anticorpos são descritos em U.S. Pat. Appn. No. 10/020,354, registrada em 12 de dezembro de 2001, que é incorporado aqui por referência em sua íntegra. Adicionalmente, um ou
10 mais dos anticorpos anti-antígeno do RSV A4B4; P12f2 P12f4; P11d4; Ale9; A12a6; A13c4; A17d4; A4B4; 1X-493L1; FR H3-3F4; M3H9; Y10H6; DG; AFFF; AFFF(1); 6H8; L1-7E5; L2-15B10; A13a11; A1h5; A4B4(1); A4B4-F52S; ou A4B4L1FR-S28R podem ser usados de acordo com a invenção. Estes anticorpos são
15 descritos em International Application Publication No.: WO 02/43660, intitulada "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment", por Young et al., e US Provisional Patent Application 60/398.475 registrada em 25 de julho de 2002, intitulada "Methods of
20 Treating and Preventing RSV, HMPV, and PIV Using Anti-RSV, Anti-HMPV, and Anti-PIV Antibodies" as quais são incorporadas aqui por referência em sua íntegra.

Em certos avanços, os anticorpos anti-antígeno do RSV são os anticorpos anti-antígeno do RSV de ou são preparados pelos métodos de *U.S. Application No: 09/724,531*, registrada em 28 de novembro de 2000; *09/996,288*,
5 registrada em 28 de novembro de 2001; e *U.S. Pat. Publication No. US2003/0091584 A1*, publicada em 15 de maio de 2003, todas intituladas "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment", por Young et al., os quais são incorporados aqui por referência
10 em suas totalidades. Métodos e composições para formulações estabilizadas de anticorpos que podem ser usados nos métodos da presente invenção são descritos em *U.S. Provisional Application Nos. 60/388.921*, registrada em 14 de junho de 2002, e *60/388.920*, registrada em 14 de junho
15 de 2002, as quais são incorporadas aqui por referência em sua íntegra.

Terapias antivirais e suas dosagens, rotas de administração e uso recomendado são conhecidos na arte e
20 foram descritos em tais literaturas como a referência *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007). Informações adicionais sobre infecções virais respiratórias estão disponíveis em *Cecil Textbook of Medicine* (18th edition, 1988).

25

Terapias Antibacterianas

Agentes antibacterianos e terapias bem conhecidas a um especialista na arte para o tratamento, prevenção e/ou

gerenciamento de infecções bacterianas podem ser usados nas composições e métodos da invenção. Exemplos não limitantes de agentes antibacterianos incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, proteínas de fusão, anticorpos, 5 moléculas de ácidos nucleicos, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, e pequenas moléculas que inibem ou reduzem uma infecção bacteriana, inibem ou reduzem a replicação de bactérias, ou inibem ou reduzem a disseminação de bactérias para outros sujeitos. Em 10 particular, exemplos de agentes antibacterianos incluem, mas não são limitados a, penicilina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, estreptomicina, tobramicina, gentamicina, amicacina, 15 canamicina, neomicina, spectinomomicina, trimetoprim, norfloxacin, rifampina, polimixina, amfotericina B, nistatina, cetoconazol, isoniazida, metronidazol, e pentamidina.

20 Em um avanço preferido, o agente antibacteriano é um agente que inibe ou reduz a infecção bacteriana, inibe ou reduz a replicação de uma bactéria que causa uma infecção, ou inibe ou reduz a disseminação de uma bactéria que causa uma infecção para outros sujeitos. Em casos nos quais a 25 infecção bacteriana é uma infecção por micoplasma (por exemplo, faringite, traqueobronquite, e pneumonia), o agente antibacteriano é preferencialmente uma tetraciclina, eritromicina, ou espectinomomicina. Em casos nos quais a infecção bacteriana é tuberculose, o agente antibacteriano

é preferencialmente, rifampicina, isonaizida, piranazinamida, etambutol, e estreptomicina.

Terapias antibacterianas e suas dosagens, rotas de administração e uso recomendado são conhecidas na arte e foram descritos em tais literaturas como a *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007). Informações adicionais sobre infecções respiratórias e terapias antibacterianas estão disponíveis em *Cecil Textbook of Medicine* (18th edition, 1988).

5.4.2.7 Terapias Antifúngicas

Agentes antifúngicos e terapias bem conhecidas a um especialista na arte para tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção fúngica ou um ou mais sintomas dessa (por exemplo, uma infecção respiratória por fungos) podem ser usados nas composições e métodos da invenção. Exemplos não limitantes de agentes antifúngicos incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, proteínas de fusão, anticorpos, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, e pequenas moléculas que inibem e/ou reduzem infecção fúngica, inibe e/ou reduz a replicação de fungos, ou inibe e/ou reduz a disseminação de fungos para outros sujeitos. Exemplos específicos de agentes antifúngicos incluem, mas não são limitados a, drogas azóis (por exemplo, miconazol, cetoconazol (NIZORAL®), acetato de caspofungina (CANCIDAS®), imidazol, triazóis (por exemplo, fluconazol (DIFLUCAN®)), e

itraconazol (SPORANOX®)), polieno (por exemplo, nistatina, anfotericina B (FUNGOSZONE®), complexo lipídico de anfotericina B ("ABLC") (ABELCET®), dispersão coloidal de anfotericina B ("ABCD") (AMPHOTEC®), anfotericina B lipossomal (AMBISONE®)), iodeto de potássio (KI), pirimidinas (por exemplo, flucitosina (ANCOBON®)), e voriconazol (VFEND®). Ver, por exemplo, Tabela 3, *infra* para uma lista de agentes antifúngicos específicos e suas dosagens recomendadas.

10

Tabela 3. Agentes antifúngicos

Agente antifúngico	Dosagem
Anfotericina B ABELCET® (injeção de complexo lipídico) AMBISOME® (injeção de lipossomas) AMPHOTEC® (complexo ara injeção)	5 mg/kg/dia 3 - 5 mg/kg/dia 3 - 4 mg/kg/dia
Acetato de caspofungina (CANCIDAS®)	70 mg no dia um seguido por 50 mg/dia
Fluconazol (DIFLUCAN®)	até 400 mg/dia (adultos) até 12 mg/kg/dia (crianças)
Itraconazol (SPORANOX®)	200 - 400 mg/dia
Flucitosina (ANCOBON®)	50 - 150 mg/kg/dia em doses divididas a cada 6 horas

Agente antifúngico	Dosagem
Nistatina Lipossomal	1 - 4 mg/kg
Cetoconazol (NIZORAL®)	dose diária única de até 200 mg 400 mg/dia em duas doses divididas (adultos) 3,3 - 6,6 mg/kg/dia para crianças com 2 anos de idade ou mais velhas
Voriconazol (VFEND®)	6 mg/kg i.v. carga de dosagem a cada 12 horas para duas doses, seguido por dose de manutenção de 4 mg/kg i.v. a cada 12 horas, então dose de manutenção oral com tabletes de 200 - 100 mg

Em certos avanços, o agente antifúngico é um agente que inibe ou reduz uma infecção fúngica, inibe ou reduz a replicação de um fungo que causa uma infecção, ou inibe ou

5 reduz a disseminação de um fungo que causa uma infecção para outros sujeitos. Em casos nos quais a infecção fúngica é *Blastomyces dermatitidis*, o agente antifúngico é preferencialmente itraconazol, anfotericina B, fluconazol, ou cetoconazol. Em casos nos quais a infecção fúngica é

10 aspergiloma pulmonar, o agente antifúngico é preferencialmente anfotericina B, anfotericina B lipossomal, itraconazol, ou fluconazol. Em casos nos quais

a infecção fúngica é histoplasmose, o agente antifúngico é preferencialmente anfotericina B, itraconazol, fluconazol, ou cetoconazol. Em casos nos quais a infecção fúngica é coccidioidomicose, o agente antifúngico é preferencialmente
5 fluconazol ou anfotericina B. Em casos nos quais a infecção fúngica é criptococose, o agente antifúngico é preferencialmente anfotericina B, fluconazol, ou combinação dos dois agentes. Em casos nos quais a infecção é cromomicose, o agente antifúngico é preferencialmente
10 itraconazol, fluconazol, ou flucitosina. Em casos nos quais a infecção fúngica é mucormicose, o agente antifúngico é preferencialmente anfotericina B ou anfotericina B lipossomal. Em casos nos quais a infecção fúngica pulmonar ou respiratória é pseudoallesqueríase, o agente antifúngico
15 é preferencialmente itraconazol ou miconazol.

Terapias antifúngicas e suas dosagens, rotas de administração, e uso recomendado são conhecidos na arte e foram descritos em tais literaturas como, por exemplo,
20 Dodds et al., 2000 *Pharmacotherapy* 20(11) 1335-1355, o *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007) e o *Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (17th edition, 1999).

Terapias Antiprotozoários

25

Agentes antiprotozoários e terapias bem conhecidas a um especialista na arte para tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma infecção por protozoários ou um ou mais sintomas dessa (por exemplo, uma infecção respiratória

associada a uma infecção por protozoários) podem ser usados nas composições e métodos da invenção. Exemplos não limitantes de agentes antiprotozoários incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, proteínas de fusão, anticorpos, 5 moléculas de ácidos nucleicos, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, e pequenas moléculas que inibem e/ou reduzem uma infecção por protozoários, inibe e/ou reduz a replicação de protozoários, ou inibe e/ou reduz a disseminação de protozoários para outros sujeitos. Exemplos 10 específicos de agentes antiprotozoários incluem, mas não são limitados a, fosfato de cloroquina (Aralen™); sulfato de quinina mais um dentre os seguintes: doxociclina, tetraciclina, ou clindamicina; atovaquone-proguanil (Malarone™); Mefloquina (Lariam™); metronidazol (Flagyl); 15 tinidazol (Tindamax); 5-nitroimidazol (ornidazole), e agentes descritos em U.S. Patent No. 6,440,936.

Em certos avanços, o agente antiprotozoário é um agente que inibe ou reduz uma infecção por protozoários, 20 inibe ou reduz a replicação de um protozoário que causa uma infecção, ou inibe ou reduz a disseminação de um protozoário que causa uma infecção em outros sujeitos. Em casos nos quais a infecção por protozoários é tricomoniase, o agente antiprotozoário é preferencialmente metronidazol 25 (Flagyl), tinidazol (Tindamax), ou 5-nitroimidazol (ornidazole). Em casos nos quais a infecção por protozoários é malária, o agente antiprotozoários é preferencialmente fosfato de cloroquina (Aralen™); sulfato de quinina mais uma dentre os seguintes: doxociclina,

tetraciclina, ou clindamicina; gluconato de quinidina mais uma dentre os seguintes: dociciclina, tetraciclina, ou clindamicina; Fansidar™; Malarone™ (250 mg de atovaquona mais 100 mg de proguanil); ou Mefloquina (Larium™).

5

Terapias antiprotozoários e suas dosagens, rotas de administração, e uso recomendado são conhecidos na arte e foram descritos em tais literaturas como, por exemplo, Dodds et al., 2000 *Pharmacotherapy* 20 (11) 1335-1355, o

10 *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007); o *Merk Manual of Diagnosis and Therapy* (17th edition, 1999); e publicações fornecidas pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC; <http://www.cdc.gov>) (Atlanta, GA).

15

Atividade Biológica dos EphA2-BiTEs

Vários testes *in vitro* e *in vivo* conhecidos na arte e descritos em detalhes abaixo na Seção 6 podem ser usados para determinar a atividade biológica dos EphA2-BiTEs

20 produzidos pelos métodos da invenção. Tais testes *in vitro* e *in vivo* permitem o for filtração e identificação dos EphA2-BiTEs com atividades biológicas desejadas como, por exemplo, especificidade de célula alvo e lise eficiente de ditas células. Em particular, a invenção provê métodos para

25 determinar a especificidade de célula alvo (por exemplo, a habilidade dos EphA2-BiTEs de ligarem-se imunoespecificamente a células que expressam EphA2) usando vários testes imunológicos. As características de ligação dos EphA2-BiTEs da invenção também podem ser determinadas,

usando por exemplo, ressonância de *plasmon* de superfície para identificar as constantes de afinidade (K_D , K_{on} e K_{off}) dos EphA2-BiTEs produzidos pelos métodos da invenção. A presente invenção ainda provê testes que podem ser usados

5 para filtrar os EphA2-BiTEs com atividades biológicas específicas, como, por exemplo, a habilidade de ligar-se a células alvo (por exemplo, células tumorais que apresentam expressão aumentada de EphA2) para mediar lise *in vitro* usando vários testes de citotoxicidade. Tais testes podem

10 ser usados para determinar a toxicidade e eficácia dos EphA2-BiTEs da invenção (por exemplo, para determinar a dose letal para 50% da população de células tratadas com os EphA2-BiTEs (LD_{50})). Também fornecidos são testes que podem ser usados para determinar a habilidade dos EphA2-BiTEs da

15 invenção para mediar a morte de células tumorais *in vivo* usando modelos animais.

Testes para determinar a especificidade de célula alvo

20 Vários testes conhecidos para um especialista na arte podem ser usados para determinar a habilidade dos EphA2-BiTEs da invenção de ligarem-se imunoespecificamente a células expressando EphA2 e CD3 (por exemplo, células que apresentam expressão aumentada de EphA2 ou células nas

25 quais certos epitopos de EphA2 são seletivamente expostos). Tais testes incluem, por exemplo, testes de RIAs, ELISA, *Western Blot*, imunohistoquímica, imunofluorescência e citometria de fluxo. Por exemplo, como descrito na Seção 6.2.3 abaixo, testes baseados em citometria de fluxo podem

ser usados para determinar a ligação celular biespecífica dos vários constructos EphA2-BiTE. Linhagens celulares positivas para EphA2, como, por exemplo, células A549 (células de carcinoma de pulmão humanas) e células MDA-MB-
5 231 (células de câncer da mama humanas) podem ser usadas como células alvo, e células HP-Ball positivas para CD3 (linhagem de células T humanas) podem ser usadas como células efetoras. As células podem ser misturadas juntas e incubadas com um EphA2-BiTE de interesse. Citometria de
10 fluxo pode ser usada para determinar as intensidades de ligação para cada célula alvo positiva para EphA2.

Análises de exclusão de epitopos podem ser conduzidas usando marcação de imunofluorescência para determinar se os
15 EphA2-BiTEs produzidos pelos métodos da invenção retêm exclusão de epitopo como os anticorpos parentais dos quais eles são derivados. Ver Seção 6.2.4 abaixo.

Testes de ressonância de plasmon de superfície

20

Testes de ressonância de plasmon de superfície podem ser executados para determinar as características de ligação dos EphA2-BiTEs da invenção. As constantes de afinidade e dissociação assim como as taxas de associação e
25 dissociação (k_a , k_D , k_{on} e k_{off}) dos EphA2-BiTEs produzidos pelos métodos da invenção podem ser identificadas usando este teste. Ver, por exemplo, 6.8.3 abaixo. Por exemplo, testes de ressonância de plasmon de superfície podem ser executados usando o Sensor Chip CM5 (Biacore AB, Uppsala,

Suécia) que contém uma matriz dextrana de carboximetila (CM) e um bio-sensor de ressonância de plasmon de superfície Biacore® 3000 (SPR) (Biacore AB, Uppsala, Suécia). CD3 ϵ γ é covalentemente associada à matriz dextrana de CM usando acoplamento químico por amina. Uma superfície de referência é criada por omissão do passo de acoplamento do CD3 ϵ γ . Um EphA2-Fc é capturado via uma interação de alta afinidade entre a porção Fc de EphA2Fc e a (Fc) de cabra anti-IgG humana (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). (Fc) de cabra anti-IgG humana é associada covalentemente à matriz dextrana de CM usando acoplamento químico por amina. Duas superfícies específicas para (Fc) anti-IgG humana são então criadas. Uma destas superfícies é usada como uma superfície de referência enquanto a outra superfície é usada para criar uma superfície específica para Fc de EphA2. Concentrações diferentes de bscEphA2 x CD3 são então preparadas por diluição serial em HBS-EP (HEPES a 0,01 M pH 7,4, NaCl a 0,15 M, EDTA a 3 mM, surfactante P20 a 0,005%). EphA2-BiTEs são injetados de uma maneira fluxo-serial através da superfície específica para CD3 ϵ γ ou específica para EphA2 e sua superfície de referência correspondente. Dissociação de EphA2-BiTEs ligados é monitorada na presença de HBS-EP. Material ligado remanescente foi removido com 10 mM tetraborato dissódico pH 8,5, NaCl a 1 M (para superfície específica para CD3 ϵ γ) ou glicina a 10 mM pH 1,7 (para superfície específica para Fc de EphA2).

Testes de citotoxicidade

Como ilustrado na Seção 6.3.1 abaixo, testes de citotoxicidade de células redirecionadas baseados em citometria de fluxo podem ser executados para determinar a atividade citotóxica de EphA2-Bite com doadores de células efetoras. Por exemplo, células mononucleares de sangue periférico humanas enriquecidas em células T CD3+ ("PBMCs") podem ser isoladas de doadores saudáveis. Células alvo, por exemplo, células expressando EphA2, são etiquetadas com um corante fluorescente de membrana como, por exemplo, (DiOC18 (3) ou "DiO"). As células são incubadas juntamente com um EphA2-BiTE de interesse e são analisadas por citometria de fluxo após a adição de iodeto de propídio (PI). A lise celular dos alvos pode então ser calculada como a porcentagem de células positivas para DiO coradas positivas para PI.

Em um avanço específico, um EphA2-BiTE da invenção medeia a lise de células associadas com expressão e/ou atividade aberrante de EphA2 (por exemplo, células de câncer, células hiperproliferativas não cancerosas ou células infectadas que expressam EphA2). De acordo com este avanço, tais células são reduzidas em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% ou pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 3,5 vezes, pelo menos 4

vezes, pelo menos 4,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 7 vezes ou pelo menos 10 vezes em relação ao nível de células normais da mesma linhagem celular ou sujeito, células de um sujeito normal, saudável e/ou uma população
5 de células normais, saudáveis. Em outro avanço específico, os EphA2-BiTEs não medeiam a lise de células de tecidos normais ou células normais de tecidos de um sujeito saudável ou controle.

10 A atividade biológica (por exemplo, anticâncer, anti-hiperproliferação, ou anti-atividades infectivas) das terapias usadas de acordo com a presente invenção também podem ser determinadas pelo uso de vários modelos animais experimentais para o estudo do câncer como, por exemplo, o
15 modelo de camundongo SCID ou camundongo transgênico onde um EphA2 de camundongo é substituído pelo EphA2 de humano, camundongos *nude* com xenoimplantes humanos, modelos animais descritos na Seção 6 *infra*, ou qualquer modelo animal (incluindo hamsters, coelhos, etc.) conhecidos na arte e
20 descritos em *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig e Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven e Winograd); e *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher), aqui incorporados por
25 referência em suas totalidades.

Em avanços específicos, os efeitos citotóxicos dos EphA2-BiTEs da invenção também podem ser testados *in vivo* com um modelo de camundongo como, por exemplo, a

imunodeficiência severa combinada não diabética (NOD/SCID) modelo de camundongo usando um xenoimplante tumoral como, por exemplo, a linhagem celular SW480 de carcinoma de cólon humano. A linhagem celular SW480 pode ser selecionada para
5 estabelecimento de um modelo de xenoimplante humano porque as células SW480 expressam EphA2. Brevemente, animais podem ser injetados com uma mistura de células alvo (por exemplo, células SW480) e efetoras (células T CD3+ humanas de doadores saudáveis) ou uma célula alvo sozinha sem células
10 efetoras. A cinética de crescimento tumoral pode ser medida entre os dois grupos de tratamentos. Ver, por exemplo, Seção 6.4.1 abaixo.

Conformemente, a toxicidade e eficácia dos protocolos
15 profiláticos e/ou terapêuticos da presente invenção podem ser determinados por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinar o LD₅₀ (a dose letal para 50% da população) e o ED₅₀ (a dose terapeuticamente efetiva em 50% da
20 população). Uma razão de dose entre os efeitos tóxico e terapêutico é o índice terapêutico, e ele pode ser expresso como a razão LD₅₀/ED₅₀. Agentes profiláticos e/ou terapêuticos que exibem altos índices terapêuticos são preferidos. Enquanto agentes profiláticos e/ou terapêuticos
25 que exibem efeitos colaterais tóxicos podem ser usados, cuidado deve ser tomado para projetar um sistema de entrega que direcione tais agentes ao sítio do tecido afetado de modo a minimizar o dano potencial a células não infectadas e, assim, reduzir os efeitos colaterais. Exemplos

específicos de métodos a atividade biológica dos EphA2-BiTEs da invenção também são fornecidos na Seção 6 dos Exemplos, *infra*.

5 Os dados obtidos de testes de cultura de células e estudos animais podem ser usados na formulação de uma escala de dosagem dos agentes profiláticos e/ou terapêuticos para uso em humanos. A dosagem de tais agentes repousa preferencialmente dentro de uma escala de concentrações de circulação que incluem o ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta escala dependendo da forma de dosagem empregada e a rota de administração utilizada. Para qualquer agente usado no método da invenção, a dose terapeuticamente efetiva pode ser estimada inicialmente a partir de testes de cultura de células. A dose pode ser formulada em modelos animais para alcançar uma escala de concentração de circulação no plasma que inclui o IC₅₀ (isto é, a concentração do componente testado que alcança a metade da inibição máxima dos sintomas) como determinado em cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinar mais acuradamente doses úteis em humanos. Níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta performance.

25 Compostos para uso em terapias podem ser testados em sistemas de modelo animal adequados antes de testar em humanos, incluindo mais não limitadas a em ratos, camundongos, galinhas, vacas, macacos, coelhos, hamsteres, etc., por exemplo, os modelos animais descritos acima. Os

compostos podem então ser usados nos testes clínicos apropriados.

Adicionalmente, quaisquer testes conhecidos daqueles
5 especialistas na arte podem ser usados para avaliar a
utilidade profilática e/ou terapêutica das terapias
combinatórias aqui descritas para tratamento ou prevenção
de uma desordem associada com expressão e/ou atividade
aberrante de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem
10 celular não hiperproliferativa ou uma infecção).

Composições

A presente invenção provê composições compreendendo um
15 ou mais dos EphA2-BiTEs da invenção. As composições da
invenção também incluem composições de drogas em larga
escala úteis na manufatura de composições farmacêuticas
(por exemplo, composições impuras ou não estéreis) e
composições farmacêuticas (isto é, composições que são
20 adequadas para administração para um sujeito ou paciente)
que podem ser usadas na preparação de formas de dosagem
unitárias. Tais composições compreendem a quantidade
profilaticamente ou terapeuticamente efetiva de um agente
profilático e/ou terapêutico descrito aqui ou uma
25 combinação destes agentes e um carregador farmacêuticamente
aceitável. Preferencialmente, composições da invenção
compreendem a quantidade profilaticamente ou
terapeuticamente efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da
invenção e um carregador farmacêuticamente aceitável. Em um

avanço adicional, a composição da invenção compreende ainda uma terapia adicional que não é um EphA2-BiTE.

Em um avanço específico, o termo "farmaceuticamente
5 aceitável" significa aprovado por uma agência regulatória de um governo federal ou estadual ou listado na *U.S. Pharmacopeia* ou outra farmacopéia geralmente reconhecida para o uso em animais, e mais particularmente em humanos. O termo "carregador" refere-se a um diluente, excipiente, ou
10 veículo com o qual a terapêutica é administrada. Tais carregadores farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, como, por exemplo, água e óleos, incluindo aqueles de petróleo, origem animal, sintética ou vegetal, como, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo
15 de gergelim e os semelhantes. Água é um carregador preferível quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. Soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol também podem ser empregadas como carregadores líquidos, particularmente para soluções
20 injetáveis. Excipientes farmacêuticos adequados incluem o amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de silicone, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e os
25 semelhantes. A composição, se desejada, também pode conter pequenas quantidades de agentes umedecedores ou emulsionantes, ou agentes tamponantes de pH. Estas composições podem pegar a forma de soluções, suspensões,

emulsão, tabletes, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação prolongada e as semelhantes.

Geralmente, os ingredientes das composições da invenção são fornecidos ou separadamente ou misturados juntos em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó seco liofilizado ou concentrado livre de água em contêiner hermeticamente selado como, por exemplo, uma ampola ou sachê indicando a quantidade do agente ativo.

10 Onde a composição é para ser administrada por infusão, ela pode ser administrada com uma garrafa de infusão contendo água ou salina estéril de grau farmacêutico. Onde a composição é administrada por injeção, uma ampola para injeção de água estéril ou salina pode ser empregada de

15 modo que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

As composições da invenção podem ser formuladas como formas neutras ou salinas. Sais farmaceuticamente

20 aceitáveis incluem aqueles formados com ânions como, por exemplo, aqueles derivados de ácidos hidrolórico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., e aqueles formados com cátions como, por exemplo, aqueles derivados de sódio, potássio, amônia, cálcio, hidróxidos de ferro,

25 isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Vários sistemas de entrega são conhecidos e podem ser usados para administrar um EphA2-BiTE da invenção ou a

combinação de um EphA2-BiTE da invenção e um agente profilático ou agente terapêutico útil para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou
5 atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), por exemplo, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar o anticorpo ou fragmento de anticorpo (ver, por exemplo, Wu e Wu, 1987, *J. Biol.*
10 *Chem.* 262:4429-4432), construção de um ácido nucléico como parte de um vetor retroviral ou outro, etc. Métodos para administrar um agente profilático ou terapêutico da invenção incluem, mas não são limitados a, administração parenteral (por exemplo, intradermal, intramuscular,
15 intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), epidural, e mucosal (por exemplo, intranasal, inalada, e rotas orais). Em um avanço específico, agentes profiláticos ou terapêuticos da invenção são administrados intramuscularmente, intravenosamente, ou subcutaneamente.
20 Os agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser administrados por qualquer rota conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bolo, por absorção através das linhas epitelial ou mucocutânea (por exemplo, mucosa oral, retal e mucosa intestinal, etc.) e podem ser administrados
25 juntos com outros agentes biologicamente ativos. Administração pode ser sistêmica ou local.

Em um avanço específico, pode ser desejável a administração dos agentes profiláticos ou terapêuticos da

invenção localmente na área em necessidade de tratamento; isto pode ser alcançado, por exemplo, e não por meio de limitação, por infusão local, por injeção, ou por meio de um implante, dito implante sendo de um material poroso, não
5 poroso, ou gelatinoso, incluindo membranas, como, por exemplo, membranas sialásticas, ou fibras.

Em ainda outro avanço, o agente profilático ou terapêutico pode ser entregue em uma liberação controlada
10 ou sistema de liberação prolongado. Em um avanço, uma bomba pode ser usada para alcançar liberação controlada ou prolongada (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). Em outro
15 avanço, materiais poliméricos podem ser usados para alcançar liberação controlada ou prolongada dos EphA2-BiTEs da invenção ou fragmentos destes (ver por exemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug*
20 *Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger e Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; ver também Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J.*
25 *Neurosurg.* 71:105); *U.S. Patent Nos.* 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; 5.128.326; *International Publication Nos.* WO 99/15154 e WO 99/20253. Exemplos de polímeros usados em formulações de liberação prolongada incluem, mas não são limitados a, poli (2-hidroxi metacrilato de etila),

poli (metacrilato de metila), poli (ácido acrílico), poli (acetato de etileno-co-vinila), poli (ácido metacrílico), poliglicolídeos (PLG), polianidridos, poli (pirrolidona de N-vinila), poli (álcool de vinila), poliacrilamida, poli (etileno glicol), polilactídeos (PLA), poli (lactídeo-co-glicolídeos) (PLGA), e poliortoésteres. Em um avanço preferido, o polímero usado na formulação de liberação prolongada é inerte, livre de impurezas lixiviadas, estável em estoque, estéril, e biodegradável. Em ainda
10 outro avanço, o sistema de liberação controlada ou prolongada pode ser colocado em proximidade com o alvo profilático ou terapêutico, assim requerendo apenas uma fração da dose sistêmica (ver, por exemplo, Goodson, em *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2,
15 pp. 115-138 (1984)).

Sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Qualquer técnica conhecida para um especialista na arte pode ser
20 usada para produzir formulações de liberação prolongada compreendendo um ou mais agentes terapêuticos da invenção. Ver, por exemplo, U.S. Patent No. 4.526.938; *International Publication* N^{os}. WO 91/05548 e WO 96/20698; Ning et al., 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song et al.,
25 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; e Lam et al., 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, cada qual sendo incorporado aqui por referência em sua íntegra.

Formulações

Composições farmacêuticas para uso de acordo com a
5 presente invenção podem ser formuladas de maneira
convencional usando um ou mais carregadores ou excipientes
fisiologicamente aceitáveis.

Assim, os EphA2-BiTEs da invenção e seus sais e
10 solventes fisiologicamente aceitáveis podem ser formulados
para administração por inalação ou insuflação (seja pela
boca ou o nariz) ou administração oral, parenteral ou
mucosal (como, por exemplo, bocal, vaginal, retal,
sublingual). Em um avanço preferido, administração local ou
15 sistêmica parenteral é usada.

Para administração oral, as composições farmacêuticas
podem tomar a forma de, por exemplo, tabletes ou cápsulas
preparadas por meios convencionais com excipientes
20 farmaceuticamente aceitáveis como, por exemplo, agentes
ligantes (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado,
polivinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose);
enchedores (por exemplo, lactose, celulose microcristalina
ou hidrogênio fosfato de cálcio); lubrificantes (por
25 exemplo, estearato de magnésio, talco ou sílica);
desintegrantes (por exemplo, amido de batata ou amido
glicolato de sódio); ou agentes umidificantes (por exemplo,
lauril sulfato de sódio). Os tabletes podem ser recobertos
por métodos bem conhecidos na arte. Preparações líquidas

para administração oral podem tomar a forma de, por exemplo, soluções, xaropes ou suspensões, ou eles podem ser apresentados como um produto seco para constituição na água ou outro veículo adequado antes do uso. Tais preparações

5 líquidas podem ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmacêuticamente aceitáveis como, por exemplo, agentes suspensores (por exemplo, xarope sorbitol, derivados de celulose ou gorduras hidrogenadas comestíveis); agentes emulsionantes (por exemplo, lecitina

10 ou acácia); veículos não aquosos (por exemplo, óleo de amêndoas, ésteres oleosos, álcool etílico ou óleos vegetais fracionados); e preservativos (por exemplo, metil ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). As preparações também podem conter sais tamponantes, agentes saborosos,

15 corantes e adoçantes como apropriado.

Preparações para administração oral podem ser apropriadamente formuladas para dar a liberação controlada do composto ativo.

20

Para administração oral as composições podem tomar a forma de tabletes ou losangos formulados de maneira convencional.

25 Para administração por inalação, os agentes profiláticos ou terapêuticos para uso de acordo com a presente invenção são convenientemente entregues na forma de uma apresentação em pulverizador aerossol de pacotes pressurizados ou um nebulizador, com o uso de um propelente

adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada ao se providenciar que a válvula entregue uma quantidade mensurada. Cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formulados contendo uma mistura de pós do composto e um pó base adequado como, por exemplo, lactose ou amido.

10

Os agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser formulados para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolo ou infusão contínua. Formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes multi-dose, com um preservativo adicionado. As composições podem tomar tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes formuladores como, por exemplo, agentes de suspensão, estabilizantes ou dispersores. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água estéril livre de pirógenos, antes do uso.

20

Os agentes profiláticos ou terapêuticos também podem ser formulados em composições retais como, por exemplo, supositórios ou ênemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositórios convencionais como, por exemplo, manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

25

Em adição às formulações descritas previamente, os agentes profiláticos ou terapêuticos também podem ser formulados como uma preparação para depósito. Tais formulações de longa atividade podem ser administradas por 5 implantação (por exemplo, subcutaneamente ou intramuscularmente) ou por injeção intramuscular. Assim, por exemplo, os agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser formulados com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo 10 aceitável) ou resinas de troca iônica, ou como derivativos frugalmente solúveis, por exemplo, como uma sal frugalmente solúvel.

15 A invenção também provê que um agente profilático ou terapêutico é empacotado em um contêiner hermeticamente selado como, por exemplo, uma ampola ou sachê indicando a quantidade. Em um avanço, o agente profilático ou terapêutico é fornecido com um pó seco liofilizado 20 esterilizado ou concentrado livre de água em um contêiner hermeticamente selado e pode ser reconstituído, por exemplo, com água ou saline para a concentração adequada para administração para um sujeito.

25 Em um avanço preferido da invenção, a formulação e administração de vários agentes quimioterapêutico, biológico/imunoterapêutico e hormonal são conhecidos na arte e com frequência descritos na referência *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007). Por exemplo, em certos

avanços específicos da invenção, o agente terapêutico da invenção pode ser formulado e fornecido como mostrado na Tabela 2.

5 Em outros avanços da invenção, agentes terapêuticos radioativos como, por exemplo, isótopos radioativos podem ser dados oralmente como líquidos em cápsulas ou como uma bebida. Isótopos radioativos também podem ser formulados para injeções intravenosas. O oncologista especialista pode
10 determinar a formulação preferida e rota de administração.

Em certos avanços os EphA2-BiTEs da invenção, são formulados em 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, e 25 mg/ml para injeções intravenosas e em 5 mg/ml, 10 mg/ml, e 80 mg/ml
15 para administração subcutânea repetida e injeção intramuscular.

As composições podem ser, se desejado, apresentadas em um pacote ou dispositivo distribuidor que pode conter uma
20 ou mais formas de dosagem unitária contendo o ingrediente ativo. O pacote pode, por exemplo, compreender folha metálica ou plástica, como, por exemplo, um plástico bolha. O pacote ou dispositivo distribuidor pode ser acompanhado por instruções para administração.

25

Dosagem e Frequência de Administração

A frequência e dosagem irão variar também de acordo com fatores específicos para cada paciente dependendo das

terapias específicas (por exemplo, o agente terapêutico ou profilático específico ou agentes) administradas, a severidade da desordem, doença ou condição, rota de administração, assim como idade, corpo, peso, resposta, e o histórico médico passado do paciente. Por exemplo, a dosagem de um agente profilático ou terapêutico ou a composição da invenção que será efetiva no tratamento, prevenção, e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, podem ser determinados pela administração de uma composição para um modelo animal como, por exemplo, os modelos animais descritos aqui ou conhecidos daqueles especialistas na arte. Em adição, testes *in vitro* podem opcionalmente ser empregados para ajudar a identificar escalas de dosagens ótimas. Regimes adequados podem ser selecionados por um especialista na arte ao considerar tais fatores e ao seguir, por exemplo, dosagens reportadas na literatura e recomendadas na referência *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007).

Doses exemplares de uma pequena molécula incluem quantidades em miligramas ou microgramas da pequena molécula por quilograma do sujeito ou peso amostral (por exemplo, em torno de 1 micrograma por quilograma até em torno de 500 miligramas por quilograma, em torno de 100 microgramas por quilograma até em torno de 5 miligramas por

quilograma, ou em torno de 1 micrograma por quilograma a até 50 microgramas por quilograma).

Para anticorpos, proteínas, polipeptídeos, peptídeos e
5 proteínas de fusão compreendidos por uma invenção, a
dosagem administrada a um paciente é tipicamente de 0,0001
mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal de um paciente.
Preferencialmente, a dosagem administrada a um paciente é
entre 0,0001 mg/kg e 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 10 mg/kg,
10 0,0001 mg/kg e 5 mg/kg, 0,0001 e 2 mg/kg, 0,0001 e 1 mg/kg,
0,0001 mg/kg e 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 0,5 mg/kg, 0,0001
mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10
mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg ou 0,01 a 0,10
mg/kg de peso corporal do paciente. Geralmente, anticorpos
15 humanos têm uma meia-vida mais longa dentro do corpo humano
do que anticorpos de outras espécies em função da resposta
imunológica a polipeptídeos estrangeiros. Assim, pequenas
dosagens de anticorpos humanos e administrações menos
freqüentes são freqüentemente possíveis. Ademais, dosagem e
20 freqüência de administração dos anticorpos da invenção ou
fragmentos desses podem ser reduzidos pelo aumento da
absorção e penetração tissular dos anticorpos por
modificação como, por exemplo, por exemplo, lipidificação.

25 Dosagens exemplares dos EphA2-BiTEs da invenção
administrados a um paciente são tipicamente 0,01 µg a 100
mg. Uma dosagem particularmente preferida é 0,1 µg a 10 mg,
mais preferencialmente, 1 µg a 100 µg, e mais
preferencialmente, 3 µg a 10 µg.

Em um avanço específico, a dosagem dos EphA2-BiTEs (por exemplo, anticorpos, composições, ou combinação de terapias da invenção) administrada para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, em um paciente é 100 mg/kg ou menos, 50 mg/kg ou menos, 25 mg/kg ou menos, 10 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, 500 µg/kg ou menos, 400 µg/kg ou menos, 300 µg/kg ou menos, 200 µg/kg ou menos, 150 µg/kg ou menos, preferencialmente 125 µg/kg ou menos, 100 µg/kg ou menos, 95 µg/kg ou menos, 90 µg/kg ou menos, 85 µg/kg ou menos, 80 µg/kg ou menos, 75 µg/kg ou menos, 70 µg/kg ou menos, 65 µg/kg ou menos, 60 µg/kg ou menos, 55 µg/kg ou menos, 50 µg/kg ou menos, 45 µg/kg ou menos, 40 µg/kg ou menos, 35 µg/kg ou menos, 30 µg/kg ou menos, 25 µg/kg ou menos, 20 µg/kg ou menos, 15 µg/kg ou menos, 10 µg/kg ou menos, 5 µg/kg ou menos, 2,5 µg/kg ou menos, 2 µg/kg ou menos, 1,5 µg/kg ou menos, 1 µg/kg ou menos, 0,5 µg/kg ou menos, ou 0,5 µg/kg ou menos do peso corporal de um paciente. Em outro avanço, a dosagem dos EphA2-BiTEs ou combinação de terapias da invenção administrados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, em um paciente é uma dose

unitária de 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 15 mg, 0,1 mg a 12 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 8 mg, 0,1 mg a 7 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 to 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 a 8 mg, 0,25 mg a 7m g, 0,25 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 8 mg, 1 mg a 7 mg, 1 mg a 5 mg, ou 1 mg a 2,5 mg.

Em outros avanços, um sujeito é administrado com uma ou mais doses de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, onde uma dose em uma quantidade efetiva alcança uma titulação sérica de pelo menos 0,1 µg/ml, pelo menos 0,5 µg/ml, pelo menos 1 µg/ml, pelo menos 2 µg/ml, pelo menos 5 µg/ml, pelo menos 6 µg/ml, pelo menos 10 µg/ml, pelo menos 15 µg/ml, pelo menos 20 µg/ml, pelo menos 25 µg/ml, pelo menos 50 µg/ml, pelo menos 100 µg/ml, pelo menos 125 µg/ml, pelo menos 150 µg/ml, pelo menos 175 µg/ml, pelo menos 200 µg/ml, pelo menos 225 µg/ml, pelo menos 250 µg/ml, pelo menos 275 µg/ml, pelo menos 300 µg/ml, pelo menos 325 µg/ml, pelo menos 350 µg/ml, pelo menos 375 µg/ml, ou pelo menos 400 µg/ml dos EphA2-BiTEs da invenção. Em ainda outros avanços, um sujeito é administrada uma dose de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção para alcançar uma titulação sérica de pelo menos 0,1 µg/ml, pelo menos 0,5 µg/ml, pelo menos 1 µg/ml, pelo menos, 2 µg/ml, pelo menos 5 µg/ml, pelo menos 6 µg/ml, pelo menos 10 µg/ml, pelo menos 15 µg/ml, pelo menos 20 µg/ml, pelo menos 25 µg/ml, pelo menos 50 µg/ml, pelo menos 100 µg/ml, pelo menos 125 µg/ml, pelo

menos 150 µg/ml, pelo menos 175 µg/ml, pelo menos 200 µg/ml, pelo menos 225 µg/ml, pelo menos 250 µg/ml, pelo menos 275 µg/ml, pelo menos 300 µg/ml, pelo menos 325 µg/ml, pelo menos 350 µg/ml, pelo menos 375 µg/ml, ou pelo
5 menos 400 µg/ml dos anticorpos e uma dose subsequente de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção é administrada para manter uma titulação sérica de pelo menos 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, pelo menos, 2 µg/ml, pelo menos 5 µg/ml, pelo menos 6 µg/ml, pelo menos
10 10 µg/ml, pelo menos 15 µg/ml, pelo menos 20 µg/ml, pelo menos 25 µg/ml, pelo menos 50 µg/ml, pelo menos 100 µg/ml, pelo menos 125 µg/ml, pelo menos 150 µg/ml, pelo menos 175 µg/ml, pelo menos 200 µg/ml, pelo menos 225 µg/ml, pelo menos 250 µg/ml, pelo menos 275 µg/ml, pelo menos 300
15 µg/ml, pelo menos 325 µg/ml, pelo menos 350 µg/ml, pelo menos 375 µg/ml, ou pelo menos 400 µg/ml. De acordo com estes avanços, um sujeito pode ser administrado com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou mais doses subsequentes.

20 Em um avanço específico, a invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar ma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção),
25 ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma dose de pelo menos 10 µg, preferencialmente pelo menos 15 µg, pelo menos 20 µg, pelo menos 25 µg, pelo menos 30 µg, pelo menos 35 µg, pelo menos 40 µg, pelo menos 45 µg, pelo menos 50

µg, pelo menos 55 µg, pelo menos 60 µg, pelo menos 65 µg, pelo menos 70 µg, pelo menos 75 µg, pelo menos 80 µg, pelo menos 85 µg, pelo menos 90 µg, pelo menos 95 µg, pelo menos 100 µg, pelo menos 105 µg, pelo menos 110 µg, pelo menos 115 µg, pelo menos 120 µg, pelo menos 150 µg, pelo menos 300 µg, pelo menos 400 µg, pelo menos 500 µg, pelo menos 1 mg, pelo menos 5 mg, pelo menos 10 mg, pelo menos 25 mg, pelo menos 50 mg, ou pelo menos 100 mg de um ou mais EphA2-BiTEs, combinação de terapias, ou composições da invenção. Em outro avanço, a invenção provê um método para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, ditos métodos compreendendo a administração a um sujeito em necessidade desta uma dose de pelo menos 10 µg, preferencialmente pelo menos 15 µg, pelo menos 20 µg, pelo menos 25 µg, pelo menos 30 µg, pelo menos 35 µg, pelo menos 40 µg, pelo menos 45 µg, pelo menos 50 µg, pelo menos 55 µg, pelo menos 60 µg, pelo menos 65 µg, pelo menos 70 µg, pelo menos 75 µg, pelo menos 80 µg, pelo menos 85 µg, pelo menos 90 µg, pelo menos 95 µg, pelo menos 100 µg, pelo menos 105 µg, pelo menos 110 µg, pelo menos 115 µg, ou pelo menos 120 µg de um ou mais EphA2-BiTEs, combinação de terapias, ou composições da invenção como uma infusão contínua, uma vez a cada 3 dias, preferencialmente, uma vez a cada 4 dias, uma vez a cada 5 dias, uma vez a cada 6 dias, uma vez a cada 7 dias, uma vez a cada 8 dias,

uma vez a cada 10 dias, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, ou uma vez ao mês.

A presente invenção provê métodos para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo:

10 (a) administração a um sujeito em necessidade desta uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs, combinação de terapias, ou composições da invenção; e (b) monitoramento do nível/concentração plasmático de ditos

15 EphA2-BiTEs administrados em dito sujeito após administração de um certo número de doses dos ditos EphA2-BiTEs. Adicionalmente, ditos certos números de doses é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente efetiva de

20 um ou mais EphA2-BiTEs, composições, ou combinação de terapias da invenção. Em outro avanço, a dose é administrada como uma infusão intravascular contínua.

Em um avanço específico, a invenção provê um método para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo:

25

(a) administração a um sujeito em necessidade desta uma dose de pelo menos 10 μg (preferencialmente pelo menos 15 μg , pelo menos 20 μg , pelo menos 25 μg , pelo menos 30 μg , pelo menos 35 μg , pelo menos 40 μg , pelo menos 45 μg , pelo menos 50 μg , pelo menos 55 μg , pelo menos 60 μg , pelo menos 65 μg , pelo menos 70 μg , pelo menos 75 μg , pelo menos 80 μg , pelo menos 85 μg , pelo menos 90 μg , pelo menos 95 μg , ou pelo menos 100 μg) de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção; e (b) administração de uma ou mais doses

subseqüentes a dito sujeito quando o nível plasmático dos EphA2-BiTE administrados em dito sujeito é menor do que 0,1 $\mu\text{g/ml}$, preferencialmente menor do que 0,25 $\mu\text{g/ml}$, menor do que 0,5 $\mu\text{g/ml}$, menor do que 0,75 $\mu\text{g/ml}$, ou menos do que 1 $\mu\text{g/ml}$. Em outro avanço, a invenção provê um método para

tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, dito método compreendendo:

(a) administração a um sujeito em necessidade desta uma ou mais doses de pelo menos 10 μg (preferencialmente pelo menos 15 μg , pelo menos 20 μg , pelo menos 25 μg , pelo menos 30 μg , pelo menos 35 μg , pelo menos 40 μg , pelo menos 45 μg , pelo menos 50 μg , pelo menos 55 μg , pelo menos 60 μg , pelo menos 65 μg , pelo menos 70 μg , pelo menos 75 μg , pelo menos 80 μg , pelo menos 85 μg , pelo menos 90 μg , pelo menos 95 μg , ou pelo menos 100 μg) de um ou mais anticorpos da invenção; (b) monitoramento do nível plasmático dos EphA2-BiTEs da invenção administrados em dito sujeito após a

administração de um certo número de doses; e (c) administração de uma dose subsequente dos EphA2-BiTEs da invenção quando o nível plasmático do EphA2-BiTE administrado em dito sujeito é menor do que 0,1 µg/ml, preferencialmente menor do que 0,25 µg/ml, menor do que 0,5 µg/ml, menor do que 0,75 µg/ml, ou menos do que 1 µg/ml. Em um avanço, dito certo número de doses é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 doses de uma quantidade efetiva de um ou mais EphA2-BiTEs da invenção ou podem ser administrados como uma infusão intravascular contínua.

Terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos), outras que não os EphA2-BiTEs da invenção, os quais têm sido ou estão sendo correntemente usados para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção) ou um ou mais sintomas dessa podem ser administrados em combinação com um ou mais EphA2-BiTEs de acordo com os métodos da invenção para tratar, prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção) ou um ou mais sintomas desta. Preferencialmente, as dosagens dos agentes profiláticos ou terapêuticos usados em combinação de terapias da invenção são menores do que aquelas as quais foram ou estão sendo atualmente usadas para tratar,

prevenir e/ou gerenciar uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção) ou um ou mais sintomas desta. As dosagens recomendadas de agentes correntemente usados para o tratamento, prevenção e/ou gerenciamento de uma desordem associada com expressão aberrante (por exemplo, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), ou um ou mais sintomas desta, podem ser obtidas de qualquer referência na arte incluindo, mas não limitam-se a, Hardman et al., eds., 2001, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics*, 10th ed., Mc-Graw-Hill, Nova Iorque; *Physicians' Desk Reference* (61st edition, 2007), Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ, as quais são incorporadas aqui por referência em sua íntegra.

Em vários avanços, as terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) são administradas como uma infusão contínua, menor do que 5 minutos entre elas, menor do que 30 minutos entre elas, 1 hora entre elas, em torno de 1 hora entre elas, em torno de 1 a em torno de 2 horas entre elas, em torno de 2 horas a em torno de 3 horas entre elas, em torno de 3 horas a em torno de 4 horas entre elas, em torno de 4 horas a em torno de 5 horas entre elas, em torno de 5 horas a em torno de 6 horas entre elas, em torno de 6 horas a em torno de 7 horas entre elas, em torno de 7 horas a em torno de 8 horas entre elas, em torno de 8 horas

a em torno de 9 horas entre elas, em torno de 9 horas a em
torno de 10 horas entre elas, em torno de 10 horas a em
torno de 11 horas entre elas, em torno de 11 horas a em
torno de 12 horas entre elas, em torno de 12 horas a 18
5 horas entre elas, 18 horas a 24 horas entre elas, 24 horas
a 36 horas entre elas, 36 horas a 48 horas entre elas, 48
horas a 52 horas entre elas, 52 horas a 60 horas entre
elas, 60 horas a 72 horas entre elas, 72 horas a 84 horas
entre elas, 84 horas a 96 horas entre elas, ou 96 horas a
10 120 horas entre elas. Em avanços preferidos, duas ou mais
terapias são administradas dentro da mesma visita ao
paciente.

Em certos avanços, um ou mais anticorpos da invenção e
15 uma ou mais outras terapias (por exemplo, agentes
profiláticos ou terapêuticos) são ciclicamente
administrados. Terapia cíclica envolve a administração de
uma terapia primeira (por exemplo, um primeiro agente
profilático ou terapêutico) por um período de tempo,
20 seguido pela administração de uma segunda terapia (por
exemplo, um segundo agente profilático ou terapêutico) por
um período de tempo, opcionalmente, seguido pela
administração de uma terceira terapia (por exemplo, agente
profilático ou terapêutico) por um período de tempo e assim
25 por diante, e repetindo essa administração seqüencial, isto
é, o ciclo de modo a reduzir o desenvolvimento de
resistência a uma das terapias, para evitar ou reduzir os
efeitos colaterais de uma ou mais das terapias, e/ou para
aumentar a eficácia das terapias.

Em certos avanços, a administração dos mesmos EphA2-BiTEs da invenção podem ser repetidos e as administrações podem ser separadas por pelo menos 1 dia, 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias, 2 meses, 75 dias, 3 meses, ou pelo menos 6 meses. Em outros avanços, a administração de uma terapia (por exemplo, um agente profilático ou terapêutico) outra que não um EphA2-BiTE da invenção pode ser repetido e a administração pode ser separada por pelo menos 1 dia, 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias, 2 meses, 75 dias, 3 meses, ou pelo menos 6 meses.

Kits

15

A invenção provê um pacote farmacêutico ou *kit* compreendendo um ou mais recipientes preenchidos com um ou mais EphA2-BiTEs da invenção, polinucleotídeos codificando ditos EphA2-BiTEs, e vetores expressando ditos polinucleotídeos. Adicionalmente, um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma desordem associada com expressão aberrante (isto é, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer, uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção) também podem ser incluídos no pacote farmacêutico ou *kit*. A invenção também provê um pacote farmacêutico ou *kit* compreendendo um ou mais recipientes preenchidos com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente

associadas com tal (is) recipiente (s) podem uma nota na forma prescrita por uma agência governamental regulando a manufatura, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, tal nota refletindo a aprovação pela agência da
5 manufatura, uso ou venda para administração humana.

A presente invenção provê *kit* que podem ser usados nos métodos acima. Em um avanço, um *kit* compreende, em um ou mais recipientes, um ou mais EphA2-BiTEs da invenção e
10 instruções para uso. Em outro avanço, um *kit* ainda compreende um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma desordem associada com expressão aberrante (isto é, expressão aumentada) e/ou atividade de EphA2 (por exemplo, câncer,
15 uma desordem celular hiperproliferativa não cancerosa, ou uma infecção), em um ou mais recipientes. Em um avanço específico, o EphA2-BiTE é anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado. Em certos avanços, o outro agente profilático ou terapêutico é um quimioterapêutico. Em outros avanços, o
20 agente profilático ou terapêutico é uma terapêutica biológica ou hormonal. Em ainda outros avanços, o agente profilático ou terapêutico é um antiviral, antifúngico, antiprotozoários, antibacteriano, ou um agente anti-autoimune.

25

A presente invenção ainda provê kits compreendendo qualquer das composições diagnósticas discutidas acima.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos não limitantes demonstram a produção dos EphA2-BiTEs e sua caracterização.

5 GERAÇÃO DE EphA2-BiTE

Construção de Oito BiTEs Específicos para EphA2 a Partir de dois Anticorpos Monoclonais

10 Plasmídios com seqüências codificadoras para domínios variáveis de dois anticorpos murinos anti-EphA2 chamados EA2 e EA5 como descrito na *U.S. Pub. No. US 2004-0091486 A1* e *Appln. Serial No. 11/544.322*, registrada em 6 de outubro de 2006, foram utilizadas para construção de EphA2-BiTE.

15 Ver também FIGS. 1 e 2, respectivamente. Um anticorpo de cadeia simples anti-CD3, um derivativo desimunizado do anticorpo monoclonal murino específico para CD3ε humana L2K chamado diL2K foi usado para fusão com os Anticorpos de cadeia simples EphA2 (ver Dreier et al., 2002, *Int. J. Cancer* 100:690-697, o qual é incorporado aqui por referência em sua íntegra). DNAs c para oito diferentes constructos de BiTE foram gerados por fusão baseada em PCR. Constructos' de BiTE tinham os seguintes arranjos de domínios (VH e VL) variáveis e posicionamento de anticorpos

20 de cadeia simples anti-EphA2 e anti-CD3:

25

Constructos de BiTE Feitos

Posição N Terminal	Posição C Terminal
EA2 (VL/VH)	(VH/VL) desimunizado anti-CD3
EA2 (VH/VL)	
EA5 (VL/VH)	(VH/VL) desimunizado anti-CD3
EA5 (VH/VL)	
(VH/VL) desimunizado anti-CD3	EA2 (VL/VH)
	EA2 (VH/VL)
(VH/VL) desimunizado anti-CD3	EA5 (VL/VH)
	EA5 (VH/VL)

A estrutura do DNAC de BiTE é mostrada em FIG. 3. As

5 inserções clonadas no vetor de expressão pEF-DHFR cada qual compreendendo um líder com um sítio Kozak 5'-terminal para eficiência de tradução aumentada e uma sequência sinal secretória (líder de cadeia pesada de Ig murina). O líder é seguido por quatro domínios Ig variáveis listados acima. O

10 peptídeo ligante na junção VL-Vh ou VH-VL de anti-EphA2 tem um comprimento de 15 aminoácidos (três repetições do motivo G₄S; SEQ ID NO:59). O peptídeo ligante conectando o EphA2 com a especificidade de ligação a CD3 compreende uma repetição do motivo G₄S (SEQ ID NO:58). Diretamente

15 adjacente ao quarto domínio é uma sequência C-terminal de

hexa-histidina (H6) (SEQ ID NO:66) para propósitos de detecção e purificação. Os sítios de enzimas de restrição indicados foram usados para clonar os constructos de BiTE no vetor de expressão.

5

Vetores para Expressão de BiTE em Células CHO

O vetor pEF-DHFR é um vetor de 5,8 kb com a dihidrofolato redutase murina como marcador de seleção formando uma unidade de transcrição bi-cistrônica junto com o gene a ser expresso sob o controle do promotor humano EFl α . O vetor eucariótico de expressão é um derivativo do vetor de expressão pMT2PC.

O promotor EFl α é seguido por um sítio de clonagem múltipla, um sítio interno de entrada ribossomal (IRES), o gene DHFR e um sinal de poliadenilação. Sequências controle adicionais presentes no vetor são a origem de replicação bacteriana (ORI) e o gene para resistência a ampicilina (bla). Na seguinte tabela, os vários elementos do vetor de expressão de DNAC são de expressão são sumariados.

Estrutura		Origem	Função
Promotor do fator de alongamento 1 α (Mizushima e Nagata 1990)	EFl α -P	humana	Controle do constructo inserido no MCS e o marcador de seleção DHFR
Sítio de clonagem	MCS	sintética	Poliligante com sítios

múltipla			de restrição para EcoRI, SmaI, XbaI e SalI
Sítio interno de entrada ribossomal derivado de RNA de poliovírus humano (Pelletier e Sonenberg 1988)	IRES	viral (pólio)	Expressão bi-cistrônica do constructo inserido no MCS e DHFR
Dihidrofolato redutase	DHFR	murina	Marcador para seleção em células de mamíferos apropriadas para subseqüente amplificação gênica
Sinal de poliadenilação derivado de mRNA de early SV40	SV40 poli A	viral	Terminação da transcrição e processamento de mRNA
Transcrito adenoviral não traduzido atuando sobre líder tripartite (TPL) do promotor tardio maior de adenovírus (MLP)	VA 1	viral	Nenhum efeito em pEF- DHFR em função da deleção do promotor tardio maior de adenovírus (MLP)
Origem de replicação bacteriana de pUC18	ori	bacteriana	Replicação em E. coli
Gene de resistência a	bla	bacteriana	Marcador para seleção

ampicilina (Amp ^R gene)			em E. coli

Uma descrição do vetor é mostrada em FIG. 4.

Linhagem Celular CHO do Recipiente

5

A linhagem celular CHO/dhfr⁻ de ovário de hamster chinês (CHO), CRL 9096, foi comprada na *American Type Culture Collection* ("ATCC"; Manassas, Virgínia), e foi caracterizada por Q-One, UK. Hipoxantina e timidina t/6em
 10 de ser adicionadas como suplementos ao meio de cultura porque a linhagem celular CHO/dhFr é deficiente em dihidrofolato redutase.

Expressão de BiTE em Células CHO

15

Após transfecção das células CHO/dhfr⁻ com os oito vetores de expressão codificando constructos BiTE baseados em EphA2, cada conjunto celular foi cultivado em meio de soja líquido livre de nucleosídeos HyQ PF CHO (com L-Glutamine a 4,0 mM com Pluronic F - 68 a 0,1%; Cat.#
 20 SH30359.02; HyClone) para seleção de transfectantes positivos para DHFR. Subseqüentemente, o conjunto de células trnasfectadas foi sujeito a uma etapa de amplificação de gene único usando inibidor de DHFR
 25 metotrexato (MTX) em uma concentração de 20 nM como um suplemento ao meio livre de nucleosídeo.

Purificação dos EphA2-BiTEs dos Sobrenadantes de Cultura

Sistema de FPLC Äkta® (Amersham) e programa
5 computacional Unicorn® foram usados para cromatografia.
Cromatografia de afinidade de metal imobilizado ("IMAC")
foi executada usando uma coluna Fractogel® (Merck) a qual
foi carregada com $ZnCl_2$ de acordo com o protocolo
providenciado pelo fabricante. A coluna foi equilibrada
10 com tampão A (tampão de fosfato de sódio a 20 mM pH 7,5,
NaCl a 0,4 M) e o sobrenadante da cultura de células (500
ml) foi aplicado à coluna (10 ml) a uma taxa de fluxo de 3
ml/min. A coluna foi lavada com tampão A para remover
amostra não ligada. Proteína ligadas foram eluídas usando
15 um gradiente em duas etapas de tampão B (tampão fosfato de
sódio a 20mM pH 7,5, NaCl a 0,4 M, Imidazol a 0,5 M) de
acordo com o seguinte:

Etapa 1: 10% de tampão B em 6 volumes da coluna;

20

Etapa 2: 100% de tampão B em 6 volumes da coluna.

Frações de proteínas eluídas pela etapa 2 foram
agrupadas para purificação adicional.

25

Cromatografia de filtração em gel foi executada em uma
coluna Sephadex 200 HiPrep (Amersham) equilibrada com PBS
(Gibco) (FIG. 5). Amostras de proteínas eluídas (a taxa de
fluxo de 1 ml/min) foram sujeitas a detecção por SDS-PAGE

padrão e *Western Blot* (FIG. 6). Antes da purificação, a coluna foi calibrada para determinação de peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200(. Concentrações de proteínas foram determinadas usando corante protéico para teste (MicroBCA, Pierce) e IgG (Biorad) como proteína padrão.

BiTE EphA2s Substitutos Reativos com CD3 de Macacos para Estudos de Toxicidade

10

Análises de Ligação por Citometria de Fluxo de Anticorpos Parentais Anti-CD3 reativos a Cinomolgus

Como ponto de partida para os constructos EphA2-BiTE serem testados para toxicologia em macacos cinomolgus, células mononucleares de sangue periférico ("PBMCs") de macacos cinomolgus foram usados para detectar ligação a CD3 de dois anticorpos parentais anti-CD3 reativos a cinomolgus, cCD3-1 e cCD3-2, ambos conjugados com FITC. Para cada amostra 200.000 células foram incubadas com os respectivos anticorpos por 30 minutos em gelo. Subseqüentemente as células foram lavadas duas vezes com PBS. Como controle negativo um anticorpo irrelevante foi usado (linha preta). Ligação a CD3 é representada por linhas cinzas nas sobreposições de histograma. Células foram analisadas por citometria de fluxo em um FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Ambos os anticorpos mostraram ligação distinta à fração de células T dos BMC de cinomolgus. Ver FIG. 7.

Moléculas Substitutas com uma Especificidade de Alvo Substituída

5 Os domínios variáveis dos anticorpos parentais anti-CD3 cCD3-1 e cCD3-2 foram usados para construir moléculas BiTE com especificidade de alvo substituída. Anticorpos de cadeia simples em diferentes arranjos de domínios foram criados por fusão baseada em PCR. Os seguintes constructos de BiTE foram gerados ao combinar estas especificidades com
10 uma especificidade de alvo substituta:

Posição N-Terminal	Posição C-Terminal
Cadeia simples substituta (VL/VH do alvo SCA)	cCD3-1 (VL/VH)
	cCD3-1 (VH/VL)
	cCD3-2 (VL/VH)
	cCD3-2 (VH/VL)

Clonagem e transfecção dos constructos substitutos
15 foram executadas com descrito acima.

Evidência para Reatividade Cruzada de Anticorpos Monoclonais EA2 e EA5 com EphA2 de Rhesus

20 O seqüenciamento de EphA2 de Rhesus da linhagem de linhagem Rhesus CMMT110/CL (97.7% de homologia com EphA2 de humano) e seqüenciamento parcial de células de baço de cinomolgus (> 99% de homologia com EphA2 de humano) sugeriram que os anticorpos monoclonais específicos para

EphA2 de humanos EA2 e EA5 podem ser capazes de reagir cruzadamente com as moléculas EphA2 de primatas não humanos. De fato, anticorpos EA2e EA5 ativaram a fosforilação de EphA2 em células CMMT110/CL (FIG. 8), e ligaram-se fracamente a EphA2 de superfícies das células CMMT110/CL como medido por citometria de fluxo (mudança no MFI versus isotipo controle de 1,2-1,8 vezes).

10 Construção de EA2 e EA5 BiTEs de Macacos Reativos a CD3

Plasmídios com seqüências codificadoras para cadeias variáveis dos anticorpos EA2 e EA5 anti-EphA2 e anticorpos de cadeia simples específicos para CD3 de macaco cCD3-1 e cCD3-2 foram construídos por fusão baseada em PCR. As seguintes 12 moléculas de BiTE foram feitas:

Posição N-Terminal	Posição C-Terminal
EA5 (VH/VL, EA5HL)	cCD3-1LH
	cCD3-1HL
	cCD3-2LH
	cCD3-2HL
EA2 (VH/VL, EA2HL)	cCD3-1LH
	cCD3-1HL
	cCD3-2LH
	cCD3-2HL
cCD3-1LH	EA2 (VH/VL, EA2HL)
cCD3-1HL	

cCD3-2LH	
cCD3-2HL	

Clonagem e transfecção dos constructos substitutos foram realizadas como descrito acima.

5 Análise da Ligação por Citometria de Fluxo de Vários
Constructos de BiTE Substitutos Anti-EphA2 Reagindo com CD3
de Macaco

Para cada amostra 200.000 células (células T ou
10 células tumorais EphA2⁺) foram incubadas com 50 µL de
sobrenadante puro de cultura de células CHO transfectadas
com os constructos de BiTE substitutos por 30 minutos em
gelo. As células foram lavadas subsequente duas vezes
com PBS e constructos ligados foram detectados via seus
15 tags de histidina c-terminais com anticorpo murino Penta
His (diluído a 5µg/ml em 50 µl de PBS com soro fetal de
bezerro a 2%; Qiagen; Ordem No. 34660) seguido por um etapa
de lavagem e um anticorpo específico para FC gama murino
conjugado a ficoeritrina (Dianova, ordem número 115-116-
20 071), diluído 1:100 em 50 µl de PBS com soro fetal de
bezerro a 2% (linha cinza). Como um controle negativo,
sobrenadantes de cultura de células não transfectadas foi
usado (linha preta). Células foram analisadas por
citometria de fluxo em FACS-Calibur (Becton Dickinson,
25 Heidelberg). Como mostrado em FIG. 9, apenas aqueles
constructos de BiTE substitutos baseados em anticorpo CD3
de macaco cCD3-1 mostraram forte ligação a CD3 e EphA2.

Constructos baseados em cCD3-2 mostraram apenas forte ligação a CD3; a ligação a EphA2 se mostrou quase que completamente suprimida.

5 CARACTERIZAÇÃO DE EphA2-BiTE

Análise da Ligação por Citometria de Fluxo de Anticorpos Parentais Anti-EphA2

10 Uma análise por citometria de fluxo foi executada para estimar a força de ligação dos anticorpos monoclonais parentais anti-EphA2 B233, EA2 e EA5 (FIG. 10). Ver FIG. 3 para seqüências de domínios VL e VH do anticorpo monoclonal B233. Células A549 expressando EphA2 (linhagem de células
15 de carcinoma pulmonar humano) e células MDA-MB-231 (câncer de mama humano) foram usadas. 200.000 células foram incubadas com 10 µg/ml do respectivo anticorpo por 30 minutos em gelo. As células foram subsequente-mente lavadas por duas vezes com PBS. A ligação do anticorpo primário foi
20 detectada via um anticorpo específico para Fc-gama murino conjugado a ficoeritrina (Dianova, ordem número 115-116-071) diluído em 50 µL de PBS com soro fetal de bezerro a 2%. Como controle negativo, um anticorpo irrelevante com o mesmo isotipo foi usado (linha fina). Células foram
25 analisadas por citometria de fluxo em um FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg).

Anticorpo monoclonal B233 mostrou o sinal de ligação mais forte seguido por EA2 e EA5. As capacidades de ligação

dos três diferentes anticorpos são mostradas em uma sobreposição em histograma.

Reatividade cruzada tecidual (TCR) Anticorpos

5 Parentais EA2 e EA5 Anti-EphA2

Seções de tecido humano congelado foram coradas com os anticorpos monoclonais reativos a EphA2 de humanos EA5 e EA2 usando métodos imunohistoquímicos para determinar se os

10 anticorpos ligam-se especificamente a tecido normal. Brevemente, um pré-complexo de anticorpos primários e secundários foi produzido com os sítios de ligação secundários desligados bloqueados com espécies de gama globulinas apropriadas. Seções congeladas foram aderidas a

15 lâminas em formalina a 10% e lavadas com salina tamponada com Tris 1x (TBS) com Tween 20 a 0,01%. Peroxidases endógenas foram bloqueadas com uma solução contendo glicose oxidase (Sigma, β -D(+)-glicose (Sigma), e azida de sódio (Sigma). Um kit vetor avidina/biotina (Vector Labs)

20 bloqueou sítios reativos a avidina/biotina. As lâminas foram então incubadas com uma solução de proteína bloqueadora consistindo de albumina sérica bovina, caseína, e soro de cabra normal. Seções de tecidos foram incubadas com anticorpos pré-complexados e então Vectastain ABC Elite

25 Kit (Vector Labs), lavados com TBS 1x, tratadas com DAB (Sigma), e contra-coradas com hematoxilina. Seções de tecidos foram desidratadas, cobertas com lamínula, e feitas imagens

Como mostrado em FIG. 11, EA5 demonstrou marcação de discos intercalados no tecido cardíaco (FIG 11 B) elementos de músculo liso vascular e estromal de múltiplos órgãos (citoplasma), epitélio de cólon (citoplasma), e miométrio) 5 uterino. Seções de tecidos humanos (FIG. 11 C) não foram marcadas com EA2 quando comparados com um controle isotipo anticorpo monoclonal 1A7, e como resumido pela Tabela abaixo.

Tecido	2µg/ml EA2	2µg/ml 1A7	Cont. do Teste.
células MDA 231	1+	Neg	Neg
Ovário Fibroblastos estromais (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Pâncreas	Neg	Neg	Neg
Baço Músculo liso vascular e trabecular (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Adrenal	Neg	Neg	Neg
Testículo Músculo liso vascular e Intersticial (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Nódulo Linfático Fibroblasto estromal e músculo liso vascular (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Bexiga Urinária Músculo Liso (citoplasma)	Neg	Neg	Neg

Rim	Neg	Neg	Neg
Fígado			
Músculo liso vascular (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Pele			
Músculo liso vascular (cito)	Neg	Neg	Neg
Pulmão			
Músculo liso vascular (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Próstata			
Músculo liso vascular e estromal (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Útero			
Miométrio (citoplasma)	Neg	Neg	Neg
Cólon			
Epitélio (citoplasma)	Neg	Neg	Neg

Neg = Negativo; 1+ - fraco; 2+ - moderado; 3+ = forte; 4+ = intenso

Células MDA 231 foram usadas com um controle positivo para este teste.

5

Ligação Celular Biespecífica de Constructos EphA2-BiTE

Células A549 positivas para EphA2 (linhagem de células de carcinoma pulmonar humano) e células MDA-MB-231 (câncer de mama humano), assim como HP-BALL positivas para CD3 (linhagem de células T humanas) foram usadas. 200.000 células foram incubadas com 10 µg/ml do monômero de BiTE purificado de quatro diferentes constructos de EphA2 de

10

BiTE por 30 minutos em gelo. Células foram subsequêntemente lavadas duas vezes em PBS e constructos ligados foram detectados via seus Tag hexahistidina C-terminais com um anticorpo murino penta-His (diluído 1:20 em 50 µl de PBS com soro fetal de bezerro a 2%; Qiagen; ordem número 34660) seguido por um etapa de lavagem e um anticorpo específico para Fc-gama murino conjugado a ficoeritrina (Dianova, ordem número 115-116-071) diluído 1:100 em 50 µl de PBS com soro fetal de bezerro a 2% (linha cinza). Como um controle negativo, meio de cultura de células fresco de células CHO não trnasfectadas ao invés de sobrenadante de cultura dos transfectantes foi usado (linha preta). Células foram analisadas por citometria de fluxo em um FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Ver FIG. 12.

15

A seguinte Tabela resume as intesidades relativas de ligação de todos os oitos constructos EphA2-BiTE gerados como determinado por citometria de fluxo.

Constructos de EphA2 de BiTE		Marcação de FACS		
		MDA		HP
		MB23	A549	Bal
		1		1
EA2 (VL/VH)	(VH/VL) desimmunizado	++	++	++
EA2 (VH/VL)	anti-CD3	+++	+++	+++

EA5 (VL/VH)	(VH/VL) desimun	-	-	++
EA5 (VH/VL)	izado anti- CD3	++	++	++
(VH/VL) desimuniz	EA2 (VL/VH)	++	++	+++
ado anti- CD3	EA2 (VH/VL)	++	++	+++
(VH/VL) desimuniz	EA5 (VL/VH)	-	-	++
ado anti- CD3	EA5 (VH/VL)	-	-	++

Todos os oito constructos de BiTE EA2 mostraram mais ou menos ligações fortes com suas porções anti-CD3 SCA a CD3 expressos em células HP Ball, indicando expressão e

5 dobramento apropriados da porção anti-CD3. Todos os quatro BiTEs derivados de anticorpo monoclonal EA2 mostraram ligação a linhagens celulares de câncer de mama e pulmonar que expressam EphA2, enquanto apenas um BiTE derivado de anticorpo monoclonal EA5 reteve a atividade de ligação

10 específica a EphA2. Anticorpo monoclonal EA2 assim pareceu ser mais adequado para construção de BiTE do que anticorpo monoclonal EA5.

Exclusão de Epitopo por BiTE EphA2s

A linhagem epitelial de mama não transformada positiva para EphA2 MCF10A e o carcinoma de mama MDA-MB-231 foram usados em um experimento de marcação de imunofluorescência para determinar se constructos de EphA2 de BiTE (usados a 10 µg/ml) retiveram exclusão de epítipo como seus anticorpos monoclonais parentais EA2 e EA5. Os resultados da análise são resumidos na Tabela abaixo. BiTE desimmunizado anti-CD3 EA2 (VH/VL) mostrou a exclusão de epítipo mais forte.

10

Reagente	Marcação em MCF10A	Marcação em MDA-MB-231	Exclusão de Epítipo
anticorpo monoclonal B233 (+ Control)	+ Contato célula-célula-AT	+ Em <i>ruffles</i> de membrana	-
BiTE EA2 (VH/VL)	+/- Fraca & Difusa	+/- Marcação Difusa	+++ Exclusão de Epítipo Forte
BiTE EA2 (VL/VH)	+/- Fraca & Difusa	+/- Marcação Difusa	+ Sugere Exclusão de Epítipo
BiTE EA5 (VH/VL)	+/- Fraca & Difusa	+/- Marcação Difusa	++ Exclusão de Epítipo
BiTE desimmunizado anti-CD3-EA2 (VH/VL)	+/- Fraca & Difusa	+/- Marcação Difusa	+ Sugere Exclusão de Epítipo

Produtividade de EphA2-BiTEs Monoméricos

A produtividade de cinco BiTE EphA2s ativos foi calculada a partir da produção de monômeros de uma produção em pequena escala em garrafas roladoras. Produtividades de até 1,1 mg/l' de monômeros purificados foram obtidas (ver Tabela abaixo).

A produtividade de uma produção em média escala (2 x reator de 10 L) de um conjunto de células CHO amplificadas (MTX a 20 nM) transfectadas com constructo de BiTE anti-CD3xEA2 desimmunizado (VH/VL) foi de 1,1 mg de monômero de BiTE purificado / L de sobrenadante de cultura de células.

Posição N-Terminal	Posição C-Terminal	Nível de Produção	Monômero: Dímero
EA2 (VL/VH)	(VH/VL) desimmunizado anti-CD3	1100 µg/l de monômeros	1 : 0.13
EA2 (VH/VL)		664 µg/l de monômeros	1 : 0.1
EA5 (VL/VH)	(VH/VL) desimmunizado anti-CD3	<i>(sem ligação a EphA2)</i>	
EA5 (VH/VL)		306 µg/l de monômeros	1 : 1.2
(VH/VL) desimmunizado anti-CD3	EA2 (VL/VH)	153 µg/l de monômeros	1 : 0.9
	EA2 (VH/VL)	841 µg/l de monômeros	1 : 0.1
(VH/VL)	EA5 (VL/VH)	<i>(sem ligação a EphA2)</i>	

desimunizado anti-CD3	EA5 (VH/VL)	(sem ligação a EphA2)

Potência da Lise Redirecionada de Cinco Constructos
EphA2-BiTE

5 Testes de citotoxicidade baseados em Liberação de Cromo-51 foram executados para determinar lise celular objetiva redirecionada pelos vários constructos EphA2-BiTE na presença de células T humanas. Brevemente, PBMCs como uma fonte de células T efetoras foram obtidas por

10 centrifugação de gradiente de densidade de Ficoll. Células NK foram depletadas das PBMC por contas magnéticas direcionadas para CD16 para evitar lise celular dependente de células T. Linhagens de células tumorais positivas para EphA2 MDA-MB231 e A549 foram carregadas com Cromo-51 e

15 servidas como células alvo. Os vários constructos EphA2-BiTE foram titulados ao longo de uma vasta gama de concentrações. A duração do teste foi de 18 horas, e a razão efetora-para-alvo (E:A) 10:1. Ver FIG. 13.

20 A seguinte Tabela resume as concentrações de BiTE requeridas para metade de lise celular redirecionada máxima (isto é, EC50) de lise celular (isto é, EC50) de Linhagens de células alvo positivas para EphA2 MDA-MB231 e A549, respectivamente, como determinado em dois experimentos

25 independentes. A seguinte Tabela resume as concentrações de BiTE requeridas para metade de lise celular redirecionada máxima (isto é, EC50) de lise celular (isto é, EC50) de

Linhagens de células alvo positivas para EphA2 MDA-MB231 e A549, respectivamente, como determinado em dois experimentos independentes.

Constructos EphA2-BiTE		EC ₅₀ [ng/ml]	
		MDA MB231	A549
EA2 (VL/VH)	(VH/VL) desimunizado	53,8 86,0	170,1 Não detectável
EA2 (VH/VL)	anti-CD3	55,9 72,1	183,9 163,4
EA5 (VL/VH)	(VH/VL) desimunizado	(sem ligação a EphA2)	
EA5 (VH/VL)	anti-CD3	citotoxicidade muito baixa	
(VH/VL) desimunizado anti-CD3	EA2 (VL/VH)	citotoxicidade muito baixa	
	EA2 (VH/VL)	5,8 8,6	22,6 24,8
(VH/VL) desimunizado anti-CD3	EA5 (VL/VH)	(sem ligação a EphA2)	
	EA5 (VH/VL)	(sem ligação a EphA2)	

5

O constructo BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL) desmunizado consistentemente mostrou a potência mais alta em lise

redirecionada de linhagens celulares de câncer de mama e pulmonar.

Seleção de BiTE Anti-CD3xEA2 (VH/VL) Desimunizado Para

5 Caracterização Adicional

Uma vez que anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado foi achado como sendo o constructo EphA2-BiTE mais potente na lise redirecionada (valores de ED50 entre 6 e 25 ng/mL com as duas linhagens de células alvo), e tinha a segunda melhor produtividade de monômeros (-,8-1,1 mg/mL) de todos os cinco constructos de BiTE que mostraram atividade de ligação biespecífica, ele foi selecionado para caracterização adicional. Ver FIG. 14 para as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do constructo BiTE anti-CD3xEA2 desimmunizado.

CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DO EphA2-BiTE "DESIMUNIZADO ANTI-CD3 x EA2 (VH/VL)"

20

Variação da Atividade Citotóxica com Lote de Produção e Doador de Célula Efetora

A atividade citotóxica de dois lotes de produção diferentes do EphA2-BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado foi comparada usando PBMCs (após depleção de células positivas para CD16) e células T CD8+ estimuladas como células efetoras. As linhagens celulares positivas para EphA22 A549 e MDA-MB-231 serviram como células alvo. A

razão E:A foi 10:1, e o tempo de incubação foi 18 horas.
Ver FIG. 15.

A seguinte Tabela resume os valores de meia lise
5 máxima (isto é, EC₅₀), para lise celular objetiva
redirecionada, obtidos das análises dose-resposta acima com
o BiTE EphA2 de diferentes lotes de produção usando seja
PBMC ou células T CD8+ estimuladas como células efetoras.

	Células efetoras	EC ₅₀ [ng/ml]	
		A549	MDA MB 231
Lote 040507PMa02	PBMC	32,8	7,6
	Células T CD8	3,3	0,7
Lote 040907USy02	PBMC	10,2	3,2
	Células T CD8	1,6	0,5

10

A variação de valores de ED₅₀ para lise celular
objetiva redirecionada foi testada para o EphA2-BiTE anti-
CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado com sete doadores de PBMC
humanos (esvaziados de células NK).

15

Fonte de Células efetoras	EC ₅₀ [ng/ml]		Lote
PBMC depletadas de células NK	A549	MDA-MB 231	
Doador #1	20,9	15,4	040305PMa04

Doador #2	22,6	5,8	040305PMa04
Doador #3	24,8	8,6	040305PMa04
Doador #4	28,5	23,9	040507PMa02
Doador #5	Não feito	1,9	040507PMa02
Doador #6	32,8	7,6	040507PMa02
Doador #7	6,6	3,2	040907USy02

O BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado EphA2 mostrou citotoxicidade consideravelmente maior com células T CD8+ estimuladas do que com PBMC depletada de células NK.

5 Variação da atividade biológica entre dois diferentes lotes foi na faixa de 1,4 a 3,2 vezes. Variação da potência foi, entretanto, mais pronunciada com doadores de PBMC humana, onde valores de ED50 entre 1,9 e 23,9 ng/mL foram observados. Eficácia específica por doador de células T

10 pode ser, portanto, uma grande fonte de variação de atividade BiTE.

Testes de citotoxicidade celular redirecionada baseados em citometria de fluxo também foram executados

15 para determinar a variação de atividade citotóxica de EphA2-BiTE com doadores de células efetoras. PBMCs enriquecidas com células T CD3+ foram usadas como células efetoras e células de carcinoma de cólon SW480 EphA2+ usadas como células alvo. Brevemente, PBMC humana

20 enriquecida com células T CD3+ (RosetteSep; StemCell Technologies) foram isoladas de doadores saudáveis por centrifugação de gradiente de densidade de Ficoll. Células

alvo foram marcadas com corante verde fluorescente de membrana 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiOC18(3) ou "DiO"; (Molecular Probes)) por 5 minutos a 37° C. Misturas de célula efetora e alvo foram combinadas a uma razão 5:1 e transferidas a uma placa de 96 poços de fundo arredondado. Somente meio ou diluições seriadas de cada constructo BiTE foi adicionado a poços apropriados, incubados por 18 ou 42 horas a 37° C, e analisados por citometria de fluxo após adição de iodeto de propídio (PI) a uma concentração final de 1 µg/ml. Lise celular objetiva foi calculada como a porcentagem de células positivas para DiO coradas positivas para PI. Todas as incubações foram conduzidas em duplicata. Cálculos dos valores de EC50 foram conduzidos usando um modelo de ajuste não linear de quatro parâmetros.

15

Como mostrado em FIG. 16, EphA2-BiTE redirecionaram células T de diferentes sujeitos para mediar a morte de células tumorais EphA2+. O teste de citotoxicidade baseado em citometria de fluxo utilizou células alvo SW480 e células T CD3+ isoladas de 49 doadores humanos individuais. Para a maioria dos doadores humanos, EphA2-BiTE mediou a morte de células tumorais em concentrações bastante baixas. O EC50 para EphA2-BiTE foi entre 1 e 110 ng/mL para todos os doadores de células T testados com uma mediana (barra horizontal) de 24 ng/mL. Assim, para a maioria dos doadores de células T humanas, o EphA2-BiTE é uma molécula muito potente com atividade de matança observada em concentrações na faixa baixa de ng/mL.

Especificidade de Ligação a Célula Alvo: Proteína de Fusão EphA2 Solúvel Compete pela Ligação com anti-CD3xEA2 (VH/VL) Desimunizado

5 A especificidade de ligação ao alvo de BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado foi testada em um teste de competição. Neste sentido, 200.000 Células A549 positivas para EphA2 foram incubadas com 5 µg/ml do constructo BiTE baseado em EA2 tanto na presença quanto na ausência de 50
10 µg/mL de proteína de fusão EphA2 Fc solúvel por 30 minutos em gelo. As células foram subsequentemente lavadas duas vezes em PBS. Ligação do constructo foi então detectada via seus Tag hexahistidina C-terminais usando um anticorpo penta-His murino (diluído 1:20 em 50 µl de PBS com soro fetal de bezerro a 2%; Qiagen; ordem número 34660) seguido
15 por um etapa de lavagem e um anticorpo específico para Fc-gama murino conjugado a ficoeritrina (Dianova, ordem número 115-116-071) diluído 1:100 em 50 µl de PBS com soro fetal de bezerro a 2% (linha cinza). Como controle negativo,
20 somente os anticorpo secundário foi usado (linha preta). Células foram analisadas por citometria de fluxo em um FACS Calibur instrument (Becton Dickinson, Heidelberg).

 Como mostrado em FIG. 17, co-incubação do EphA2-BiTE
25 anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado com um excesso de peso de 10-vezes de proteína de fusão EphA2 Fc solúvel bloqueou completamente a ligação do EphA2-BiTE a Células de câncer pulmonar humano A549. Isto mostra que aligação de EphA2-

BiTE a células tumorais é especificamente mediada pelo reconhecimento do alvo de EphA2.

Especificidade de Célula Alvo de EphA2-BiTE anti-
 5 CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado: Morte de Células Positivas
para Antígeno

Para assegurar a retenção da especificidade de alvo
 após conversão da IgG original no formato BiTE, o teste de
 10 citotoxicidade com células positivas e negativas para
 antígeno foi executado. Para este propósito, células B16F10
 transfectadas com EphA2, uma linhagem celular de melanoma
 de camundongos, foi comparada com células transfectadas. Um
 teste padrão de liberação de cromo usando células T CD8
 15 humanas estimuladas como efetoras a uma razão E:A de 10:1 e
 uma duração de teste de 18 horas foi executado com várias
 concentrações do constructo EphA2-BiTE. Ver FIG. 18.

	EC 50 [ng/ml]
B16 F10 transfectada com EphA2	21,7
B16 F10 não transfectada	n.a.

20 Especificidade de lise celular objetiva foi
 adicionalmente substanciada por BiTE anti-CD3xEA2
 desimmunizado mediando a lise de Células de carcinoma de
 cólon humano SW480 EphA2+ e não células de melanoma SK-
 MEL28 negativas para EphA2. Ver FIG. 19. Anticorpos

parentais específicos para ambos EphA2 e CD3 bloquearam a lise mediada por BiTE anti-CD3xEA2 desimunizado. Assim, a atividade citotóxica do BiTE anti-CD3xEA2 desimunizado depende estritamente da expressão de EphA2 nas células
5 alvo; células negativas para EphA2 são completamente resistentes a lise mediada por BiTE anti-CD3xEA2 desimunizado.

Morte de Células de Câncer Renal e de Carcinoma de 10 Próstata Mediada por EphA2-Bite

Testes de citotoxicidade celular redirecionada baseados em citometria de fluxo foram conduzidos usando células mononucleares de sangue periférico humano
15 enriquecidas em células T CD3+ (PBMC) como células efetoras e linhagens celulares de carcinoma renal EphA2+ ACHN e Caki 2 e linhagens de células de próstata PC3 e DU145 como células alvo. Brevemente, PBMC humana enriquecida com células T CD3+ (RosetteSep; StemCell Technologies) foram
20 isoladas de doadores saudáveis por centrifugação de gradiente de densidade de Ficoll. Células alvo foram marcadas com corante verde fluorescente de membrana 3,3'-di-octadeciloxacarbocianina (DiOC18(3) ou "DiO"; (Molecular Probes)) por 5 minutos a 37° C. Misturas de células
25 efetoras e alvo foram combinadas em uma razão 5:1 e transferidas a uma placa de 96 poços de fundo arredondado. Somente meio ou diluições seriadas de cada constructo BiTE foi adicionado a poços apropriados, incubados por 42 horas a 37° C, e analisados por citometria de fluxo após adição

de iodeto de propídio (PI) a uma concentração final de 1 µg/mL. Lise celular objetiva foi calculada como a porcentagem de células positivas para DiO coradas positivas para PI. Todas as incubações foram conduzidas em duplicata.

5 Cálculos dos valores de EC50 foram conduzidos usando um modelo de ajuste não linear de quatro parâmetros.

Como mostrado em FIG. 20, EphA2-BiTE mediou a lise celular mediada por células T tanto em células de carcinoma renal quanto em células de câncer de próstata.

10

Efeitos de Matança por EphA2-BiTE Sobre Níveis de EphA2 em Células Alvo

15 O teste de citotoxicidade foi executado como descrito acima. Uma vez completado o teste de citotoxicidade, culturas foram colocadas no gelo e deixadas sem tratamento, ou tratadas com 10 µg/mL de isotipo controle não ligante anticorpo monoclonal de camundongo 1A7 ou um anticorpo monoclonal de camundongo anti-EphA2 humana B233 (ver

20 Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36:43-60, o qual é incorporado aqui por referência em sua íntegra). Um anticorpo anti-pentahistidina conjugado a APC se ligou a EphA2-BiTE que permaneceu nas células não tratadas. Um

25 anticorpo anti-IgG (H+L) de camundongo conjugado a APC resolveu a quantidade de isotipo ou B233 ligado a células alvo. A média geométrica da intensidade de fluorescência do controle isotipo, EphA2 e EphA2BiTE versus a dose fornecida

de EphA2-BiTE foi representada por meio de gráfico. Ver FIG. 21.

Dependência da Citotoxicidade pelo Tempo, Razão entre
5 Efetor e Alvo, e Sítios de Ligação do Receptor

Para explorar a cinética e potência de anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimmunizado, vários parâmetros de lise celular redirecionada a tumores foram avaliados. Uma análise do
10 curso temporal de morte de células alvo revelou que na presença de anti-CD3×EA2 (VH/VL), a lise foi limitada por células T CD3+ não estimuladas após 18 horas, e que a mortandade máxima (>80% de lise) ocorreu em 42 horas (FIG. 22A). Na maior parte dos experimentos, a magnitude da lise
15 redirecionada a células T excedeu 80% das células alvo. Como uma medida adicional de potência, a razão de células efetoras para células alvo foi investigada. Razões E:A de 1:1 Até 20:1 deram atividades líticas altas similares, enquanto razões E:A de 1:2 e 1:5 ainda levaram a lise
20 redirecionada de células tumorais SW480, ainda que em uma porcentagem reduzida (FIG. 22B). Notavelmente, os valores de EC50 estimados permaneceram largamente constantes a despeito de variações nos tempos de incubação (FIG. 22A; 1 a 9 ng/mL) ou razão E:A (FIG. 22B; 2 a 7 ng/mL).

25

Células alvo tumorais, as quais expressam diferentes níveis de EphA2 em suas superfícies, foram avaliadas para determinar se havia um limite de densidade de alvos na superfície requerido para a atividade de anti-CD3×EA2

(VH/VL). A eficiência da lise redirecionada a células T foi observada para todas as linhagens celulares expressando EphA2 (FIG. 22C), incluindo células M14, que expressaram tão pouco quanto 2.400 moléculas de EphA2 por célula (FIG. 22D). A magnitude da lise mediada por anti-CD3xEA2 (VH/VL) foi similar para células alvo a despeito de suas densidades de alvos na superfície (FIG. 22D). Entretanto, a densidade de EphA2 na superfície de células alvo teve sim um impacto na eficiência da lise redirecionada. Uma tendência foi observada na qual a potência de anti-CD3xEA2 (VH/VL) aumentou a medida que o número sítios de ligação a EphA2 aumentava nas células tumorais (FIG. 22C). Juntos, estes achados sugerem que anti-CD3xEA2 (VH/VL) pode potentemente e especificamente redirecionar células T humanas não estimuladas a lisar células tumorais expressando EphA2, mesmo quando há baixos níveis de sítios de ligação disponíveis no tumor.

Estabilidade de BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimunizado em Plasma Humano

A estabilidade em plasma do BiTE específico para EphA2 foi testada sob diferentes condições de incubação seguida pela determinação do ED50 de atividade citotóxica em um teste padrão de liberação de cromo-51. Um grupo de plasmas humanos derivados do sangue de cinco doadores saudáveis foi coletado por seringas recobertas com EDTA. Componentes celulares foram removidos por centrifugação e a fase superior do plasma foi coletada e subsequêentemente

agrupada. BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado foi ou incubado a 37° C ou 4° C na presença ou ausência de plasma. Como controles, BiTE foi diluído imediatamente antes do teste de citotoxicidade em plasma ou meio RPMI-1640, repsectivamente. MDA-MB231 serviram como células alvo; PBMC depletados de células NK foram usadas como células efetoras. A razão efetoras:alvo (E:A) foi 10:1. A duração do teste foi de 18 horas. Ver FIG. 23.

EC ₅₀ [ng/ml] de anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado		R ²
24 h em plasma a 37°C	3,1	0,972
Diluído diretamente antes do teste em plasma	1,9	0,977
24 h em plasma a 4°C	2,2	0,977
Diluído diretamente antes do teste em plasma	2,0	0,981

Anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado provou-se estável uma vez que nenhuma perda mojaritária de atividade citotóxica pôde ser detectada após incubação em plasma humano por 24 horas a 37° C.

Exclusão de Epitopo Alvo em Células não Transformadas por anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado

Videomicroscopia foi empregada para visualizar o ataque de células T CD8+ contra células MCF10A não transformadas na presença de BiTE (VH/VL) desimmunizado

anti-CD3 x EA2 e um BiTE controle não excludente de epitopo (ver FIG. 24). Células alvo foram semeadas para crescimento como células aderentes 24 horas antes do início da gravação em vídeo em placas de 48 poços. Diretamente antes da
5 gravação, uma mistura de células T CD8+ e BiTE foram adicionadas aos poços de cultivo. Videomicroscopia foi gravada por 20 horas com aproximadamente uma foto por minuto. Iodeto de propídio (1 µg/ml) foi adicionado aos poços após 18 horas. Fotos individuais foram convertidas em
10 um filme de vídeo AVI, e foram tiradas fotos de luz transmitida e fotos de luz fluorescente.

A análise videomicroscópica durante a duração do teste de 18 horas exemplificou a exclusão de epitopo por BiTE
15 específico para EphA2. Enquanto o BiTE pan-carcinoma usado como controle positivo atacou células MCF10A não transformadas ao longo de toda a monocamada celular intacta (FIG. 24C), o BiTE específico para EphA2 mostrou atividade de células T apenas na borda da camada de células
20 confluyente onde a exclusão de epitopo através de células vizinhas não é possível (FIG. 24A). Na área de uma monocamada intacta, atividade de células T muito baixa foi notada, como visto na ausência de BiTE (FIG. 24B) onde células T são apenas igualmente distribuídas por sobre a
25 monocamada. Uma monocamada de células de carcinoma A549, as quais não suportam exclusão de epitopos de EphA2, foi completamente destruída por células T na presença de anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimunizado. Adição de iodeto de propídeo no fim do teste permite a visualização de células de

carcinoma mortas em grupos com células T. Tais grupos celulares intensamente corados eram presentes ao fim do teste em cada poço exceto em poços controles sem BiTE.

5 Constantes de ligação de anti-CD3xEA2 (VH/VL)
desimunizado por Alvos EphA2

A formação e dissociação de complexos BiTE/EphA2 foi monitorada por ressonância de plasmon de superfície usando
 10 um sistema Biacore 3000. Para este propósito, proteína de fusão Fc EphA2 foi imobilizada em um chip sensor com uma matriz dextrana CM5 carboximetilada. Condições ótimas de uma imobilização foram identificadas através de exploração de pH (acetato de sódio pH 4,0 a pH 5,5; tetraborato
 15 disódico pH 8,5). O valor de pH ótimo foi pH 4,0. Após imobilização de 1000 RU a células de fluxo 2, 5.000 RU a células de fluxo 3 e 400 RU a células de fluxo 4, grupos reativos em excesso foram desativados por etanolamina. A afinidade do BiTE anti-EphA2 a EphA2 imobilizado foi
 20 determinada pela injeção de diferentes concentrações do analito desimmunizado VHVL anti-CD3xEA2 diluído em tampão HBS-EP. Para regenerar a superfície, tampão REGEN (NaOH a 50 mM; MES a 20 mM; NaCl a 1 mM pH 6,4) foi empregado.

anti-CD3x EA2 (VH/VL) desimunizado	
K_d	$4,26 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
K_a	$9,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
K_D	$4,46 \times 10^{-8} \text{ M}$

EFICÁCIA IN VIVO DE BITE ANTI-CD3xEA2 (VH/VL)
DESIMUNIZADO ESPECÍFICO PARA EPHA2

Anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado é específico para
5 CD3 humano e EphA2 primata e portanto não se liga a CD3 ou
EphA2 de camundongo. Anti-tum do BiTE anti-CD3xEA2 (VH/VL)
desimmunizado EphA2 pode então apenas ser estudado em
camundongos NOD/SCID com um modelo de xenotransplante de
carcinoma de cólon humano.

10

Modelo de Xenotransplante SW480 NOD/SCID

A linhagem celular SW480 de carcinoma de cólon humano
foi selecionada para o estabelecimento de um modelo de
15 xenotransplante uma vez que células SW480 que expressam
EphA2 e anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado demonstrou
redirecionar a lise de células SW480 *in vitro*.

5x10⁶ células SW480 foram misturadas com 2,5 x 10⁶
20 células T CD3+ humanas de doadores saudáveis em um volume
final de 0,2 mL de PBS resultando em uma razão E:A de 1:2.
As misturas de células T efetoras/células SW480 foram
injetadas subcutaneamente no flanco direito de cada
camundongo NOD/SCID. Tumores SW480 crescendo
25 subcutaneamente foram medidos três vezes por semana com um
compasso de calibração em duas dimensões perpendiculares e
os volumes tumorais calculados de acordo com a fórmula:
volume tumoral = [(largura² * comprimento)/2].

6.4.2 Projeto de Estudo

Seis animais por grupo foram tratados intravenosamente com veículo controle de PBS, BiTE controle não relevante ou
 5 anti-CD3xEA2 (VHVL) desimmunizado por cinco dias consecutivos iniciando uma hora após a inoculação subcutânea de células T CD3+ e inoculação de células tumorais SW480 de acordo com a Tabela abaixo.

10 Animais nos grupos I e J receberam adicionalmente $2,5 \times 10^6$ células efetoras CD3+ através de injeção na veia caudal 5 minutos após a inoculação de células tumorais SW480 para estimular a presença de células T periféricas.

Grupo	N	Células efetoras (Células T CD3+)	Células alvo (SW480)	Razão E:A	Tratamento	Dose
A	6		5×10^6	-	PBS i.v. dia 0-4	100 μ l
B	6		5×10^6	-	anti-CD3xEA2 desimmunizado i.v. dia 0-4	20 μ g
C	6	$2,5 \times 10^6$	5×10^6	1:2	PBS i.v. dia 0-4	100 μ l
D	6	$2,5 \times 10^6$	5×10^6	1:2	BiTE Controle não relevante i.v. dia 0-4	100 μ g
E	6	$2,5 \times 10^6$	5×10^6	1:2	anti-CD3xEA2	100

					desimunizado i.v. dia 0-4	µg
F	6	$2,5 \times 10^6$	5×10^6	1:2	anti-CD3×EA2 desimunizado i.v. dia 0-4	20 µg
G	6	$2,5 \times 10^6$	5×10^6	1:2	anti-CD3×EA2 desimunizado i.v. dia 0-4	5 µg
H	6	$2,5 \times 10^6$	5×10^6	1:2	anti-CD3×EA2 desimunizado i.v. dia 0-4	1 µg
I	6	$2,5 \times 10^6$ + $2,5 \times 10^6$ i.v.	5×10^6	1:2	PBS i.v. dia 0-4	100 µl
J	6	$2,5 \times 10^6$ + $2,5 \times 10^6$ i.v.	5×10^6	1:2	anti-CD3×EA2 desimunizado i.v. dia 0-4	20 µg

In Vivo Anti-Tum de Anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado

Especificidade e Reprodutibilidade do Modelo SW480

5

Inoculação de células SW480 somente sem células efetoras seguida por tratamento com PBS (grupo A) ou anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado (grupo B) levou aos primeiros tumores palpáveis no dia 4 após inoculação e camundongos tiveram que ser sacrificados no dia 30 em virtude das grandes massas tumorais ($>1 \text{ cm}^3$). Não houve diferença na cinética de crescimento tumoral entre os grupos de

10

tratamento com PBS e anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado indicando que BiTE EphA2 não tinha efeito antitumoral na ausência de células efectoras. Ver FIG. 26.

5 Inoculação de misturas de tumores SW480 e células T humanas seguido por tratamento com veículo controle PBS (grupo C), ou BiTE controle não relevante (grupo D); o qual compartilha o braço ligante CD3 com anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimmunizado mas tem uma braço alvo diferente também não
10 afetou o crescimento tumoral demonstrando que nem o braço BiTE anti-CD3 por si só nem células T sozinhas tinham qualquer atividade antitumoral. Assim, tratamento com o BiTE controle não relevante mostrou o mesmo efeito do que o tratamento com o veículo PBS. Ver FIG. 26.

15

 Por fim, injeção intravenosa de células T CD3+ adicionais 5 minutos antes da inoculação de células tumorais mimetizando a presença de células T periféricas não influenciou o crescimento tumoral (grupo I). Ver FIG.
20 26.

 Nenhuma diferença significativa no crescimento tumoral foi observado entre todas as condições controle testadas abaixo. Isto também mostra uma grande robustez e
25 reprodutibilidade do modelo de crescimento tumoral SW480 NOD/SCID com as doses de células tumorais selecionadas. Ver FIG. 26.

Inibição Dependente de Dose do Crescimento Tumoral por
Anti-CD3xEA2 (VH/VL) Desimunizado

Tratamento com anti-CD3xEA2 (VH/VL) desimunizado
5 induziu uma inibição dependente da dose do crescimento de
tumores SW480 na presença de células T CD3+ efectoras.

Enquanto o tratamento com 1 µg de anti-CD3-EA2
desimunizado mostrou quase nenhum efeito sobre o
10 crescimento tumoral, todas as outras doses testadas (5, 20
e 100 µg diários por cinco dias) causaram uma inibição
significativa do crescimento tumoral. Com doses diárias de
5 µg, o volume tumoral foi significativamente menor nos
dias 3-9, e significativamente menor nos dias 18, 20 e 27
15 comparados com o grupo de BiTE controle não relevante. O
volume tumoral de camundongos tratados com 20 µg de anti-
CD3xEA2 (VH/VL) desimunizado foi significativamente menor
quando comparado àqueles de camundongos tratados com BiTE
controle não relevante em todos os pontos de tempo
20 analisados. Finalmente, tratamento com 5x 100 µg de anti-
CD3xEA2 (VH/VL) desimunizado levou a diferenças altamente
significativas em todos os pontos de tempo analisados e não
mostrou nenhum crescimento tumoral por duas semanas após o
tratamento com BiTE. Tratamento com BiTE controle não
25 relevante mostrou o mesmo efeito que o tratamento com o
veículo PBS. Ver FIG. 27.

Nenhum Efeito de Células T Periféricas sobre o Efeito
Antitumoral de Anti-CD3xEA2 (VH/VL) Desimunizado

Em contraste com a situação em um modelo de xenoimplante onde nenhuma célula T humana está presente na periferia, a eficácia do anti-CD3×EA2 desimunizado pode ser influenciada por células T circulantes que podem prender a molécula na periferia e assim reduzir o direcionamento específico para tumores de anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizados. Para mimetizar este cenário, dois grupos de camundongos foram adicionalmente injetados intravenosamente com células T humanas para proporcionar uma população de células T humanas periféricas.

A administração i.v. de células T humanas adicionais não teve influência sobre a eficácia de anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado. Crescimento de tumores SW480 nos grupos F (tratamento com 20 µg de anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado/injeção) e J (tratamento com 20 µg de anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado/injeção após injeção i.v. de $2,5 \times 10^6$ células T adicionais) foi quase idêntico. Em ambos os grupos, o tratamento com anti-CD3×EA2 (VH/VL) desimunizado induziu inibição do crescimento tumoral altamente significativa quando comparado com camundongos tratados com PBS ou camundongos tratados com PBS e células T circulantes adicionais. Ver FIG. 28.

GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BITE ANTI-EPHA2 HUMANIZADO

A seguinte informação detalha a geração e caracterização de anticorpos humanizados anti-EphA2 usados

na construção de BiTEs anti-EphA2. BiTEs candidatos foram
construídos a partir de anticorpos que foram humanizados,
capazes de se ligar a EphA2 de cinomolgus e humano, e não
se ligavam a tecido cardíaco normal humano.

5

Dois anticorpos monoclonais murinos anti-EphA2, B233
(ver FIG. 29) e EA2 (FIG. 1), foram humanizados e
produziram 3F2 (derivado de B233; FIG. 30) e 4H5 (derivado
de EA2). Otimização da afinidade foi executada como
10 descrito em detalhes abaixo, e em Dall'Acqua et al., 2005,
Methods 36:43-60, o qual é incorporado aqui por referência
em sua íntegra.

OTIMIZAÇÃO DA AFINIDADE DE ANTICORPOS EphA2

15

Otimização da afinidade de 4H5

A seguinte informação detalha a otimização da
afinidade do anticorpo monoclonal humanizado antiEphA2 de
20 humano 4H5 para produzir as três variantes otimizadas por
afinidade 2A4, 2E7, e 12E2. Para maiores detalhes a
respeito da produção de variantes otimizadas por afinidade,
e em particular, 2A4, 2E7, e 12E2, favor ver U.S.
Provisional Appn. No. 60/751.964, registrada em 21 de
25 dezembro de 2005, intitulado "Afinity Optimized EphA2
Agonistic Antibodies and Methods of Use Thereof", a qual é
incorporada aqui por referência em sua íntegra.

Reagentes

Todos os reagentes químicos são de grau analítico. Enzimas de restrição e enzimas modificadoras de DNA, ligase T4 e DNA polimerase T7 foram compradas de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Oligonucleotídeos customizados foram sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA). Proteína de fusão Fc-EphA2 humana (consistindo de um ectodomínio de EphA2 de humano fusionada com a porção Fc de uma IgG1 humana) foi expressa em células 293 de rim embrionário humano (HEK) e purificada por cromatografia de afinidade com proteína G usando protocolos padrão. Biotinilação de Fc-EphA2 humana foi realizada usando um conjunto de biotinilação EZ-Link Sulfo-NHS-LC de acordo com as instruções do fabricante (Pierce, Rockford, IL).

Humanização de Anticorpo Monoclonal Murino EA2 Anti-EphA2 por Tecnologia de Embaralhamento de Armação

A humanização do anticorpo monoclonal murino parental EA2 foi realizada usando a tecnologia de embaralhamento de armação como descrito em detalhes em Dall'Acqua et al., 2005, *Methods* 36:43-60, e em *U.S. Patent Pub. No. US-2005/0048617 A1*, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua íntegra. Essencialmente, regiões CDR de ambas as regiões VL de EA2 e VH de EA2 são transplantadas em bibliotecas de seqüências de armações humanas de linhagens germinativas em uma forma combinatória, criando um mosaico de variantes humanizadas que retêm a ligação a EphA2. Um tal clone humanizado, 4H5, exibiu um aumento de

afinidade de aproximadamente 20 vezes quando comparado com Fab EA2 quimérico. Este clone foi escolhido como molde para maturação de afinidade e foi subsequentelemente otimizado como descrito abaixo, resultando nos variantes 2A4, 2E7 e
 5 12E2.

Otimização da afinidade de scFv de 4H5

Construção do Molde scFv

10

As regiões variáveis do anticorpo monoclonal humanizado 4H5 foram clonadas com um fragmento scFv em um vetor de expressão M13 (Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36:43-60, o qual é incorporado aqui por referência em sua
 15 íntegra). A região variável leve do 4H5 foi combinada com a extremidade 3'da cadeia pesada variável do 4H5 por um ligante [(Gly)4Ser]3, e seguido por um marcador FLAG e um marcador His na sua extremidade C-terminal (FIG. 31). Constructos foram gerados usando PCR e os seguintes *primers*
 20 para amplificar as regiões variáveis em reações separadas:

Medi-VH8: TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTG CAG
 CTG TTG SAG TCT G (5' *primer* para amplificar VH, S=C/G)
 (SEQ ID NO:120)

25

Medi-JH1: GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC
 TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC (3' *primer* para amplificar VH) (SEQ ID NO:121)

Medi-VK1: GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT TCT
 GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC (5' *primer* para VL, W=A/T)
 (SEQ ID NO:122)

5 Medi-JK4: TGG AAT TCG GCC CCC GAG GCC ACG TTT GAT
 CTC CAC CTT GGT CCC (3' *primer* para VL) (SEQ ID NO:123),
 onde as seqüências sublinhadas correspondem ao ligante
 [Gly]₄Ser]₃, e letras em **negrito** e *itálico* denotam o sítio
 de restrição Sfi I. PCR de sobreposição foi usado para
 10 construir o fragmento scFv o qual foi então restringido por
 Sfi I e clonado dentro do vetor MD 102. As regiões
 variáveis de EA2 parental murino foram clonadas da mesma
 maneira para servir como um scFv controle. O constructo
 scFv de 4H5 foi então expresso em CJ236 para produzir
 15 uridina + ssDNA como descrito em Wu e An, 2003, Methods
 Mol. Biol. 207:213-234, o qual é incorporado aqui por
 referência em sua íntegra. Este scFv U+ ssDNA de 4H5 foi
 usado como molde para as reações mutagênicas de otimização
 da afinidade que seguem. As seqüências de nucleotídeos e
 20 aminoácidos do scFv de 4H5 são descritas na FIG. 32.

Otimização da afinidade de scFv por Aleatorização Parcimoniosa de Cada Região CDR

25 Cada aminoácido de todas as 6 Regiões Determinantes de
 Complementaridade (CDR) foi individualmente, aleatoriamente
 mutado usando duas bibliotecas separadas por aminoácido (Wu
 e An, 2003, Methods Mol. Biol. 207:213-234, o qual é
 incorporado aqui por referência em sua íntegra).

Codificando ou 8 aminoácidos (NSS) ou 12 aminoácidos (NWS) em cada posição de aminoácido CDR, cada *primer* degenerado individual foi usado em uma reação de mutagênese por hibridização simples (Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212, e Dall'Acqua et. al., 2005, Methods 36:43-60, cada um dos quais sendo incorporado aqui por referência em sua íntegra), e então combinado para geração de uma biblioteca de CDR correspondente. Brevemente, cada *primer* degenerado foi fosforilado, então usado em uma razão 10:1 com modelo de U+ DNA uridinilado de scFv de fita única de 4H5 (preparado como descrito em Wu e An, 2003, Methods Mol. Biol. 207:213-234) em uma reação de anelamento onde a temperatura foi baixada de 95° C para 55° C por 1 hora. Ligase T4 e DNA polimerase T7 foram adicionados à reação de anelamento e a reação foi incubada por 1,5 horas a 37° C. Os produtos sintetizados para cada aminoácido de cada CDR foram agrupados, entretanto as bibliotecas NSS e NWS foram mantidas segregadas e filtradas independentemente. Tipicamente, 1 µL do DNA sintetizado das bibliotecas de CDR agrupadas foram então eletroporadas em XL1-Blue para formação de placas em campo de bactérias XL1-Blue ou produção de fragmentos scFv como descrito em Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212.

25 Filtração das Bibliotecas

Filtro primário

O filtro primário consistiu de um ELISA de ponto único (SPE) o qual foi realizado usando sobrenadantes contendo proteína scFv solúvel, secretada preparada a partir de 1 mL de cultura bacteriana crescida em placas de 96 poços fundos e infectada com clones M13 recombinantes individuais essencialmente como descrito em Wu, 2003, *Methods Mol. Biol.* 207:197-212, e Dall'Acqua et. al., 2005, *Methods* 36:43-60. Brevemente, este ELISA de Captura envolve o recobrimento de poços individuais de um Maxisorp Immunoplate de 96 poços com aproximadamente 30 ng de um anticorpo de camundongo anti-FLAG (Sigma), bloqueando com BSA a 3%/PBS por 2 horas a 37° C e incubando com amostras (scFv solúveis secretados) por 2 horas em temperatura ambiente. 150-600 ng/poço de Fc-EphA2 de humum biotinilado foi então adicionado por 2 horas em temperatura ambiente. Isto foi seguido por incubação com conjugado de neutravidina-peroxidase de raiz forte (HRP) (Pierce, IL) por 40 minutos a temperatura ambiente. Atividade de HRP foi detectada com substrato de tetra metil benzidina (TMB) e a reação foi extinta com 0,2 M H₂SO₄. Placas foram lidas a 450 nm.

Resultados do Filtro Primário

Tipicamente, clones exibindo um sinal de OD 450 nm aproximadamente duas vezes maior do que a de scFv de 4H5 parental foi recrescido em uma escala de 15 mL, e testado novamente pelo mesmo ELISA em poços duplicados para confirmar o resultado positivo. Clones os quais repetiram

foram então seqüenciados e ensaiados usando uma ELISA de atividade (ver abaixo) para estimar o aumento da multiplicação de ligação a EphA2 de humano.

5 Filtro Secundário

De modo a caracterizar adicionalmente as variantes de afinidade otimizadas com uma mudança previamente identificadas, um filtro secundário usando fragmentos de
10 scFv secretados expressos de culturas bacterianas de 15 mL (ver Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212) foi realizado. Mais precisamente, dois ELISAS foram usados: (i) um ELISA de atividade no qual poços individuais de uma Maxisorp Immunoplate de 96 poços foram recobertos com BSA a
15 3%/PBS por 2 horas a 37° C. Amostras serialmente diluídas por 2 vezes foram então adicionadas e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Incubação com um conjugado de anti-kappa humano feito em cabra com peroxidase de raiz forte (HRP) então se seguiu. Atividade de HRP foi detectada
20 com substrato TMB e a reação extinta com 0,2 M de H₂SO₄. Placas foram lidas a 450 nm; (ii) uma quantificação de anti-scFv por ELISA, o qual foi realizado essencialmente como descrito em Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212. Brevemente, poços individuais de uma placa Ni NTA de 96
25 poços (Qiagen) incubados com amostras serialmente diluídas 2 vezes ou padrão (50-0,78 ng/mL). Incubação com um conjugado de anti-FLAG feito em camundongo com peroxidase de raiz forte (HRP) então se seguiu. Atividade de HRP foi

detectada com substrato TMB e a reação extinta com 0,2 M de H_2SO_4 . Placas foram lidas a 450 nm.

Resultados do Filtro Secundário

5

O filtro de ELISA secundário em duas partes descrito acima permitiu a comparação do scFv de 4H5 e os variantes otimizados para afinidade um com o outro em termos de ligação a EphA2 de humano ao normalizar suas concentrações de scFv. Todos os clones variantes de scFv de mudança simples com afinidade otimizada exibiram melhor ligação a EphA2 de humano quando comparados com o scFv parental de 4H5 (dado não mostrado).

15

Construção e Caracterização de Variantes Combinatórias a Partir de Clones Otimizados para Afinidade por CDR

20

25

Para projetar variantes combinatórias com melhoras adicionais em ligação, todas as mudanças de aminoácidos simples que melhoraram a ligação quando comparados ao scFv parental de 4H5 por ELIAS de atividade/quantitativo foram combinados para criar uma pequena biblioteca combinatória focada. Brevemente, *primers* degenerados codificando todas as mudanças de aminoácidos identificadas assim como o aminoácido parental na mesma posição foram projetados. Em uma reação de anelamento onde todos os *primers* foram incluídos e a síntese se seguiu (*supra*), uma biblioteca combinatória foi construída e filtrada como previamente descrito *supra*.

Resultados da Filtração Primária sobre EphA2

Tipicamente, clones exibindo um sinal de OD 450 nm
5 aproximadamente duas vezes maior do que a de scFv parental
de 4H5 foi recrescido em uma escala de 15 mL, e reensaiado
por ELISA (descrito *supra*) em poços duplicados para
confirmar o resultado positivo. Dezesseis variantes
combinatórias foram então selecionadas e seqüenciadas
10 identificando 11 combinações únicas de mudanças de
aminoácido CDR assim tornando cada variante diferente uma
das outras por um a três aminoácidos no nível de sua
seqüência primária.

15 Resultados da Filtração Secundária sobre EphA2

As 11 variantes combinatórias únicas descritas acima
foram analisadas por um filtro secundário como descrito
acima para estimar a melhora nas afinidades de ligação das
20 variantes combinatórias. Todas as variantes tinham
afinidades significativamente melhoradas para EphA2 de
humano quando comparadas a 4H5 scFv. As seqüências de
nucleotídeos e aminoácidos das três variantes combinatórias
otimizadas para afinidade 2A4, 2E7 e 12E2 são mostradas nas
25 FIGS. 33, 34 e 35, respectivamente. Dados para as três
variantes combinatórias otimizadas para afinidade 2A4, 2E7
e 12E2 são mostrados da FIG. 36. FIG. 37 mostra o
alinhamento da seqüência de aminoácidos das variantes

otimizadas para afinidade 2A4, 2E7 e 12E2 com o scFv humanizado de 4H5.

Análise de Ligação

5

2A4, 2E7 e 12E2 assim como scFv parental de EA2 e scFv humanizado de 4H5 foram induzidos para expressão em *E. coli* em um volume de cultura de 1L. Os sobrenadantes contendo fragmentos de scFv solúveis, secretados, foram centrifugados para remover os restos celulares então passados por uma coluna anti-FLAG (Sigma) para purificar e isolar as proteínas variantes. As variantes otimizadas para afinidade purificadas foram analisadas por detecção de ressonância de plasmon de superfície usando um instrumento BIAcore 3000 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Suécia). Variantes humanizadas otimizadas para afinidade de EA2 exibiram aumento de 110-150 vezes na afinidade quando comparadas ao scFv parental anti-EphA2 de EA2. Para resultados de medida de afinidade, ver a Tabela na Seção 6.6, *infra*.

20

Otimização da afinidade de Anticorpo Murino B233

Anti-EphA2 de humano

25

A humanização da molécula parental de anticorpo monoclonal B233 foi realizada usando a tecnologia de embaralhamento de armação como descrito em detalhe por Dall'Acqua et al., 2005, *Methods* 36:43-60, o qual é incorporado aqui por referência em sua íntegra.

Essencialmente, regiões CDR de ambas as regiões VL do B233 e VH do B233 foram transplantadas em bibliotecas de seqüências de armações humanas de linhagens germinativas em uma forma combinatória, criando um mosaico de variantes humanizadas que retêm a ligação a EphA2. Um tal clone humanizado, 2G6, exibiu uma perda de afinidade de aproximadamente 10 vezes quando comparado com anticorpo monoclonal B233 quimérico. Este clone foi escolhido como molde para maturação de afinidade e foi subseqüentemente otimizado como descrito abaixo, resultando na variante 3F2.

Construção e Caracterização de Variantes Combinatórias

Para projetar uma variante combinatória com ligação a EphA2 de humano melhorada, todas as mudanças de aminoácidos simples que melhoraram a ligação quando comparados ao B233 parental foram combinados para criar uma pequena biblioteca combinatória focada. Brevemente, *primers* degenerados (ver FIG. 38) codificando todas as mudanças de aminoácidos identificadas assim como o aminoácido parental na mesma posição foram projetados. Uma reação de anelamento foi realizada onde todos os *primers* foram incluídos e a síntese se seguiu, essencialmente com descrito em Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36: 43-60 e Wu, 2003. Methods Mol. Biol. 207:197-212, os quais ambos são incorporados aqui por referência em suas totalidades. Uma biblioteca combinatória foi construída e então filtrada.

Filtração das Bibliotecas

Filtro primário

O filtro primário consistiu de uma ELISA de ponto
5 único (SPE) o qual foi realizado usando extratos de Fab
periplásmicos preparados com culturas bacterianas crescidas
em 1mL em placas de 96 poços fundos e infectadas com clones
M13 recombinantes individuais essencialmente como descrito
em Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36: 43-60 e Wu, 2003.
10 Methods Mol. Biol. 207:197-212. Brevemente, este ELISA de
Captura envolve o recobrimento de poços individuais de um
Maxisorp Immunoplate de 96 poços com aproximadamente 20 ng
de um anticorpo de cabra anti-Fab de humano, bloqueando com
BSA a 3%/PBS por 2 horas a 37° C e incubando com amostras
15 (Fabs expressos no periplasma) por 2 horas em temperatura
ambiente. 300 ng/poço de Fc-EphA2 de humum biotinilado foi
então adicionado por 2 horas em temperatura ambiente. Isto
foi seguido por incubação com conjugado de neutravidina-
peroxidase de raiz forte (HRP) (Pierce, IL) por 40 minutos
20 a temperatura ambiente. Atividade de HRP foi detectada com
substrato de tetra metil benzidina (TMB) e a reação foi
extinta com 0,2 M H₂SO₄. Placas foram lidas a 450 nm.

Resultados do Filtro Primário

25

Tipicamente, clones exibindo um sinal de OD 450 nm
pelo menos duas vezes maior do que a de 2G6 parental foram
recrescidos em uma escala de 15 mL, e reensaiados por ELISA
em poços duplicados para confirmar o resultado positivo.

Clones que repetiram foram então seqüenciados e ensaiados por uso de um ELISA de atividade (ver abaixo) para estimar as multiplicações no aumento da ligação a EphA2 de humano.

5 Filtro Secundário

De modo a caracterizar adicionalmente as variantes de afinidade otimizadas previamente identificadas (ver acima), um filtro secundário usando fragmentos de Fab expressos em
10 extratos periplásmicos de culturas bacterianas de 15 mL (ver Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212) foi realizado. Mais precisamente, dois ELISAs foram usados: (i) um ELISA de atividade no qual poços individuais de uma Maxisorp Immunoplate de 96 poços foram recobertos com ~ 1
15 µg de Fc-EphA2 de humum e bloqueado com BSA a 3%/PBS por 2 horas a 37° C. Amostras serialmente diluídas por 2 vezes foram então adicionadas e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Incubação com um conjugado de anti-*kappa* humano feito em cabra com peroxidase de raiz forte
20 (HRP) então se seguiu. Atividade de HRP foi detectada com substrato TMB e a reação extinta com 0,2 M de H₂SO₄. Placas foram lidas a 450 nm; (ii) um ELISA de quantificação de anti-Fab de humano que foi realizado essencialmente como descrito em Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212.
25 Brevemente, poços individuais de uma placa Biocoat de 96 poços (BD Biosciences, CA) foram incubados com amostras serialmente diluídas 2 vezes ou padrão (Fab de IgG humano, 100-1,56 ng/mL). Incubação com um conjugado de anti-*kappa* humano feito em cabra com peroxidase de raiz forte (HRP)

então se seguiu. Atividade de HRP foi detectada com substrato TMB e a reação extinta com 0,2 M de H₂SO₄. Placas foram lidas a 450 nm.

5 Resultados do Filtro Secundário

O filtro de ELISA secundário em duas partes descrito na Seção acima permitiu a comparação do Fab de 2G6 e os variantes otimizados para afinidade um com o outro em termos de ligação a EphA2 de humano. Uma destas variantes combinatórias de Fab otimizadas para afinidade foi escolhida para análise mais extensiva (variante nomeada 3F2 daqui em diante). A sequência de aminoácidos das regiões variáveis dos anticorpos monoclonais B233 murino, 2G6 humanizado e o 3F2 otimizado para afinidade foram alinhados na FIG. 39.

20 Clonagem, Expressão e Purificação das Várias Versões de Anticorpo Monoclonal B233 Humanizados e Otimizados para Afinidade em um Formato de IgG1 de Humanos

As regiões variáveis de clone humanizado 2G6 com armação embaralhada e a variante humanizada 3F2 otimizada para afinidade foram amplificadas por PCR a partir de vetores fago M13 codificando as regiões V correspondentes usando DNA polimerase *pfu*. Eles foram então individualmente clonados em vetores de expressão de mamíferos codificando uma região intensificadora, promotora e 5' não traduzida imediatamente próxima de citomegalovírus humano maior

(hCMVie) (Boshart et al., 1985, Cell 41:521-530, o qual é incorporado aqui por referência em sua íntegra). Neste sistema, uma cadeia $\gamma 1$ de humano é secretada junto com uma cadeia κ de humano (Johnson et al., 1997, Infect. Dis. 176:1215-1224, o qual é incorporado aqui por referência em sua íntegra). Os diferentes constructos são expressos transientemente em células HEK 293 e colhidas 72 e 144 horas após a transfecção. As IgGls humanas solúveis secretadas foram purificadas a partir do meio condicionado diretamente com colunas HiTrap de proteína A e proteína G com 1mL de acordo com as instruções do fabricante (APBiotech, Inc., Piscataway, NJ). IgGls humanas purificadas (tipicamente homogeneidade > 95%, como julgado por SDS-PAGE) foram dialisadas contra salina tamponada de fosfato (PBS), instantaneamente congelada e estocada a -70° C.

Análise em Biacore

A interação das IgGs solúveis B233, 2G6, e 3F2 com Fc de EphA2 imobilizado foi monitorada por detecção por ressonância de plasmon de superfície usando um instrumento Biacore® 3000 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Suécia) essencialmente como escrito em W.F. Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36 (2005) 43-60. Ver também Seção 6.6.2, *infra*. Medidas de afinidade de B233 quimérico, 2G6 humanizado, e 3F2 otimizado para afinidade são dados na Tabela abaixo.

Cinética para	$k_{on} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{off} \text{ s}^{-1}$	$K_D \text{ (pM)}$

EphA2 de humano			
B 233 quimérico	$2,4 \times 10^5$	$8,0 \times 10^{-5}$	300
2G6 humanizado	$6,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^{-4}$	3000
3F2 otimizado para afinidade	$1,89 \times 10^5$	$1,27 \times 10^{-4}$	671

MEDIDAS DE AFINIDADE DOS EphA2-BiTEs

Os seguintes descrevem as constantes de afinidade dos EphA2-BiTEs da invenção como medidos por ressonância de plasmon de superfície.

Anti-CD3 de Humano

Medida de ressonância de plasmon de superfície usando CD3 ϵ y solúvel imobilizado é fornecido. Associação bifásica de moléculas BiTE a CD3 ϵ y previne cálculos acurados da taxa de ligação e constantes de afinidade.

Anti-CD3 x EA2 VH/VL desimmunizado 400-500 nM (est.)

Anti-EphA2 de humano

Medidas de ressonância de plasmon de superfície usando Fc de EphA2 imobilizado na superfície é fornecido:

Anti-CD3 x EA2 VH/VL desimunizado (MT) 45 nM

Anti-CD3 x EA2 VH/VL desimunizado (MedI) 113 nM

5

Medidas de Afinidade (K_D) de scFvs

A Tabela abaixo provê um resumo das cinéticas de ligação dos scFvs anti-EphA2 de humano. Associação de scFv monomérico anti-EphA2 a EphA2 como determinado por ligação em ressonância de plasmon de superfície. Otimização da afinidade produziu três scFvs com aumento de 20-30 vezes na afinidade (K_D) a EphA2 de humano quando comparados a 4H5.

scFv	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D	Diferença em relação a K_d (vs. 4H5)
EA2	$3,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^{-2}$	870 nM	-4,8 x
4H5	$1,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-2}$	180 nM	1 x
2 ^a 4	$6,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^{-3}$	5,7 nM	32 x
2E7	$5,6 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-3}$	7,3 nM	25 x
12E2	$5,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-3}$	7,8 nM	23 x

15

CARACTERIZAÇÃO DE BITES HUMANIZADOS ANTI-EPHA2 DE HUMUM

Análise da Ligação por Citometria de Fluxo DE Anticorpos Parentais Humanizados Anti-EphA2 para EphA2 Humano e de Cinomolgus

20

Monocamadas subconfluentes de carcinoma de cólon SW480 ou células CHO transfectadas com EphA2 de Cinomolgus foram rapidamente tripsinizadas, lavadas, contadas, plaqueadas em 5 placas de 96 poços com fundo redondo, e coradas com 10 µg/mL de um anticorpo controle negativo (R347), o anticorpo murino anti-EphA2 de humano, EA2 (Coffman 2003), ou anticorpos humanizados, 3F2 e 4H5. Células foram ressuspensas em AlexaFluor 488 anti-camundongo ou H+L de 10 IgG anti-humano (Invitrogen) e então analisados por citometria de fluxo usando um FACSCalibur (Becton Dickinson). Como mostrado em FIG. 40, EA2, 3F2, e 4H5 cada se ligou a EphA2 humano e de Cinomolgus.

15 Propriedades da Exclusão de Epitopo de Anticorpos
Parentais Humanizados Anti-EphA2

Monocamadas de células MCF-10^a ou MDA-MB-231 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro por pelo menos 24 horas 20 a 37° C antes de serem coradas. Monocamadas de células foram fixadas em paraformaldeído a 4 % (2 minutos, 25° C) antes da incubação com anticorpo primário (clone G5 (controle negativo), EA5, EA2, 3F2, ou 4H5) por 30 minutos seguido por coloração subsequente com anti-IgG de 25 camundongo feito em cabra conjugado a AlexaFluor 488 ou anti-IgG de humano feito em cabra conjugado a AlexaFluor 488 (The Jackson Laboratory). As células foram fixadas para análises por microscopia de imunofluorescência. Como mostrado em FIG. 41, 3F2 e 4H5 se ligaram a EphA2 em ambas

as células epiteliais de mama não transformadas e transformadas. Assim, 3F2 e 4H5 não compartilharam a habilidade única de EA2 em se ligar a um epitopo EphA2 acessível em células malignas mas seletivamente excluídas pela arquitetura normal de células epiteliais não transformadas. As seqüências de aminoácidos dos domínios VL e VH do anticorpo G5 são mostradas na FIG. 42.

Análise da Reatividade Cruzada Tecidual

10

A avaliação da reatividade cruzada tecidual dos anticorpos humanizados anti-EphA2 a tecido cardíaco humano determinou que 3F2 e 4H5 não se ligaram a tecido cardíaco normal em concentrações de até 10 µg/ml.

15

A reatividade cruzada tecidual também foi avaliada para as variantes combinatórias de scFv 2A4, 12E2, e 2E7. Nenhuma das variantes combinatórias de scFv (2A4, 12E2, 2E7) corou tecido cardíaco normal (2 doadores) em concentrações de até 50 10 µg/ml (dados não mostrados).

20

Caracterização de BiTE Anti-Constructos 3F2 de EphA2

Os constructos de BiTE baseados em 3F2 produzidos são descritos na Tabela abaixo e foram adicionalmente caracterizados por testes de citotoxicidade.

25

Posição N-Terminal	Posição C-Terminal
3F2 (VH/VL)	anti-CD3 (VH/VL)

3F2 (VL/VH)	desimunizado
anti-CD3 (VH/VL)	3F2 (VH/VL)
desimunizado	3F2 (VL/VH)

Testes de citotoxicidade baseados em liberação de Cromo-51 foram executados para determinar a lise celular objetiva redirecionada pelos vários BiTE anti-constructos de EphA2 na presença de células T CD8+ humanas estimuladas. Células tumorais da linhagem MDA-MB-231 positivas para EphA2 foram carregadas com cromo-51 e servidas como células alvo. Os vários BiTE anti-constructos de EphA2 foram titulados ao longo de uma latga escala de concentrações. O teste durou 18 horas, e a razão efetora-paraalvo foi 10:1. Concentrações de EphA2-BiTe para metade da lise máxima (isto é, EC 50) com diferentes lotes de produção foram estimadas usando um modelo de ajuste não linear de quatro parâmetros. Ver FIG. 43.

Testes de citotoxicidade celular redirecionada baseados em citometria de fluxo foram conduzidos como listado acima usando células mononucleares de sangue periférico humanas enriquecidas em células T CD3+ (PBMC) como células efetoras e células de carcinoma de cólon EphA2+ SW480. Ver FIG. 44.

Medida de citotoxicidade *in vitro* (FIGS. 43 e 44) dos quatro BiTEs de cadeia simples anti-constructos de EphA2 baseados em 3F2 (Tabela acima) sugeriram que a potência (isto é, EC₅₀) do BiTE 3F2 não foi superior ao BiTE EA2

murino. Estes resultados estabeleceram que BiTEs humanizadas anti-EphA2 redirecionaram células T humanas para lisar células tumorais EphA2+.

5 Caracterização de BiTE 4H5 Anti-Constructos de EphA2

Os BiTEs anti-constructo de EphA2 4H5 produzidos são descritos na Tabela abaixo e foram adicionalmente caracterizados

10

Posição N-Terminal	Posição C-Terminal
4H5 (VH/VL)	(VH/VL) desimunizado anti-CD3
4H5 (VL/VH)	
(VH/VL) desimunizado anti-CD3	4H5 (VH/VL)
	4H5 (VL/VH)

Especificidade de Ligação a Célula Alvo de BiTEs anti-EphA2 baseados em 4H5 a Células que Expressam EphA2+ e CD3+

15 A especificidade de ligação ao alvo dos vários BiTEs anti-EphA2 baseados em 4H5 foi examinada usando o teste baseado em citometria de fluxo descrito acima. Células de câncer de mama EphA2+ MDA MB 231 e células T humanas CD3+ HP Ball foram usadas como células alvo. O BiTE anti-CD3xEA2
20 (VH/VL) desmunizado foi usado como um controle positivo. Como mostrado na FIG. 45, cada um dos constructos de EphA2-

BiTE baseados em 4H5 ligou-se a células expressando ambos EphA2 e CD3.

Especificidade de Ligação a Célula Alvo dos
5 Constructos de BiTE Humanizados Baseados em 4H5 Maturados
por Afinidade 12E2, 2E7 e 2A4

A especificidade de ligação ao alvo dos vários BiTEs anti-EphA2 baseados em 4H5 foi examinada usando o teste
10 baseado em citometria de fluxo descrito acima. Células de câncer de mama EphA2+ MDA MB 231 e células T humanas CD3+ HP Ball foram usadas como células alvo. Como mostrado em FIG. 46, cada um dos constructos de EphA2-BiTE baseados em 4H5 ligou-se a células expressando ambos EphA2 e CD3.

15

Como mostrado em FIG. 47, os monômeros purificados dos constructos de EphA2-BiTE baseados em 4H5 maturados por afinidade ligou-se a células alvo de câncer de mama EphA2+ MDA MB 231 e células T humanas CD3+ HP Ball a uma
20 concentração de 5 µg/ml usando o teste baseado em citometria de fluxo como descrito acima.

Para determinar a habilidade dos scFv baseados em 4H5 maturados por afinidade, monocamadas de MCF-10^a ou células
25 MDA-MB-231 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro por pelo menos 24 horas a 37° C antes de serem coradas. Monocamadas celulares foram fixadas em para formaldeído 4 % (2 minutos, 25° C) antes de incubação com anticorpo scFv primário (2A4, 2E7 ou 12E2) por 30 minutos seguido por

marcação subsequente com anti-IgG de camundongo feito em cabra conjugado a AlexaFluor 488 ou anti-IgG humana feito em cabra conjugado a AlexaFluor 488 (The Jackson Laboratory). Células foram fixadas para análise por
5 microscopia de imunofluorescência. Os scFvs 2A4 e 12E2 ligaram-se a EphA2 tanto em células epiteliais de mama não transformadas quanto transformadas. O scFv 2E7, entretanto, compartilhou a habilidade única de EA2 em se ligar a um epitopo de EphA2 acessível em células malignas mas não
10 seletivamente excluído pela arquitetura normal de células epiteliais não transformadas (dados não mostrados).

Comparação da Potência Citotóxica de Quatro BiTEs Específicos para EphA2 do Anticorpo Monoclonal Humanizado
15 4H5

Testes de citotoxicidade baseados em liberação de cromo-51 foram executados para determinar a lise celular objetiva redirecionada pelos vários BiTE anti-constructos
20 de EphA2 na presença de células T CD8+ humanas estimuladas. Ver FIG. 48. A linhagem de células tumorais positiva para EphA2 MDA-MD231 foi carregada com cromo-51 e servida como célula alvo. Os vários BiTE anti-constructos de EphA2 foram titulados ao longo de uma larga escala de concentrações. A
25 duração do teste foi 18 horas, e a razão efetora-para-alvo 10:1. Concentrações de BiTE para EphA2 requeridas para metade da lise máxima (isto é, EC50) com diferentes lotes de produção foram estimados usando um modelo de ajuste não-linear de quatro parâmetros.

FIG. 49 provê uma comparação direta da potência de lise celular dirigida dos vários constructos EphA2 baseados em 3F2 e 4H5. Os testes de citotoxicidade baseados em cromó-51 foram executados como descrito acima.

Atividade Citotóxica Induzida por BiTEs de EphA2 Baseados em 4H5 Maturados Por Afinidade 12E4, 2E7 e 2A4

As FIGS. 50 e 51 demonstram a potência de lise celular dirigida dos vários BiTEs de EphA2 baseados em 4H5 (12E4, 2E7 e 2A4). As linhagens de células tumorais positivas para EphA2 A549 e SW480 foram carregadas com cromó-51 e servidas como células alvo. Células T CD8+ humanas estimuladas (FIG. 40) e CD3+ humanas não estimuladas (FIG. 51) serviram como células efectoras. Os vários BiTE anti-constructos de EphA2 foram titulados ao longo de uma larga escala de concentrações. A duração do teste foi de 18 horas (FIG. 50) ou 42 horas (FIG. 51), e a razão efectoras-para-alvo 10:1 (FIG. 50) ou 5:1 (FIG. 41). Concentrações de BiTE para EphA2 requeridas para metade da lise máxima (isto é, EC50) com diferentes lotes de produção foram estimadas usando um modelo de ajuste não-linear de quatro parâmetros.

Nenhuma Ativação de EphA2 por BiTEs de EphA2 Baseados em 4H5

FIG. 52 demonstra que nem o constructo de BiTE 2A4 nem o 2E7 induziu a fosforilação de EphA2 em células

expressando EphA2. Células EphA2+ SW480 e A549 foram tratadas com ou o BiTE 2A4 ou o BiTE 2E7, IgG de EA5 (controle positivo), ou R347 (controle negativo) por 15 minutos nas concentrações indicadas. Extratos celulares foram então imunoprecipitados usando o anticorpo monoclonal anti-EphA2 D7 (Upstate, Charlottesville, VA) e sondados usando o anticorpo anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate). Extração de amostra, imunoprecipitação e análise de *western blot* foram executados como detalhado previamente (Coffman K. et al., 2003, Cancer Res. 63:7907-12; e é incorporado por referência aqui em sua íntegra). Para todos os experimentos, níveis de proteínas foram medidos usando testes de padrão Coomassie (Pierce, Rockford, IL), e quantidades iguais de proteína foram resolvidas por SDS-PAGE (10%) e transferidas a membranas de PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Eficácia In Vivo dos Constructos de BiTE de EphA2 Maturados por Afinidade Baseados em 4H5

20

A potência *in vivo* dos constructos de BiTE 2A4 e 2E7 foram avaliadas em camundongos imunodeficientes NOD/SCID com um modelo de xenotransplante de cólon de carcinoma humano (descrito acima na Seção 6.4 e abaixo na Seção 6.8.7). A linhagem de carcinoma de cólon humano SW480 foi selecionada para o estabelecimento do modelo de xenotransplante uma vez que as células SW480 expressam EphA2.

Projeto de Estudo

5x10⁶ células SW480 foram misturadas com 2,5x10⁶ células T CD3+ humanas do mesmo doador em um volume final de 0,2 mL de PBS resultando em uma razão E:A de 1:2. As misturas de células T efectoras/SW480 foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de cada camundongo NOD/SCID. Tumores SW480 crescendo subcutaneamente foram medidos três vezes por semana com um compasso de calibração em duas dimensões perpendiculares e os volumes tumorais calculados de acordo com a fórmula: volume tumoral = [(largura² * comprimento)/2]. Animais foram tratados intravenosamente com o BiTE 2A4 ou o BiTE 2E7 a uma concentração de 1, 5, 20 e 100 µg/dose, veículo controle de PBS, ou anti-CD3xEA2 (VHVL) desimunizado a 100 µg/dose como um controle positivo por cinco dias consecutivos iniciando uma hora após a inoculação subcutânea de células T CD3+ e células tumorais SW480. Os resultados do estudo são descritos na FIG. 53.

DESCRIÇÃO ADICIONAL DOS TESTES AQUI EXECUTADOS

Linhagens Celulares e Cultura

Células CHO dhfr-, SW480, MCF-7, PC3, M14, A549, MDA-MB-231, MCF10A, MDA-MB-468, SK-MEL-28, ACHN foram obtidas da ATCC e cultivadas de acordo com a recomendação deles. Hey8 foi um presente afável do Dr. Anil Sood, M.D. Anderson Cancer Center.

Imunohistoquímica e Microscopia de Imunofluorescência

Seções de tecidos humanos congelados foram corados com
5 o anticorpo monoclonal reativo para EphA2 de humano, EA2,
para determinar se o anticorpo liga-se especificamente a
tecido normal. Brevemente, um complexo de anticorpos
primário e secundário foi produzido, os sítios de ligação
dos secundários não ligados foram bloqueados com globulinas
10 gama humanas. Seções congeladas foram aderidas a lâminas em
formalina a 10 % e lavadas com salina tamponada com tris
(TBS) 1x com Tween 20 a 0,01%. Peroxidases endógenas foram
bloqueadas com uma solução contendo glicose oxidase
(Sigma), β -D(+)-glicose (Sigma), e azida de sódio (Sigma).
15 Um conjunto vetor de avidina/biotina (Vector Labs) bloqueou
sítios reativos de avidina/biotina. As lâminas foram então
incubadas com uma solução bloqueadora de proteínas
consistindo de albumina de soro bovino, caseína, e soro de
cabra normal. Seções de tecidos foram incubadas com
20 anticorpos pré-complexados e então tratados com conjunto
Vectastain ABC Elite (Vector Labs), lavados com TBS 1x,
tratados com DAB (Sigma), e contra-corados com hematoxilina
de Mayer. Seções de tecido foram desidratadas, recobertas
com lamínulas, e feitas imagens.

25

Análise de Ressonância de Plasmon de Superfície com Biosensor

Todos os estudos foram executados usando chip sensor
30 CM5 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) o qual contém uma matriz

dextrana de carboximetila (CM) e um biosensor de ressonância de plasmon de superfície (SPR) Biacore® 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suécia). CD3 $\epsilon\gamma$ foi covalentemente associado à matriz dextrana de CM usando acoplamento químico por amina. Uma superfície de referência foi criada por omissão do etapa de associação a CD3 $\epsilon\gamma$. Fc de EphA2 foi capturado via uma interação de alta afinidade entre a porção Fc de EphA2Fc e um (Fc) de cabra anti-IgG humana (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). (Fc) de cabra anti-IgG humana foi covalentemente associada à matriz dextrana de CM usando acoplamento químico por amina. Duas superfícies específicas para (Fc) anti-IgG humana foram criadas. Uma destas superfícies foi usada como uma superfície de referência enquanto a outra superfície foi usada para criar uma superfície específica para Fc de EphA2. Concentrações diferentes de bscEphA2 x CD3 foram preparadas por diluição serial em HBS-EP (HEPES a 0,01 M pH 7,4, NaCl a 0,15 M, EDTA a 3 mM, surfactante P20 a 0,005 %). BiTEs de EphA2 foram injetados de uma maneira de fluxo serial ao longo da superfície específica para CD3 $\epsilon\gamma$ ou específica para EphA2 e sua superfície de referência correspondente. Dissociação de BiTEs de EphA2 ligados foi monitorada na presença de HBS-EP. Material ligado remanescente foi removido com tetraborato disódico a 10 mM pH 8,5, NaCl a 1 M (para superfície específica para CD3 $\epsilon\gamma$) ou glicina a 10 mM pH 1,7 (para superfície específica para Fc de EphA2).

Densidade de Antígenos na Superfície Celular

O número de sítios de ligação EphA2 na superfície das células foi estimado usando Qifikit (DakoCytomation).

Brevemente, monocamadas subconfluentes de células foram rapidamente tripsinizadas, lavadas, contadas, plaqueadas em placas de 96 poços com fundo redondo, e coradas com 100 µl de uma diluição serial de duas vezes de um anticorpo anti-EphA2 de humano, B233 (Coffman 2003). As células e contas
5 de calibração conjugadas a IgG de camundongos foram resuspendidos em AlexaFluor 647 anti-IgG de camundongo H+L (Invitrogen) e então analisadas por citometria de fluxo usando um FACSCalibur (Becton Dickinson). O número de
10 sítios de ligação na superfície foi estimado por análise de regressão não linear a partir da curva de calibração das contas.

EQUIVALENTES

15

Aqueles especialistas na arte reconhecerão, ou serão capazes de averiguar usando nada além de experimentação de rotina, vários equivalentes aos avanços específicos da invenção aqui descrita. Tais equivalents pretendem ser
20 englobados pelas seguintes reivindicações.

Todas as publicações, patentes e aplicações de patentes mencionadas nesta especificação são aqui incorporadas por referência na especificação com a mesma
25 extensão como se cada publicação, patente ou aplicação de patente individual fosse especificamente e individualmente indicadas como sendo aqui incorporada por referência.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS**1) INFORMAÇÕES GERAIS:**

I.a) Requerente: MedImmune, Inc.
Micromet Inc.

II) Título da Invenção: **ANTICORPOS DE CADEIA SIMPLES
BIESPECÍFICOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS
MESMOS**

III) Arquivo de Referência: 10271-175-228

IV.a) Dados de Prioridade Unionista: 60/753.368
IV.b) Data de preenchimento do formulário anterior: 2005-
12-21

V) Número de Seqüências: 123 (cento e vinte e três)

VI) Programa para leitura: FastSEQ for Windows Version 4.0

2) INFORMAÇÕES GERAIS DAS SEQÜÊNCIAS:

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 1

II.a) tamanho: 321
II.b) tipo: DNA
II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Nucleotídeos de
Cadeia Leve Variável EA2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 1

```
gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcaacttgca aggcgagtca ggacattaat aactatttaa gctggttcca gcagaaacca 120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180
agggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctgaaa tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a                                     321
```

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 2

II.a) tamanho: 107
II.b) tipo: PRT
II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos de Cadeia Leve Variável EA2

5

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 2

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 10 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 15 65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 20 100 105

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 3

II.a) tamanho: 33

25 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

30 III.a) Outras informações: Seqüência de Nucleotídeos CDR1 de Cadeia Leve Variável EA2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 3

aaggcgagtc aggacattaa taactattta agc

33

35 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 4

II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Seqüência Artificial

40 III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Leve Variável EA2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 4

45 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 5

50 II.a) tamanho: 21

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Nucleotídeos CDR2 de Cadeia Leve Variável EA2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 5

5 cgtgcaaaca gattggtaga t

21

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 6

II.a) tamanho: 7

II.b) tipo: PRT

10 II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Leve Variável EA2

15

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 6

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1

5

20

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 7

II.a) tamanho: 27

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Seqüência Artificial

25

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Nucleotídeos CDR3 de Cadeia Leve Variável EA2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 7

30 ctgaaatatg atgagtttcc gtacacg

27

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 8

II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

35 II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Leve Variável EA2

40

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 8

Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1

5

45

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 9

II.a) tamanho: 345

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Seqüência Artificial

50

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos de Cadeia Pesada Variável EA2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 9

```

5  gacgtgaagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggaggggtc cctgaaactc 60
   tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120
   ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtactta cacctactat 180
   ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
   ctgcaaata gaagctctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagaagct 300
10 atctttactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

```

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 10

II.a) tamanho: 115

II.b) tipo: PRT

15 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Pesada Variável EA2

20

IV) Sequência: SEQ ID NO. 10

```

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1          5          10          15
25 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
   20          25          30
   Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
   35          40          45
   Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
   50          55          60
30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
   65          70          75          80
   Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
   85          90          95
   Thr Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
35          100          105          110
   Val Ser Ala
   115

```

40 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 11

II.a) tamanho: 30

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

45 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR1 de Cadeia Pesada Variável EA2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 11

```

50 ggattcactt tcagtagcta taccatgtct 30

```

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 12

II.a) tamanho: 10

II.b) tipo: PRT

55 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Pesada Variável EA2

5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 12

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

10

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 13

II.a) tamanho: 48

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

15

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR2 de Cadeia Pesada Variável EA2

20

IV) Sequência: SEQ ID NO. 13

accattagta gtggtgtgtac ttacacctac tatccagaca gtaagggc 48

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 14

II.a) tamanho: 17

25

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Pesada Variável EA2

30

IV) Sequência: SEQ ID NO. 14

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

35

Gly

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 15

40

II.a) tamanho: 18

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR3 de Cadeia Pesada Variável EA2

45

IV) Sequência: SEQ ID NO. 15

gaagctatct ttacttac 18

50

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 16

II.a) tamanho: 6

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de
5 Cadeia Pesada Variável EA2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 16

Glu Ala Ile Phe Thr Tyr

1

5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 17

II.a) tamanho: 336

II.b) tipo: DNA

15 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos de
20 Cadeia Leve Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 17

gatgtkgtka tgacbcagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcctct 60
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgaattgg 120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgctaattct atctgggtgtc taaactggac 180
25 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaagggtc acattttccg 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 18

30 II.a) tamanho: 112

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

35 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de
Cadeia Leve Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 18

40 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
45 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
50 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85 90 95
Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

55 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 19

II.a) tamanho: 27
 II.b) tipo: DNA
 II.c) organismo: Sequência Artificial

5 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR1
 de Cadeia Leve Variável EA5.12

10 IV) Sequência: SEQ ID NO. 19
 aagtcaagtc agagcctctt atatatg 27

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 20

II.a) tamanho: 16

II.b) tipo: PRT

15 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

20 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos EA5.12
 de Cadeia Leve Variável CDR1

IV) Sequência: SEQ ID NO. 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

25 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 21
 II.a) tamanho: 21
 II.b) tipo: DNA
 II.c) organismo: Sequência Artificial

30 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR2
 de Cadeia Leve Variável EA5.12

35 IV) Sequência: SEQ ID NO. 21
 ctggtgtcta aactggactc t 21

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 22

II.a) tamanho: 7

40 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

45 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de
 Cadeia Leve Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 22

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

50 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 23

II.a) tamanho: 27
 II.b) tipo: DNA
 II.c) organismo: Sequência Artificial

5 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR3 de Cadeia Leve Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 23

10 gtgcaagggtt cacattttcc gtggacg

27

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 24

II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

15 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Leve Variável EA5.12

20

IV) Sequência: SEQ ID NO. 24

Val Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr

1

5

25

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 25

II.a) tamanho: 345

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

30

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos de Cadeia Pesada Variável EA5.12

35

IV) Sequência: SEQ ID NO. 25

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctagtgaaga ctgggggcttc agtgaagata 60
 tctctgcaagg cttctggtta ctcattcact gggttactaca tgcaactgggt caagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggatat attagttgtt acaatgggtg tactagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattt actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
 atgcagttca acagcctgac atctgaagac tctgcgggtc attactgtgc aagatctcat 300
 gctatggact actgggggtca aggaacctca gtcaccggtc cctca 345

40

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 26

II.a) tamanho: 115

45

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos - Região de Cadeia Pesada Variável EA5.12

50

IV) Sequência: SEQ ID NO. 26

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala

	1		5		10		15									
	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25						30		
5	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40						45			
	Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Val	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50				55					60					
	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70				75						80	
10	Met	Gln	Phe	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95		
	Ala	Arg	Ser	His	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr
			100					105						110		
15	Val	Ser	Ser													
			115													

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 27

II.a) tamanho: 15

20 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

25 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR1 de Cadeia Pesada Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 27

ggttactaca tgcac

15

30 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 28

II.a) tamanho: 5

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

35 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Pesada Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 28

40 Gly Tyr Tyr Met His
1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 29

45 II.a) tamanho: 51

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

50 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR2 de Cadeia Pesada Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 29

tatattagtt gttacaatgg tgttactagc tacaaccaga agttcaaggg c

51

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 30

II.a) tamanho: 17

II.b) tipo: PRT

5 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Pesada Variável EA5.12

10

IV) Sequência: SEQ ID NO. 30

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

15

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 31

II.a) tamanho: 18

20 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

25 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos CDR3 de Cadeia Pesada Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 31

tctcatgcta tggactac 18

30 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 32

II.a) tamanho: 6

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

35 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Pesada Variável EA5.12

IV) Sequência: SEQ ID NO. 32

40 Ser His Ala Met Asp Tyr
1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 33

45 II.a) tamanho: 123

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

50 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Leve Variável 233

IV) Sequência: SEQ ID NO. 33

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 20 25 30
 Asp Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 35 40 45
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 50 55 60
 10 Lys Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 85 90 95
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 100 105 110
 15 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120

20 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 34

II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

25 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Leve Variável 233

IV) Sequência: SEQ ID NO. 34

30 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 35

35 II.a) tamanho: 7

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

40 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Leve Variável 233

IV) Sequência: SEQ ID NO. 35

45 Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser
 1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 36

II.a) tamanho: 9

50 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

55 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Leve Variável 233

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 36
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

5

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 37

II.a) tamanho: 120

II.b) tipo: PRT

10 II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos de Cadeia Pesada Variável 233

15

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 37

Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	20	25	30	
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Asn	Asp	Tyr	Thr	Thr	Glu	Tyr	Ser	Ala	50	55	60	
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Gln	Ser	Ile	65	70	75	80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ala	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	85	90	95	
Tyr	Cys	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Tyr	His	Ala	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									115	120		

35 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 38

II.a) tamanho: 5

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Seqüência Artificial

40 III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Pesada Variável 233

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 38

45 Asp Tyr Ser Met Asn
 1 5

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 39

50 II.a) tamanho: 19

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Pesada Variável 233

IV) Sequência: SEQ ID NO. 39

5 Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

10

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 40

II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

15

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Pesada Variável 233

20

IV) Sequência: SEQ ID NO. 40

Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser
1 5

25

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 41

II.a) tamanho: 107

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

30

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Leve Variável 3F2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 41

35 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
40 Tyr Tyr Gly Phe Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
45 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

50

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 42

II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

55

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Leve Variável 3F2

5 IV) Seqüência: SEQ ID NO. 42

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

10 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 43

II.a) tamanho: 7

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Seqüência Artificial

15 III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Leve Variável 3F2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 43

20 Tyr Gly Phe Gln Ser Ile Ser
1 5

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 44

25 II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

30 III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Leve Variável 3F2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 44

35 Gln Gln Ala Asn Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 45

II.a) tamanho: 120

40 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

45 III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos de Cadeia Pesada Variável 3F2

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 5 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 10 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 46

II.a) tamanho: 5

15 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

20 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Pesada Variável 3F2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 46

Asp Tyr Ser Met Asn
1 5

25

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 47

II.a) tamanho: 19

II.b) tipo: PRT

30 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

35 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Pesada Variável 3F2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 47

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

40

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 48

II.a) tamanho: 9

45 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

50 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Pesada Variável 3F2

IV) Sequência: SEQ ID NO. 48

Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser
1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 49

II.a) tamanho: 107

5 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

10 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Leve Variável G5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 49

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
15	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Asn
				20					25					30		
	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45			
20	Lys	Tyr	Val	Phe	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50				55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65				70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Ser	Trp	Pro	Leu
				85				90						95		
25	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105								

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 50

30 II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

35 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Leve Variável G5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 50

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	His
40	1			5					10		

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 51

II.a) tamanho: 7

45 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

50 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Leve Variável G5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 51

	Tyr	Val	Phe	Gln	Ser	Ile	Ser
	1			5			

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 52

II.a) tamanho: 9

5 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

10 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Leve Variável G5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 52

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr

1

5

15

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 53

II.a) tamanho: 120

II.b) tipo: PRT

20 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

25 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Pesada Variável G5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 53

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

30

20

25

30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50

55

60

Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr

35

65

70

75

80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85

90

95

Tyr Cys Ala Arg Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln

40

100

105

110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

45 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 54

II.a) tamanho: 5

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

50 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Pesada Variável G5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 54

Asp Tyr Ser Met Asn
1 5

- 5 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 55
II.a) tamanho: 19
II.b) tipo: PRT
II.c) organismo: Sequência Artificial
- 10 III) Característica:
III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Pesada Variável G5
- 15 IV) Sequência: SEQ ID NO. 55
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
- 20 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 56
II.a) tamanho: 9
II.b) tipo: PRT
II.c) organismo: Sequência Artificial
- 25 III) Característica:
III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Pesada Variável G5
- 30 IV) Sequência: SEQ ID NO. 56
Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser
1 5
- 35 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 57
II.a) tamanho: 18
II.b) tipo: PRT
II.c) organismo: Sequência Artificial
- 40 III) Característica:
III.a) Outras informações: Sequência de aminoácidos ligante de constructo EphA2-BiTe
- 45 IV) Sequência: SEQ ID NO. 57
Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
Ala Asp
- 50 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 58
II.a) tamanho: 5
II.b) tipo: PRT
II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de aminoácidos ligante de constructo EphA2-BiTe

5

IV) Sequência: SEQ ID NO. 58

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

10

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 59

II.a) tamanho: 15

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

15

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de aminoácidos ligante de constructo EphA2-BiTe

20

IV) Sequência: SEQ ID NO. 59

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

25

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 60

II.a) tamanho: 1554

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

30

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos anti-CD3 (VH-VL) x EA2 (VH-VL) desimmunizada

35

IV) Sequência: SEQ ID NO. 60

	gaattcacca	tgggatggag	ctgtatcatc	ctcttcttgg	tagcaacagc	tacaggtgta	60
	cactccgacg	tccaactggg	gcagtcaggg	gctgaagtga	aaaaacctgg	ggcctcagtg	120
	aaggtgtcct	gcaaggcttc	tggctacacc	tttactaggt	acacgatgca	ctgggtaagg	180
	caggcacctg	gacagggctc	ggaatggatt	ggatacatta	atcctagccg	tgggtatact	240
40	aattacgcag	acagcgtcaa	gggccgcttc	acaatcacta	cagacaaatc	caccagcaca	300
	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcgttct	gaggacactg	caacctatta	ctgtgcaaga	360
	tattatgatg	atcattactg	ccttgactac	tggggccaag	gcaccacggg	caccgtctcc	420
	tcaggcgaag	gtactagtac	tggttctggg	ggaagtggag	gttcaggtgg	agcagacgac	480
	attgtactga	cccagtcctc	agcaactctg	tctctgtctc	caggggagcg	tgccaccctg	540
45	agctgcagag	ccagtcaaaag	tgtaagttac	atgaactggg	accagcagaa	gcccgggcaag	600
	gcacccaaaa	gatggattta	tgacacatcc	aaagtggctt	ctggagtccc	tgctcgcttc	660
	agtggcagtg	ggctctgggac	cgactactct	ctcacaatca	acagcttgga	ggctgaagat	720
	gctgccactt	attactgcca	acagtggagt	agtaaccgcg	tcacgttcgg	tggcgggacc	780
	aaggtggaga	tcaaattccgg	aggtgggtgga	tccgacgtga	agctgggtgga	gtctgggggga	840
50	ggcttagtga	agcctggagg	gtccctgaaa	ctctcctgtg	cagcctctgg	attcactttc	900
	agtagctata	ccatgtcttg	ggttcgccag	actccagaga	agaggctgga	gtgggtcgca	960
	accattagta	gtggtgttac	ttacacctac	tatccagaga	gtgtgaaggg	ccgattcacc	1020
	atctccagag	acaatgccaa	gaacaccttg	tacctgcaaa	tgagcagttc	gaagtctgag	1080
	gacacagcca	tgtattactg	tacaagagaa	gctatcttta	cttactgggg	ccaagggact	1140
55	ctgggtcactg	tctcttcttc	cggtgggtggg	gggtctggcg	gcggcggttc	cggtgggtggg	1200

ggttctgaca tcaagatgac ccagtctcca tcttccatgt atgcatctct aggagagaga 1260
 gtcactatca cttgcaaggc gagtcaggac attaataact atttaagctg gttccagcag 1320
 aaaccagggg aatctcctaa gaccctgac tatcgtgcaa acagattggt agatgggggtc 1380
 ccatcaagggt tcagtggcag tggatctggg caagattatt ctctcaccat cagcagcctg 1440
 5 gagtatgaag atatgggaat ttattattgt ctgaaatatg atgagtttcc gtacacgttc 1500
 ggagggggga ccaagctgga aataaaacat catcaccatc atcattaggt cgac 1554

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 61

II.a) tamanho: 55

10 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

15 III.a) Outras informações: Sequência de nucleotídeos
 ligante de constructo EphA2-BiTe

IV) Sequência: SEQ ID NO. 61

ggcgaaggta ctagtactgg ttctggtgga agtggagggt caggtggagc agacg 55

20 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 62

II.a) tamanho: 19

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

25 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de nucleotídeos
 ligante de constructo EphA2-BiTe

IV) Sequência: SEQ ID NO. 62

30 tccggagggtg gtggatccg 19

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 63

II.a) tamanho: 48

II.b) tipo: DNA

35 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de nucleotídeos
 ligante de constructo EphA2-BiTe

40

IV) Sequência: SEQ ID NO. 63

tccggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttct 48

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 64

45 II.a) tamanho: 21

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

50 III.a) Outras informações: Sequência de nucleotídeos
 ligante de constructo EphA2-BiTe

IV) Sequência: SEQ ID NO. 64

catcatcacc atcatcatta g

21

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 65

5 II.a) tamanho: 492

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

10 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de anti-CD3(VH-VL)x EA2 (VH-VL) EphA2-Bite desimmunizado

IV) Sequência: SEQ ID NO. 65

15	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr
				20				25						30		
	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40						45			
20	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50				55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
25					85				90					95		
	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Gly	Ser	Gly
			115					120					125			
30	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Asp	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser
		130				135					140					
	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
	145				150					155					160	
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
35					165				170					175		
	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser
				180					185					190		
	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser
			195					200					205			
40	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
		210				215					220					
	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val
	225					230					235				240	
	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	
45					245				250					255		
	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala
				260				265						270		
	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln
				275				280					285			
50	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly
		290				295						300				
	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser
	305					310					315				320	
	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys
55					325				330					335		
	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Phe	Thr
				340					345					350		
	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly

		355				360					365				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Lys	Met	Thr	
		370				375				380					
5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Val	Thr
		385				390				395					400
	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe
				405					410						415
	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Asn
				420					425					430	
10	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
			435					440				445			
	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr	Glu	Asp	Met	Gly
		450					455					460			
15	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Lys	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly
		465				470					475				480
	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	His	His	His	His	His	His			
					485					490					

20 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 66
 II.a) tamanho: 6
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

25 III) Característica:
 III.a) Outras informações: sequência de hexa-histidina C-terminalde DNAC de EphA2-BiTe

IV) Sequência: SEQ ID NO. 66
 30 His His His His His His
 1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 67
 35 II.a) tamanho: 711
 II.b) tipo: DNA
 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:
 40 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos4h5 VH
 VL scFV

IV) Sequência: SEQ ID NO. 67
 45 caggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatacca tgtcttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag cgcttgagtg gatgggaacc attagtagtg gtggtactta cacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagct 300
 atctttactt actggggccg tggcaccctg gtcaccgtct cctcaggtgg tgggtggttct 360
 50 ggcggcgccg gctccggtgg tgggtggttct gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc 420
 ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgca aggcgagtca ggacattaat 480
 aactatttaa gctggtacca gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatcgt 540
 gcaaacagat tggtagatgg ggtcccagac aggttcagtg gcagcgggta tggaacagat 600
 tttaccctca caattaataa catagaatct gaggatgctg catattactt ctgtctgaaa 660
 55 tatgatgtgt ttccgtacac gttcggccaa gggaccaagg tggagatcaa a 711

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 68

II.a) tamanho: 237

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

5

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos4H5 VH
VL scFv

10 IV) Sequência: SEQ ID NO. 68

	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5				10						15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
15	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met	
				35				40					45				
	Gly	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
		50				55						60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
20	65					70				75						80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95			
	Ala	Arg	Glu	Ala	Ile	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110			
25	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
				115				120					125				
	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	
		130				135						140					
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	
30	145					150				155						160	
	Asn	Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	
				165					170						175		
	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	
				180				185						190			
35	Ser	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Ile	
				195				200					205				
	Glu	Ser	Glu	Asp	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Leu	Lys	Tyr	Asp	Val	Phe	
		210				215						220					
	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
40	225					230					235						

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 69

II.a) tamanho: 5

45 II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos4H5 VH
50 VL scFv CDR1 (VH)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 69

Ser Tyr Thr Met Ser

1

5

55

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 70

II.a) tamanho: 17

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

5

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 4H5 VH
VL scFv CDR2 (VH)

10 IV) Sequência: SEQ ID NO. 70

Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5			10						15	

Gly

15

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 71

II.a) tamanho: 6

II.b) tipo: PRT

20 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 4H5 VH
VL scFv CDR3 (VH)

25

IV) Sequência: SEQ ID NO. 71

Glu	Ala	Ile	Phe	Thr	Tyr
1				5	

30

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 72

II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

35

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 4H5 VH
VL scFv CDR1 (VL)

40 IV) Sequência: SEQ ID NO. 72

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ser
1				5				10		

45 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 73

II.a) tamanho: 7

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

50 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 4H5 VH
VL scFv CDR2 (VL)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 73

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1

5

5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 74

II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

10

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 4H5 VH

VL scFv CDR3 (VL)

15

IV) Sequência: SEQ ID NO. 74

Leu Lys Tyr Asp Val Phe Pro Tyr Thr

1

5

20

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 75

II.a) tamanho: 711

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

25

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos 2A4 VH

VL scFv

IV) Sequência: SEQ ID NO. 75

30

cagggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tctgtgagc cctctggatt cacctttagc agctatacca tgtcttgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag cgcttgagtg gatgggaacc attagtagtc gtggtagtta cacctactat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagct 300

35

atctttactc actggggccg tggcaccctg gtcaccgtct cctcaggtgg tgggtggttct 360

ggcggcgccg gctccggtgg tgggtggttct gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc 420

ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgca aggcgagtc ggacattaat 480

aactatcaca gctggtacca gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatcgt 540

40

gcaaacagat tggtcgatgg ggtcccagac aggttcagtg gcagcgggta tggaacagat 600

tttaccctca caattaataa catagaatct gaggatgctg catattactt ctgtctgaaa 660

tataatgtgt ttccgtacac gttcggccaa gggaccaagg tggagatcaa a 711

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 76

II.a) tamanho: 237

45

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH

50

VL scFv

IV) Sequência: SEQ ID NO. 76

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Thr Ile Ser Ser Arg Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Ile Phe Thr His Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 15 Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 130 135 140
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn
 145 150 155 160
 20 Asn Tyr His Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 165 170 175
 Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe
 180 185 190
 Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile
 195 200 205
 25 Glu Ser Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Lys Tyr Asn Val Phe
 210 215 220
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 225 230 235

30

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 77
 II.a) tamanho: 5
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

35

III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH
 VL scFv CDR1 (VH)

40

IV) Sequência: SEQ ID NO. 77

Ser Tyr Thr Met Ser
 1 5

45

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 78
 II.a) tamanho: 17
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

50

III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH
 VL scFv CDR2 (VH)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 78

55

Thr Ile Ser Ser Arg Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

- 5 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 79
 II.a) tamanho: 6
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial
- 10 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH
 VL scFv CDR3 (VH)
- 15 IV) Sequência: SEQ ID NO. 79
 Glu Ala Ile Phe Thr His
 1 5
- 20 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 80
 II.a) tamanho: 11
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial
- 25 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH
 VL scFv CDR1 (VL)
- 30 IV) Sequência: SEQ ID NO. 80
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr His Ser
 1 5 10
- 35 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 81
 II.a) tamanho: 7
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial
- 40 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH
 VL scFv CDR2 (VL)
- 45 IV) Sequência: SEQ ID NO. 81
 Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
 1 5
- 50 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 82
 II.a) tamanho: 9
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial
- III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2A4 VH
VL scFv CDR3 (VL)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 82

5 Leu Lys Tyr Asn Val Phe Pro Tyr Thr
1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 83

10 II.a) tamanho: 711

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

15 III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos 2E7 VH
VL scFv

IV) Sequência: SEQ ID NO. 83

20 caggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatacca tgtcttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag cgcttgagtg gatgggaacc attagtagtc gtgggtactta cacctactat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagct 300
atctttactc actggggccg tggcaccctg gtcaccgtct cctcaggtgg tgggtggttct 360
25 ggcggcgccg gctccggtgg tgggtggttct gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc 420
ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgca aggcgagtca ggacattaat 480
aactatggca gctggtacca gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatcgt 540
gcaaacagat tggtcgatgg ggtcccagac aggttcagtg gcagcgggta tggaacagat 600
tttaccctca caattaataa catagaatct gaggatgctg catattactt ctgtctgaaa 660
30 tataatcggg ttccgtacac gttcggccaa gggaccaagg tggagatcaa a 711

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 84

II.a) tamanho: 333

II.b) tipo: PRT

35 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
VL scFv

40

IV) Sequência: SEQ ID NO. 84

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Thr Ile Ser Ser Arg Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
55 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
100 105 110
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

		115				120				125						
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		130					135					140				
5	Gly	Thr	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
	145					150					155				160	
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
					165				170						175	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				180					185					190		
10	Ala	Arg	Glu	Ala	Ile	Phe	Thr	His	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
		195						200					205			
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		210					215					220				
15	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
	225				230						235				240	
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn
					245				250						255	
	Asn	Tyr	Gly	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu
				260					265					270		
20	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe
		275					280						285			
	Ser	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Ile
		290					295					300				
25	Glu	Ser	Glu	Asp	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Leu	Lys	Tyr	Asn	Arg	Phe
	305				310						315				320	
	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
					325				330							

30 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 85
 II.a) tamanho: 5
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

35 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
 VL scFv CDR1 (VH)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 85
 40 Ser Tyr Thr Met Ser
 1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 86
 45 II.a) tamanho: 17
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:
 50 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
 VL scFv CDR2 (VH)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 86
 55 Thr Ile Ser Ser Arg Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 87
 II.a) tamanho: 6
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

 10 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
 VL scFv CDR3 (VH)

 15 IV) Sequência: SEQ ID NO. 87
 Glu Ala Ile Phe Thr His
 1 5

 20 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 88
 II.a) tamanho: 11
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

 25 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
 VL scFv CDR1 (VL)

 30 IV) Sequência: SEQ ID NO. 88
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Gly Ser
 1 5 10

 35 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 89
 II.a) tamanho: 7
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

 40 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
 VL scFv CDR2 (VL)

 45 IV) Sequência: SEQ ID NO. 89
 Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
 1 5

 50 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 90
 II.a) tamanho: 9
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Sequência Artificial

 III) Característica:
 III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 2E7 VH
 VL scFv CDR3 (VL)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 90
 Leu Lys Tyr Asn Arg Phe Pro Tyr Thr
 1 5

5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 91

II.a) tamanho: 711

II.b) tipo: DNA

10 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Nucleotídeos 12E2
 VH VL scFv

15

IV) Sequência: SEQ ID NO. 91

caggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatacca tgtcttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag cgcttgagtg gatgggaacc attagtagtc gtggtactta cacctactat 180
 20 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagct 300
 atctttactt actggggccg tggcaccctg gtcaccgtct cctcaggtgg tgggtggttct 360
 ggcggcgccg gctccggtgg tgggtggttct gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc 420
 ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgca aggcgagtca ggacattaat 480
 25 aactatttaa gctggtacca gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatcgt 540
 gcaaacagat tggtcgatgg ggtcccagac aggttcagtg gcagcgggta tggaacagat 600
 ttaccctca caattaataa catagaatct gaggatgctg catattactt ctgtctgaaa 660
 tatgatcggg ttccgtacac gttcggccaa gggaccaagg tggagatcaa a 711

30 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 92

II.a) tamanho: 237

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

35 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH
 VL scFv

IV) Sequência: SEQ ID NO. 92

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Ile Ser Ser Arg Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 55 Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

	130		135		140
	Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn				
	145		150		155
5	Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu				160
		165		170	175
	Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe				
		180		185	190
	Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile				
		195		200	205
10	Glu Ser Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Lys Tyr Asp Arg Phe				
		210		215	220
	Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	225		230		235

15

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 93

II.a) tamanho: 5

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

20

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH
VL scFv CDR1 (VH)

25

IV) Sequência: SEQ ID NO. 93

Ser	Tyr	Thr	Met	Ser
1				5

30

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 94

II.a) tamanho: 17

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

35

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH
VL scFv CDR2 (VH)

40

IV) Sequência: SEQ ID NO. 94

Thr	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5			10						15	
Gly														

45

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 95

II.a) tamanho: 6

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

50

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH
VL scFv CDR3 (VH)

IV) Sequência: SEQ ID NO. 95

Glu Ala Ile Phe Thr Tyr

1

5

5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 96

II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

10

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH

VL scFv CDR1 (VL)

15

IV) Sequência: SEQ ID NO. 96

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser

1

5

10

20

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 97

II.a) tamanho: 7

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

25

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH

VL scFv CDR2 (VL)

30

IV) Sequência: SEQ ID NO. 97

Arg Ala Asn Arg Leu Phe Asp

1

5

35

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 98

II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

40

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos 12E2 VH

VL scFv CDR3 (VL)

45

IV) Sequência: SEQ ID NO. 98

Leu Lys Tyr Asp Arg Phe Pro Tyr Thr

1

5

50

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 99

II.a) tamanho: 33

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer Combinatório L1* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 99

5 ccagtgtagg ttgttgctaa tactttggct ggc 33

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 100

II.a) tamanho: 33

II.b) tipo: DNA

10 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer Combinatório L2* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

15

IV) Sequência: SEQ ID NO. 100

ccagtgtagg ttgttgtdaa tactttggct ggc 33

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 101

20 II.a) tamanho: 42

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

25 III.a) Outras informações: *Primer Combinatório L3* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 101

30 gggaccccag agatgdactg gaagvcatac ttgatcagga gc 42

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 102

II.a) tamanho: 42

II.b) tipo: DNA

35 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer Combinatório L4* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

40 IV) Sequência: SEQ ID NO. 102

gggaccccag agatgdactg gaagstatac ttgatcagga gc 42

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 103

II.a) tamanho: 35

45 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

50 III.a) Outras informações: *Primer Combinatório L5* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 103

gagcggccag ctgttggmct gttgacagta atatg

35

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 104

II.a) tamanho: 46

5 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

10 III.a) Outras informações: *Primer* Combinatório H6 usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 104

gcctgtcgca cccasttcat ggagtaatcg gwaaagggtga atccag

46

15 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 105

II.a) tamanho: 46

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

20 III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer* Combinatório H7 usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 105

25 Gly Cys Cys Thr Gly Thr Cys Gly Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Trp Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Ala Thr Cys Gly Gly Trp
 20 25 30
 Ala Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Thr Cys Cys Ala Gly
 30 35 40 45

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 106

II.a) tamanho: 46

35 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

40 III.a) Outras informações: *Primer* Combinatório H8 usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 106

gcctgtcgca cccasttcat ggagtaatcg tcaaagggtga atccag

46

45 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 107

II.a) tamanho: 46

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

50 III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer* Combinatório H9 usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 107

gcctgtcgca cccaggwcat ggagtaatcg tcaaagggtga atccag

46

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 108

5 II.a) tamanho: 49

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

10 III.a) Outras informações: *Primer Combinatório H10* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 108

15 Gly Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Gly Thr Gly Thr Ala Gly Lys Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys
 20 25 30
 Thr Thr Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr
 35 40 45
 20 Cys

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 109

25 II.a) tamanho: 49

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

30 III.a) Outras informações: *Primer Combinatório H11* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 109

35 gatgcactgt actctgttgt gtaggaatta gctttgtttc taataaatc

49

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 110

II.a) tamanho: 45

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

40 III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer Combinatório H6* usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

45 IV) Sequência: SEQ ID NO. 110

gttccttggc cccaggagtc catagcatga trcctagggt atctc

45

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 111

II.a) tamanho: 45

50 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: *Primer* Combinatório H13 usado na otimização de afinidade de Fab 2G6

IV) Sequência: SEQ ID NO. 111

5 gttccttggc cccacaggtc catagcatga trcctagggt atctc

45

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 112

II.a) tamanho: 120

II.b) tipo: PRT

10 II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Pesada Variável 2G6 humanizada

15

IV) Sequência: SEQ ID NO. 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

25

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

30

Tyr Cys Thr Thr Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

35

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 113

II.a) tamanho: 5

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

40

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Pesada Variável 2G6 Humanizada

IV) Sequência: SEQ ID NO. 113

45

Asp Tyr Ser Met Asn
1 5

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 114

50

II.a) tamanho: 19

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Pesada Variável 2G6 humanizada

IV) Sequência: SEQ ID NO. 114

5 Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

10

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 115

II.a) tamanho: 9

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

15

III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Pesada Variável 2G6 Humanizada

20 IV) Sequência: SEQ ID NO. 115

Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser
 1 5

25 I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 116

II.a) tamanho: 106

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

30 III) Característica:

III.a) Outras informações: Sequência de Aminoácidos de Cadeia Leve Variável 2G6 Humanizada

IV) Sequência: SEQ ID NO. 116

35 Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu
 20 25 30
 His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 40 Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 45 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

50

I.a) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 117

II.a) tamanho: 11

II.b) tipo: PRT

II.c) organismo: Sequência Artificial

55

III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR1 de Cadeia Leve Variável 2G6 Humanizada

5 IV) Seqüência: SEQ ID NO. 117
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10

10 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 118
 II.a) tamanho: 7
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Seqüência Artificial

15 III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR2 de Cadeia Leve Variável 2G6 Humanizada

20 IV) Seqüência: SEQ ID NO. 118
 Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser
 1 5

25 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 119
 II.a) tamanho: 9
 II.b) tipo: PRT
 II.c) organismo: Seqüência Artificial

30 III) Característica:

III.a) Outras informações: Seqüência de Aminoácidos CDR3 de Cadeia Leve Variável 2G6 Humanizada

35 IV) Seqüência: SEQ ID NO. 119
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

40 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 120
 II.a) tamanho: 43
 II.b) tipo: DNA
 II.c) organismo: Seqüência Artificial

45 III) Característica:

III.a) Outras informações: *primer* Medi-VH8 5' usado para amplificar VH

50 IV) Seqüência: SEQ ID NO. 120
 ttctatgcgg ccagccggc ccaggtgcag ctgttgsagt ctg 43

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 121
 II.a) tamanho: 54
 II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

5 III.a) Outras informações: *primer* Medi-JH1 3' usado para amplificar VH

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 121

ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc tgaggagacg gtgaccaggg tgcc 54

10 I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 122

II.a) tamanho: 53

II.b) tipo: DNA

II.c) organismo: Seqüência Artificial

15 III) Característica:

III.a) Outras informações: *primer* Medi-VK1 5' usado para VL

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 122

20 ggcggcgggc gctccggtgg tggtggttct gacatccagw tgaccagtc tcc 53

I.a) Número identificador da seqüência: SEQ ID No: 123

II.a) tamanho: 45

II.b) tipo: DNA

25 II.c) organismo: Seqüência Artificial

III) Característica:

III.a) Outras informações: *primer* Medi-JK4 3' usado para VL

30

IV) Seqüência: SEQ ID NO. 123

tggaattcgg cccccgaggc cacgtttgat ctccaccttg gtccc 45

**PI0620639-5****REIVINDICAÇÕES**

1. Anticorpo de cadeia simples biespecífico, caracterizado pelo fato de que compreende:

5

(a) primeiro domínio variável de cadeia pesada (domínio VH) e primeiro domínio variável de cadeia leve (domínio VL), cada qual de um anticorpo que liga-se imunoespecificamente com o CD3, o referido primeiro domínio VH liga-se covalentemente com o referido primeiro domínio VL, por meio de um primeiro ligante de comprimento suficiente, de modo que o referido primeiro domínio VH e o referido primeiro domínio VL dobram-se para formar um primeiro domínio de ligação que liga-se com o CD3; e

10

15

(b) segundo domínio VH e segundo domínio VL, de um anticorpo que liga-se imunoespecificamente com o EphA2 exposto na superfície da célula, o referido segundo domínio VH liga-se covalentemente com o referido segundo domínio VL, por meio de um segundo ligante de comprimento suficiente, de modo que o referido segundo domínio VH e o referido segundo domínio VL dobram-se para formar um segundo domínio de ligação que liga-se com o referido epítipo de EphA2;

20

25

em que o referido primeiro domínio de ligação e o referido segundo domínio de ligação encontram-se covalentemente ligados por um terceiro ligante de comprimento tal que o referido primeiro domínio de ligação e o referido segundo domínio de ligação do-
5 bram-se independentemente um do outro.

2. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro domínio de ligação, o qual liga-se
10 imunoespecificamente com o CD3, liga-se com a subunidade épsilon (ϵ) do CD3.

3. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o primeiro domínio de ligação, específico para a subunidade ϵ
15 do CD3, encontra-se localizado na parte N-terminal relacionada com o segundo domínio de ligação.

4. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o primeiro domínio de ligação, específico para a subunidade ϵ
20 do CD3, encontra-se localizado na parte C-terminal relacionada com o segundo domínio de ligação.

25 5. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação encontram-se dispostos na ordem $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VH_{EphA2}-VL_{EphA2}$.

6. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o primeiro domínio de ligação, o qual liga-se imunoespecificamente com a subunidade ϵ do CD3, é desimunizado.

7. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os domínios VH e/ou VL do segundo domínio de ligação são os domínios VH e/ou VL de EA2, EA3, EA4, EA5, 3F2, 4H5, 2A4, 2E7, 12E2, Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, Eph101.530.241, 233 ou G5.

8. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o comprimento de sequência dos primeiro, segundo e terceiro ligantes compreende pelo menos 5 resíduos, pelo menos 10 resíduos, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos ou pelo menos 30 resíduos.

9. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro ligante, entre o primeiro domínio variável de cadeia pesada e o primeiro domínio variável de cadeia leve do referido primeiro domínio de ligação que liga-se com a subunidade ϵ do CD3, compreende a sequência SEQ ID NO: 57.

10. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido segundo ligante, entre o segundo domínio variável de cadeia pesada e o segundo domínio variável de cadeia leve do referido segundo domínio de ligação que liga-se com o EphA2, compreende a sequência SEQ ID NO: 59.

11. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o terceiro ligante, entre o referido primeiro domínio de ligação e o referido segundo domínio de ligação, compreende a sequência SEQ ID NO: 58.

12. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os domínios VH e/ou VL do primeiro domínio de ligação são do anticorpo de anti-CD3 que é humanizado.

13. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os domínios VH e/ou VL do segundo domínio de ligação são do anticorpo de EphA2 que é humanizado.

14. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro domínio de ligação liga-se com a subunidade ϵ do CD3, com uma afinidade menor que o referido segundo domínio de ligação que liga-se ao EphA2.

15. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação do primeiro domínio de ligação, o qual liga-se com a subunidade ϵ do CD3, é 4×10^{-7} M.

5

16. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação do segundo domínio de ligação, o qual liga-se com o EphA2, é $1,13 \times 10^{-7}$ M.

10

17. Anticorpo de cadeia simples biespecífico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de SEQ ID NO: 65.

15 18. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo de cadeia simples biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

20 19. Método de tratamento, prevenção ou gerenciamento de câncer, em que as células cancerígenas expressam EphA2, em indivíduos que necessitem do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração, ao referido indivíduo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo de
25 cadeia simples biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo de cadeia simples biespecífico liga-se com o EphA2 quando expresso na célula, sem o contato de célula com célula.

5

21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o referido câncer é câncer metastático.

10

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma terapia adicional anti-câncer, que não a de anticorpo de cadeia simples biespecífico.

15

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a terapia adicional anti-câncer é selecionada do grupo consistindo de quimioterapia, terapia biológica, imunoterapia, radioterapia, terapia hormonal e cirurgia.

20

24. Método de tratamento, prevenção ou gerenciamento de infecções em indivíduos que necessitem do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração, ao referido indivíduo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo de cadeia simples biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e um veículo farmacologicamente aceitável.

25

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida infecção é infecção por patógeno intracelular.

5 26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida infecção é infecção por vírus sincicial respiratório (RSV).

10 27. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de terapia adicional.

15 28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida terapia adicional é terapia anti-viral, terapia anti-fúngica, terapia anti-bacteriana ou terapia anti-protozoário.

20 29. Método de tratamento, prevenção ou gerenciamento de desordens de células hiperproliferativas não-cancerígenas em indivíduos que necessitem do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração, ao referido indivíduo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo de cadeia simples biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e um veículo
25 farmacologicamente aceitável.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que as referidas desordens de células hiperproliferativas não-cancerígenas são asma, COPD,

fibrose pulmonar, asbestose, EPF, DIP, UIP, fibrose renal, fibrose do fígado, outras fibroses, hiper-responsividade brônquica, psoríase, dermatite seborréica, fibrose cística, ou desordens de células endoteliais hiperproliferativas, tais como restenose, doença vascular hiperproliferativa, Síndrome de Behcet's, aterosclerose, degeneração macular, ou desordens de fibroblastos hiperproliferativas.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de terapia adicional.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a referida terapia adicional é terapia anti-viral ou de agente imunomodulatório.

33. Método de acordo com a reivindicação 19, 24 ou 29, caracterizado pelo fato de que o referido indivíduo é um ser humano.

Figura 1A

gac atc aag atg acc cag tct cca tct tcc atg tat gca tct cta gga	48														
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly															
1 5 10 15															
CDR1															
gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac att aat aac tat	96														
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr															
20 25 30															
CDR2															
tta agc tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct aag acc ctg atc	144														
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile															
35 40 45															
CDR2															
tat cgt gca aac aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc	192														
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly															
50 55 60															
CDR3															
agt gga tct ggg caa gat tat tct ctc acc atc agc agc ctg gag tat	240														
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr															
65 70 75 80															
CDR3															
gaa gat atg gga att tat tat tgt ctg aaa tat gat gag ttt ccg tac	288														
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr															
85 90 95															
CDR4															
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	321														
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys															
100 105															

[illegible]

Figura 2A

gat	gtk	gtk	atg	acb	cag	act	cca	ctc	act	ttg	tcg	ggt	acc	att	gga	48
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Ile	Gly	
1				5					10					15		
CDR1																
caa	cca	gcc	tct	atc	tct	tgc	aag	tca	agt	cag	agc	ctc	tta	tat	agt	96
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	
			20					25					30			
aat	gga	aaa	acc	tat	ttg	aat	tgg	ttg	tta	cag	agg	cca	ggc	cag	tct	144
Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	
		35					40					45				
CDR2																
cca	aag	cgc	cta	atc	tat	ctg	gtg	tct	aaa	ctg	gac	tct	gga	gtc	cct	192
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
gac	agg	ttc	act	ggc	agt	gga	tca	gga	aca	gat	ttt	aca	ctg	aaa	atc	240
Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
65					70				75					80		
agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	ttg	gga	ggt	tat	tac	tgc	gtg	caa	ggg	288
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Gly	
				85				90					95			
CDR3																
tca	cat	ttt	cag	tgg	acg	ttc	ggg	gga	ggc	acc	aag	ctg	gaa	atc	aaa	336
Ser	His	Phe	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110			

Figura 2B

gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag cta gtg aag act ggg gct	48														
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala															
1 5 10 15															
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggt tac	96														
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr															
20 25 30															
CDR1															
tac atg cac tgg gtc aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att	144														
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile															
35 40 45															
CDR2															
gga tat att agt tgt tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc	192														
Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe															
50 55 60															
aag ggc aag gcc aca ttt act gta gac aca tcc tcc agc aca gcc tac	240														
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr															
65 70 75 80															
atg cag ttc aac agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat tac tgt	288														
Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys															
85 90 95															
CDR3															
gca aga tct cat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc	336														
Ala Arg Ser His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr															
100 105 110															
gtc tcc tca	345														
Val Ser Ser															
115															

Figura 3

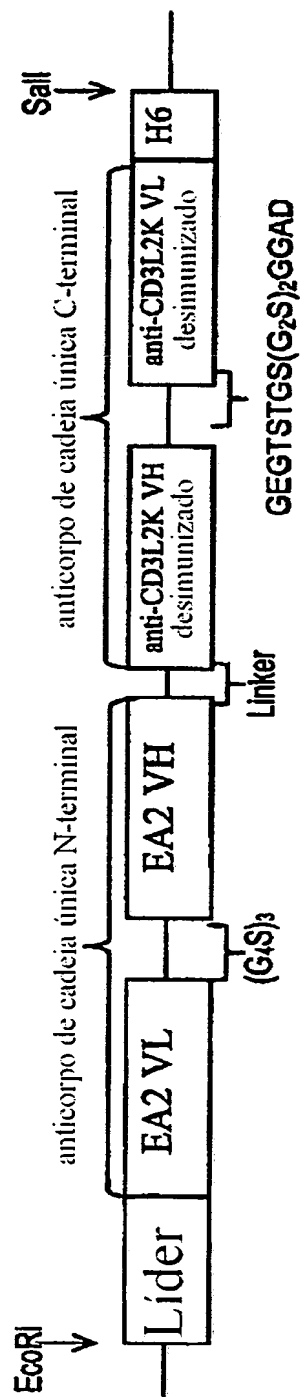


Figura 4

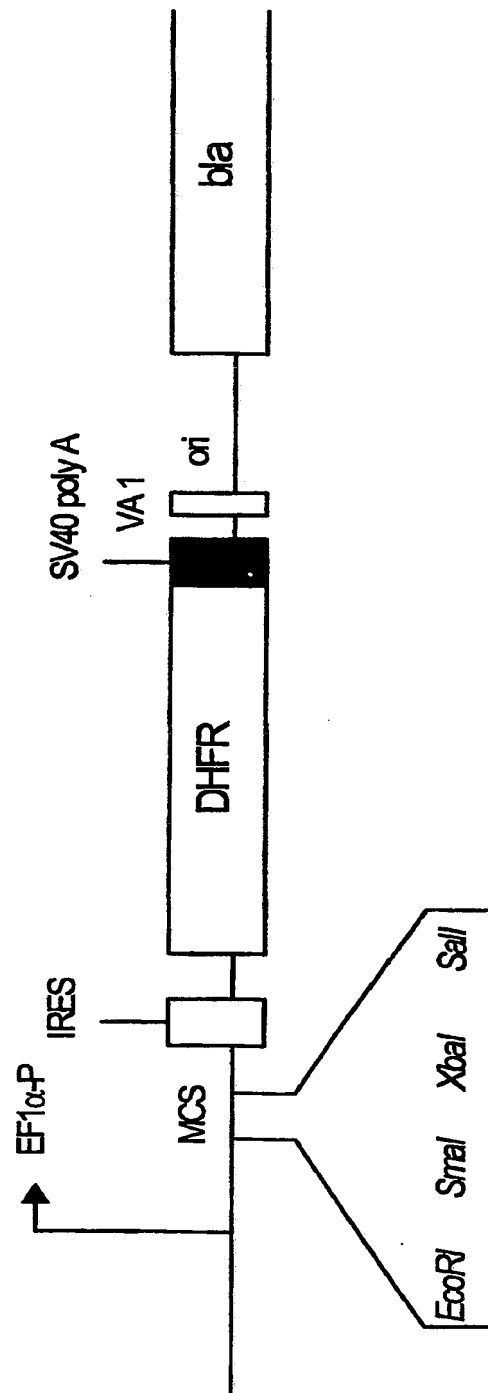


Figura 5

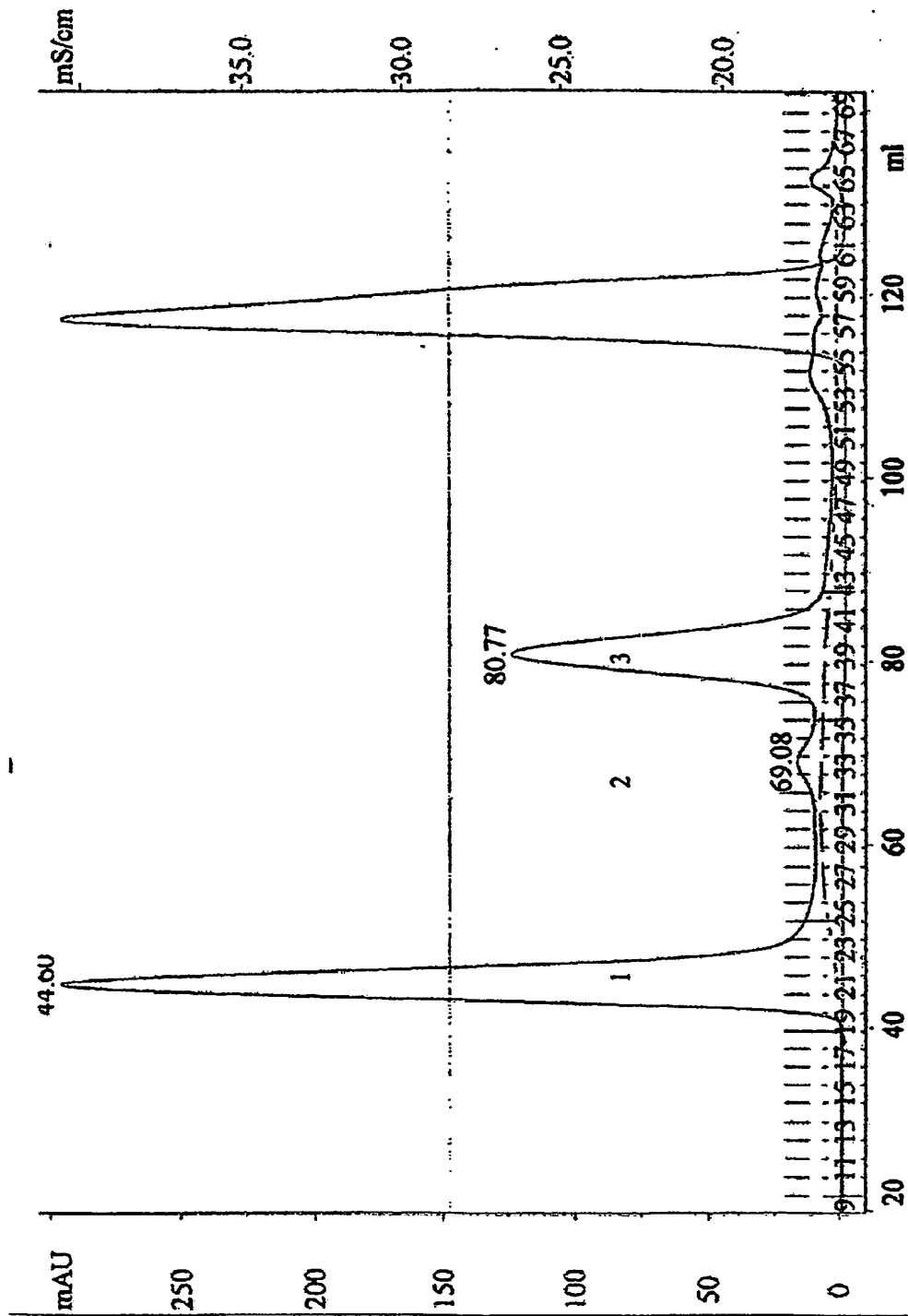
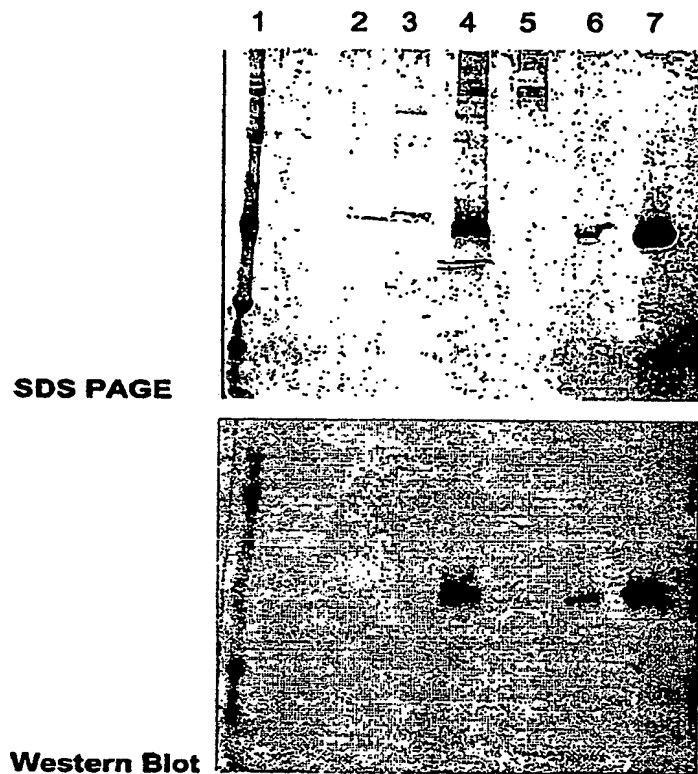


Figura 6

- 1: Padrão de peso molecular
- 2: corrida IMAC
- 3: lavagem IMAC
- 4: eluato IMAC
- 5: agregados da Gel filtração
- 6: dímero BiTE da Gel filtração
- 7: monômero BiTE da Gel filtração

Figura 7

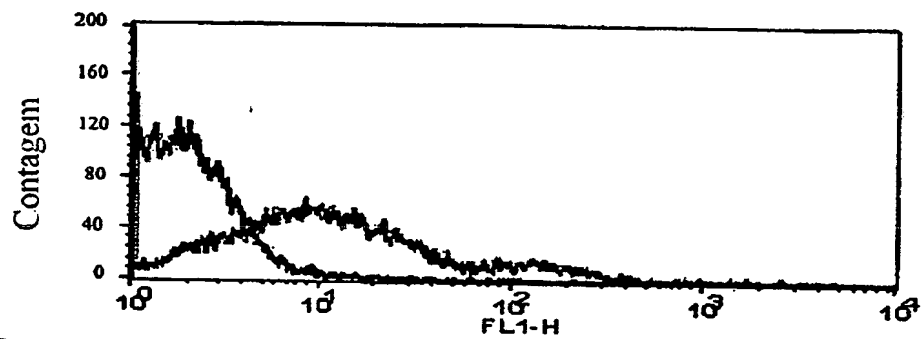
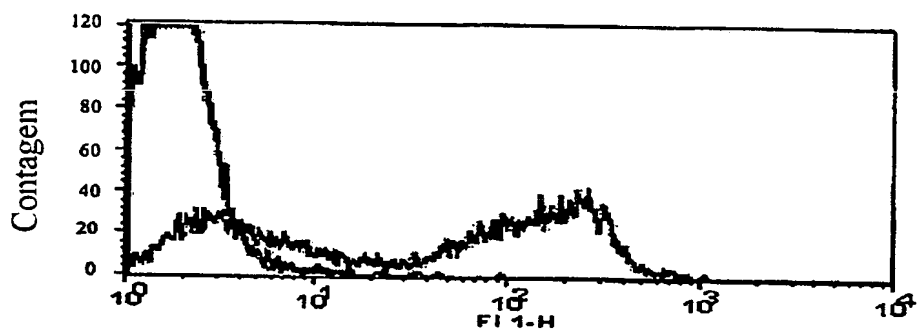
Cynomologous PBMC**A****cCD3-1****B****cCD3-2**

Figura 8

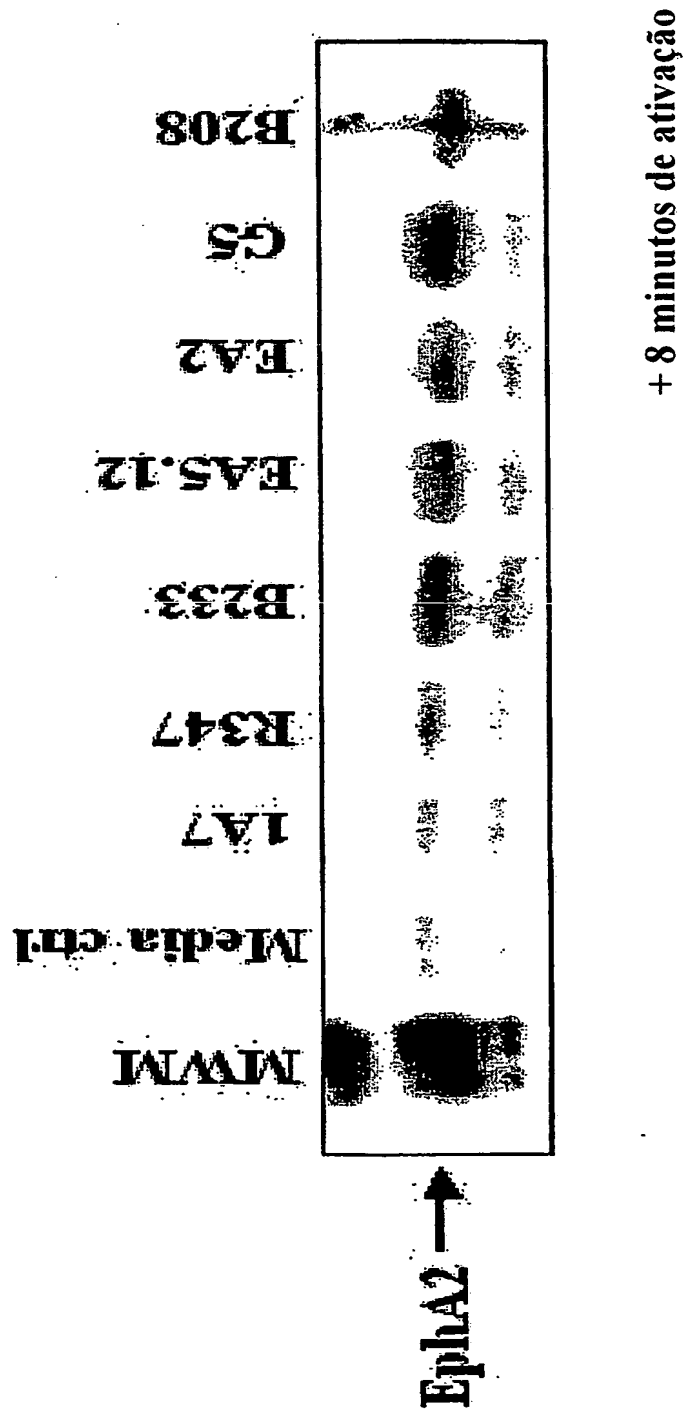


Figura 10

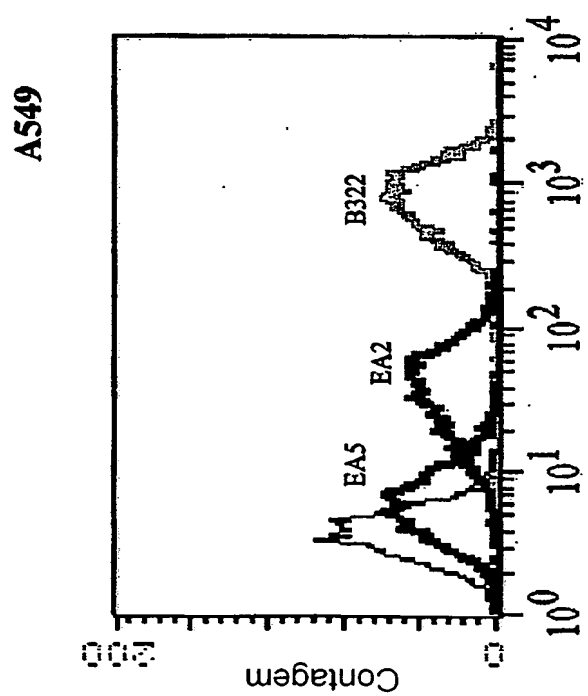
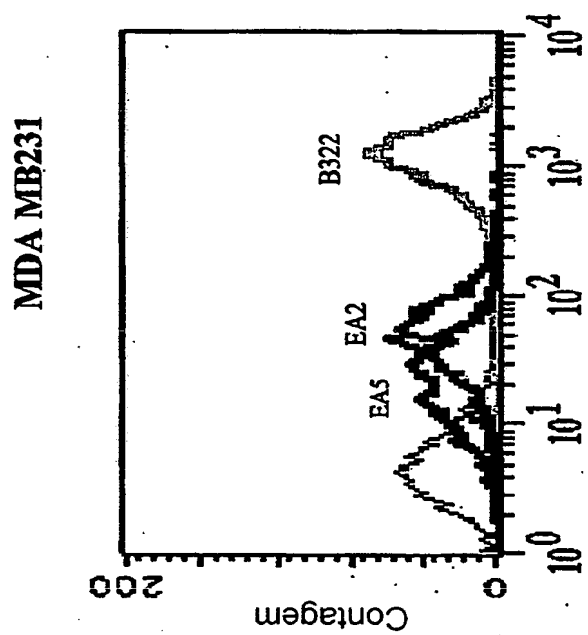


Figura 11

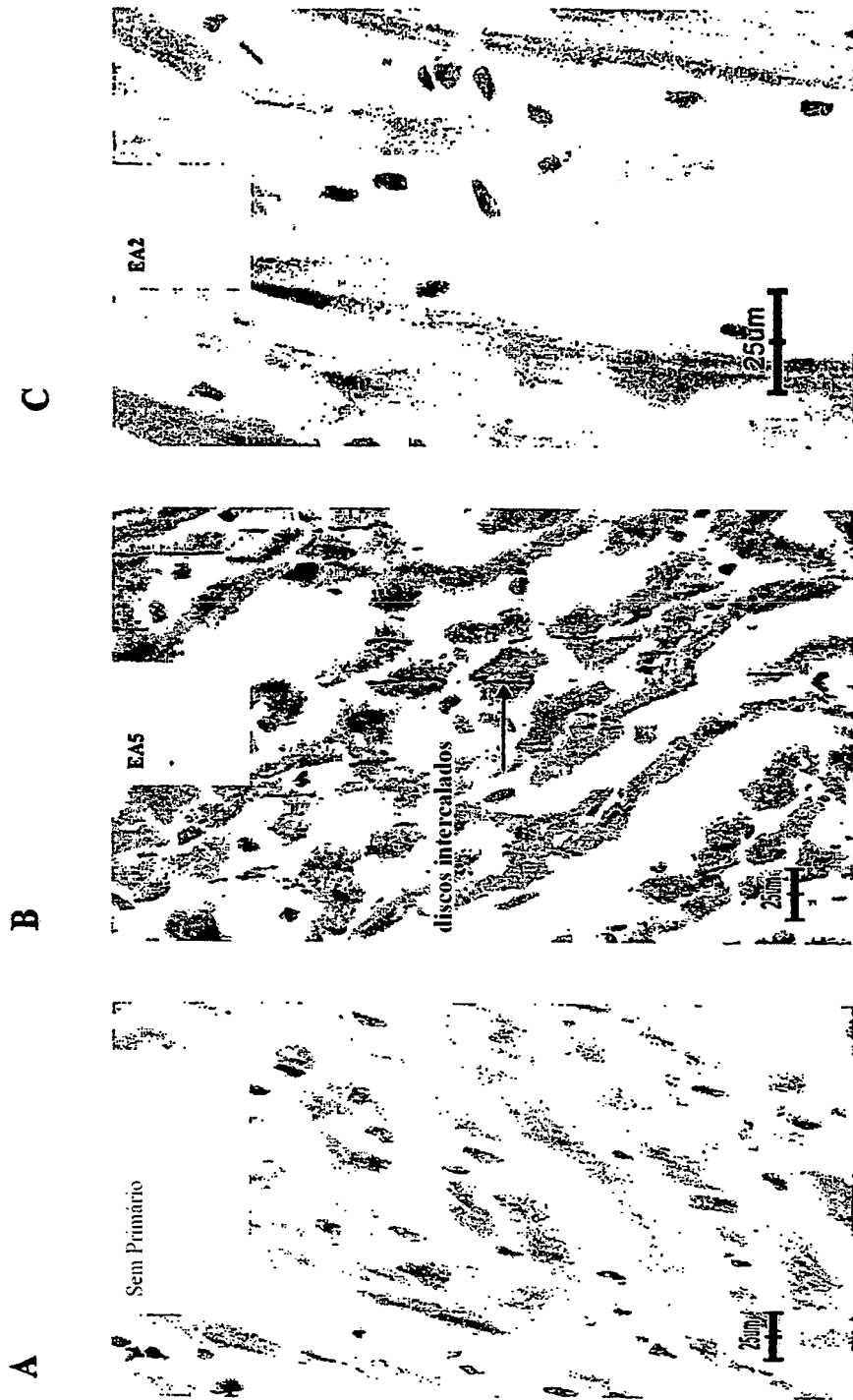


Figura 12

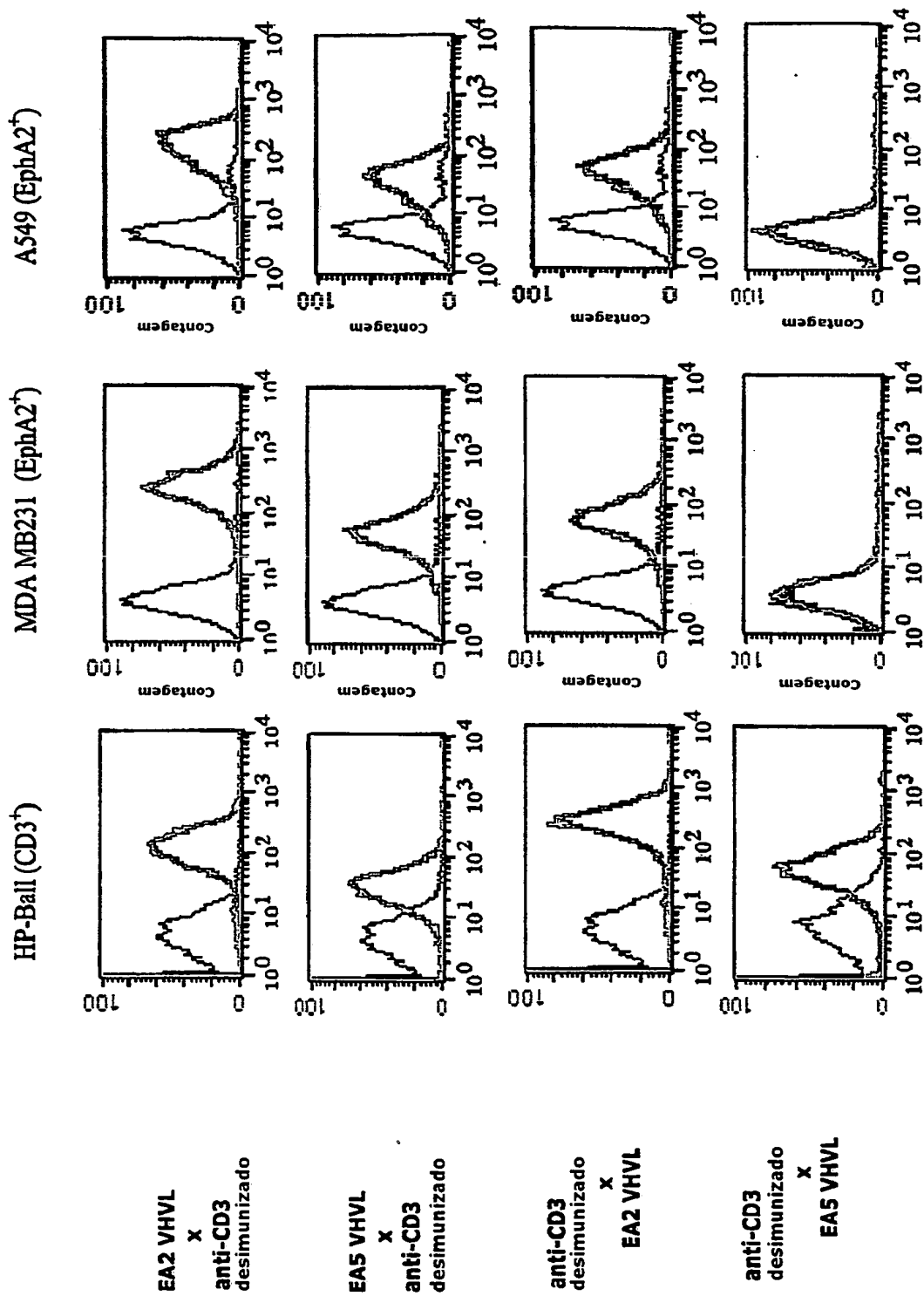
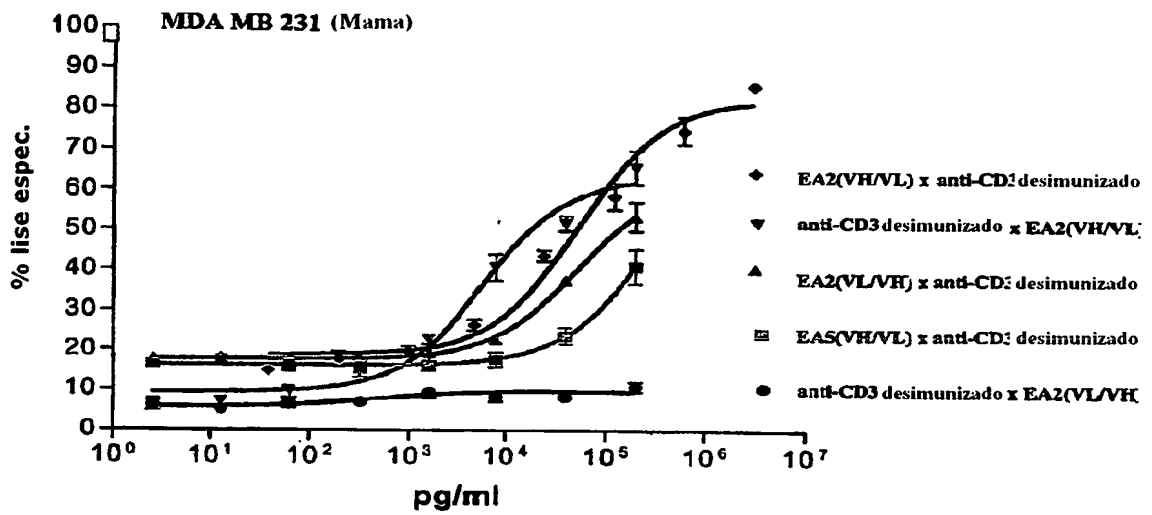


Figura 13

A



B

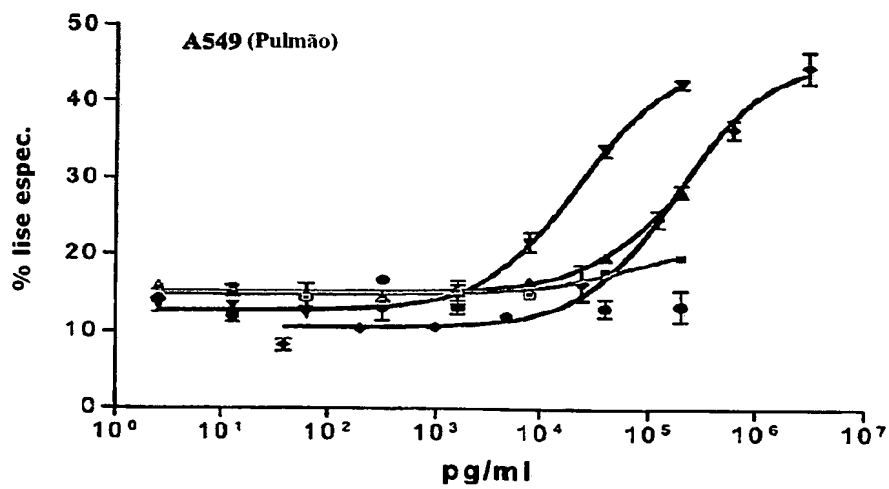


Figura 14 A

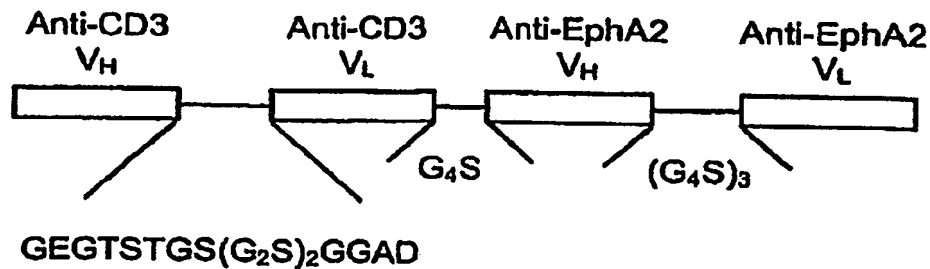


Figura 14 B

gaattcaccATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACACT
 CCgacgtccaactggtgcagtcaggggctgaagtgaaaaaacctggggcctcagtggaaggtgtc
 ctgcaaggcttctggctacacctttactaggtacacgatgcactgggtaaggcaggcacctgga
 caggtctggaatggattggatacattaatcctagccgtgggtataactaattacgcagacagcg
 tcaagggccgcttcacaatcactacagacaaatccaccagcacagcctacatggaactgagcag
 cctgcgttctgaggacactgcaacctattactgtgcaagatattatgatgatcattactgcctt
 gactactggggccaaggcaccacggtcaccgtctcctcaggcgaaggtactagtactggttctg
gtggaagtggaggttcaggtggagcagacgacattgtactgaccagtcctccagcaactctgtc
 tctgtctccaggggagcgtgccaccctgagctgcagagccagtc aaagtgt aagttacatgaac
 tggtagcagcagaagccgggcaaggcacc caaaagatggatttatgacacatccaaagtggctt
 ctggagtcctctgctcgcttcagtggcagtggggtctgggaccgactactctctcacaatcaacag
 ctggaggctgaagatgctgccacttattactgccaacagtgaggtagtaaccgcgtcacgttc
 ggtggcgggaccaaggtggagatcaaatccggaggtggtggatccgacgtgaagctggtggagt
 ctgggggaggttagtgaaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcac
 tttcagtagctataccatgtcttgggttcgccagactccagagaagaggctggagtggtgcga
 accattagtagtggtggtacttacactactatccagacagtggtgaaggggccgattcaccatct
 ccagagacaatgccaaagaacacctgtacctgcaaatgagcagtcgtgaagtcctgaggacacagc
 catgtattactgtacaagagaagctatctttacttactggtggggccaagggactctggtcactgtc
 tcttcctccggtggtggtggttctggcgccggcggtccggtggtggtggttctgacatcaaga
tgaccagtcctccatcttccatgtatgcatctctaggagagagagtcactatcacttgcaaggc
 gagtcaggacattaataactatttaagctggttccagcagaaaccagggaaatctcctaagacc
 ctgatctatcgtgcaaacagattggtagatgggggtcccatcaagggttcagtggcagtggtctg
 ggcaagattattctctcaccatcagcagcctggagtatgaagatatgggaatttattattgtct
 gaaatatgatgagtttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacatcatcac
catcatcattagtgac

DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNAD
 SVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTG
 SGGSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQKPKGKAPKRWIYDTSKV
 ASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKSGGGGSDVKLVE
 SGGGLVKPGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGTYTYYPDSVKGRFTIS
 RDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCYTREAFTYWQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIKM
 TQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQ
 DYSLTISSLEYEDMGIIYCLKYDEFPTYFGGGTKLEIKHHHHHH

Figura 15

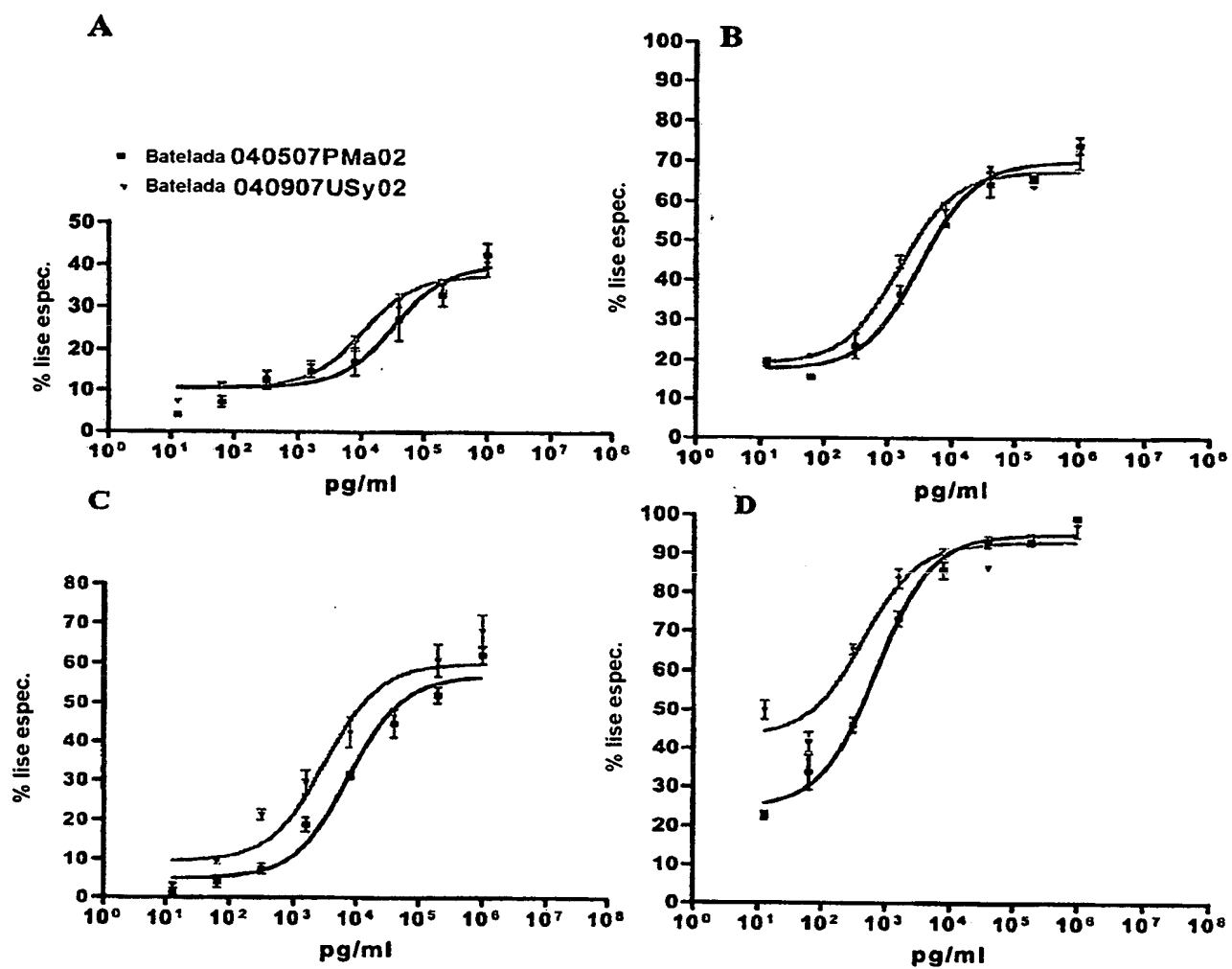


Figura 16

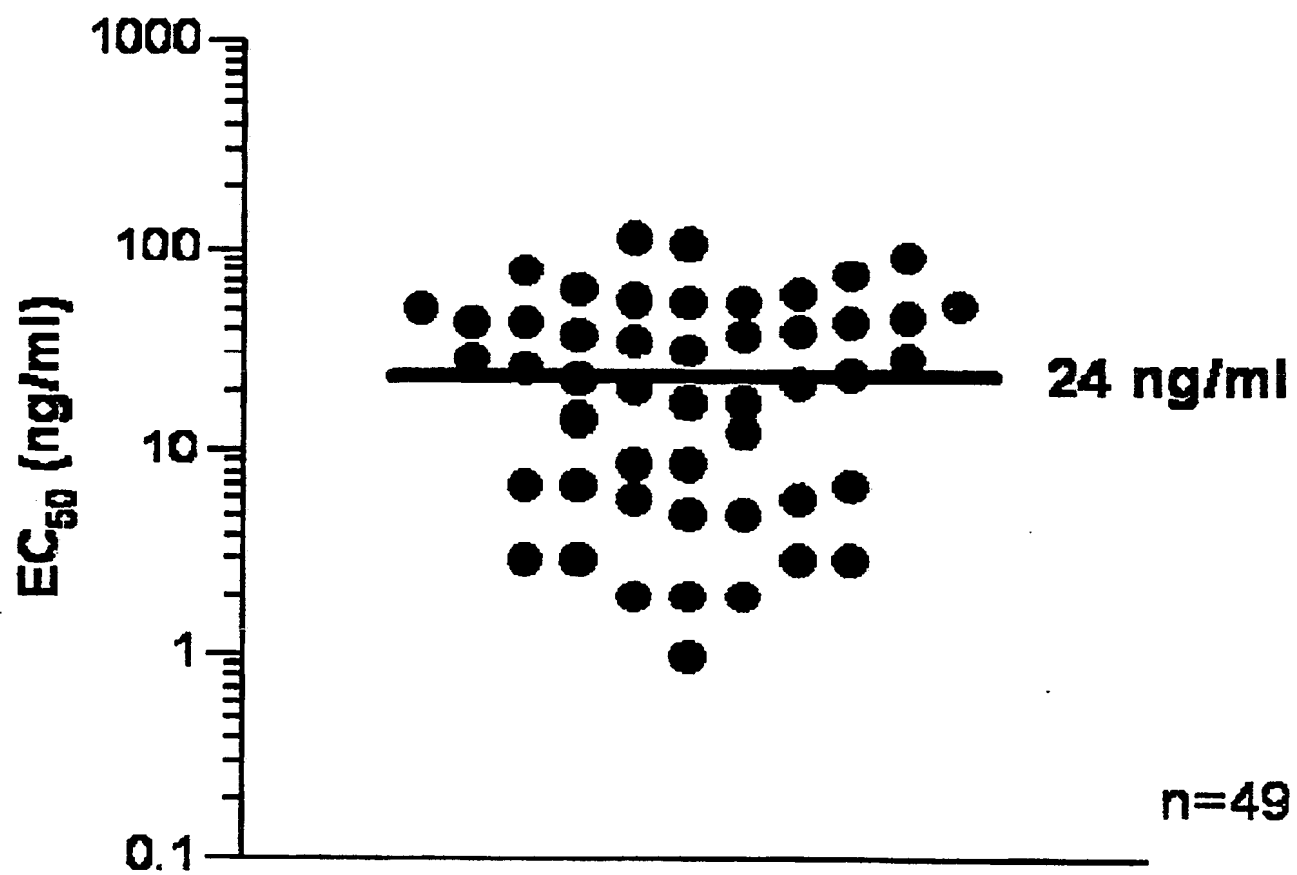


Figura 17

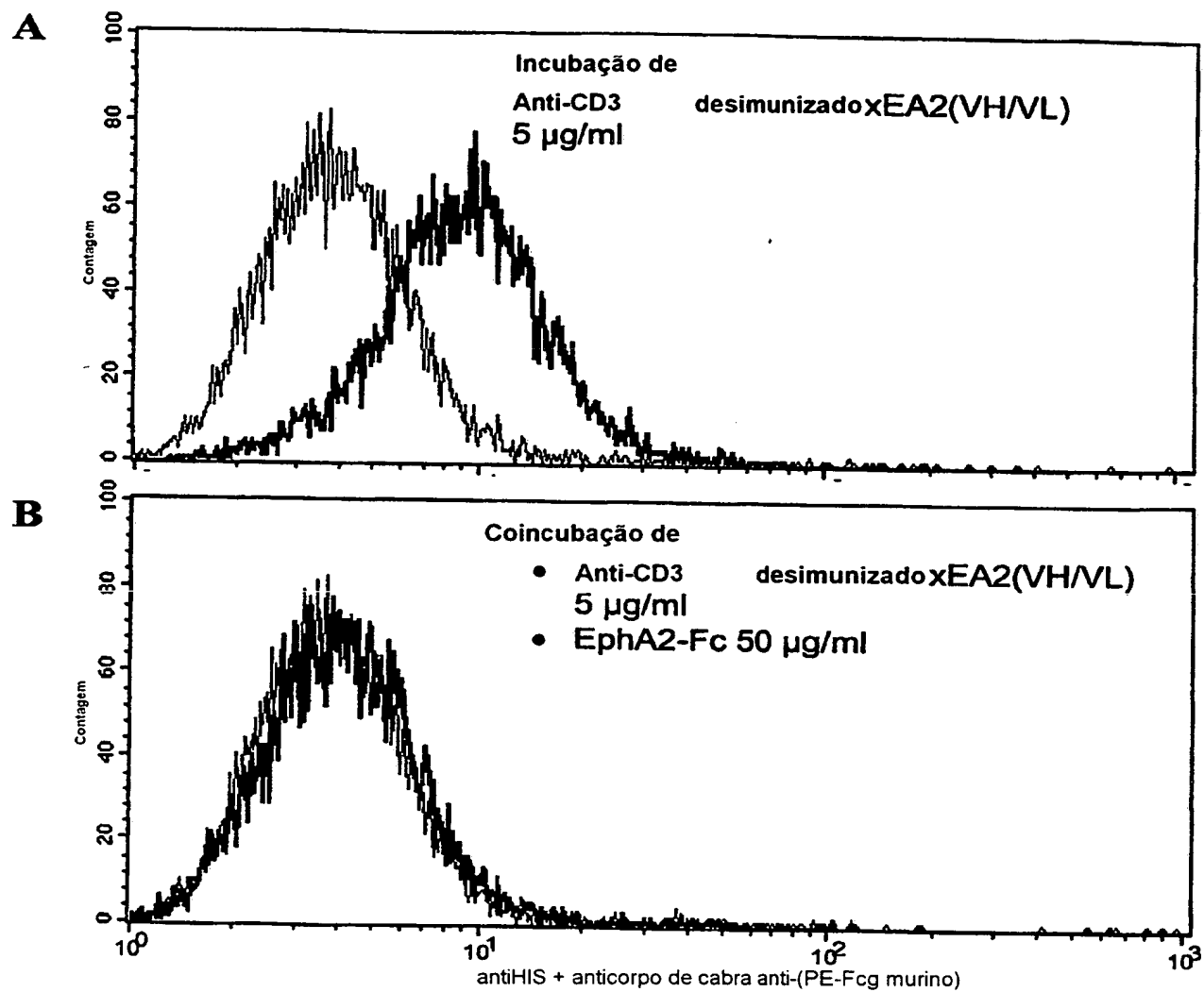
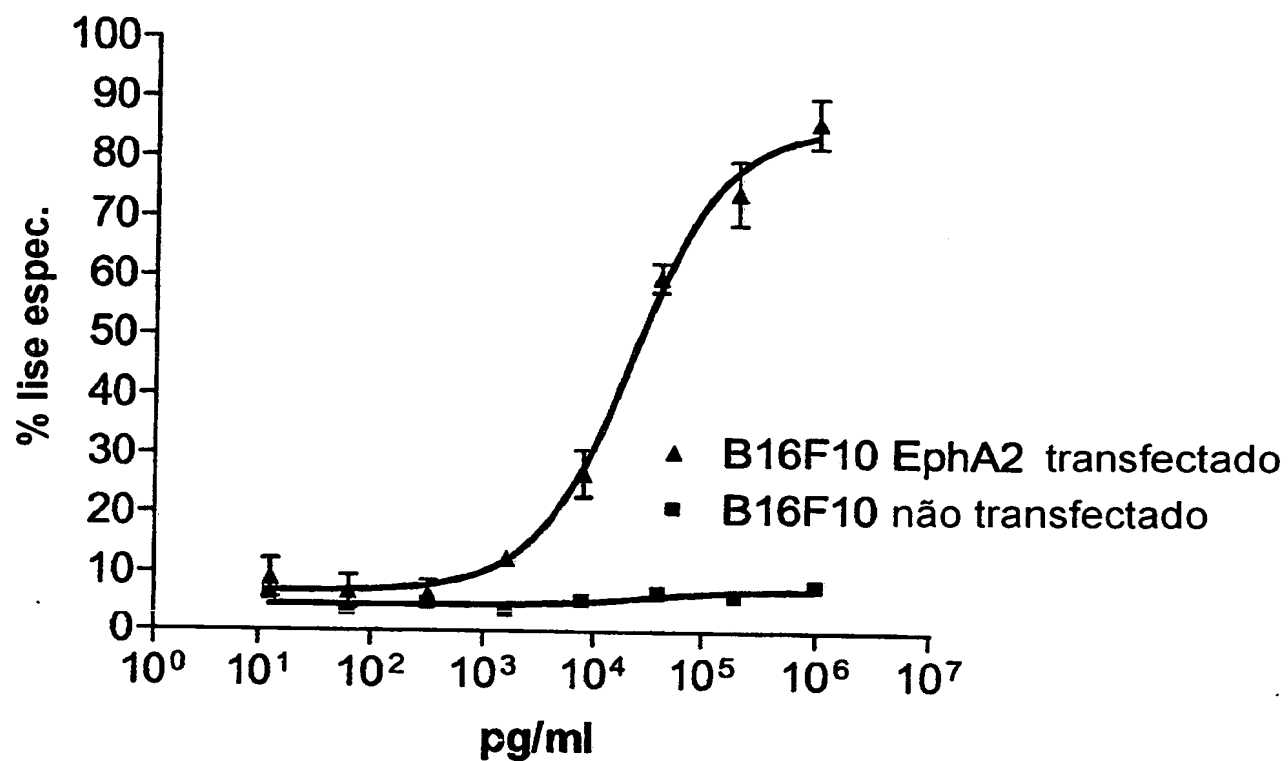


Figura 18



	EC 50 [ng/ml]
B16 F10 EphA2 transfectedo	21.7
B16 F10 não transfectedo	n. a.

Figura 19

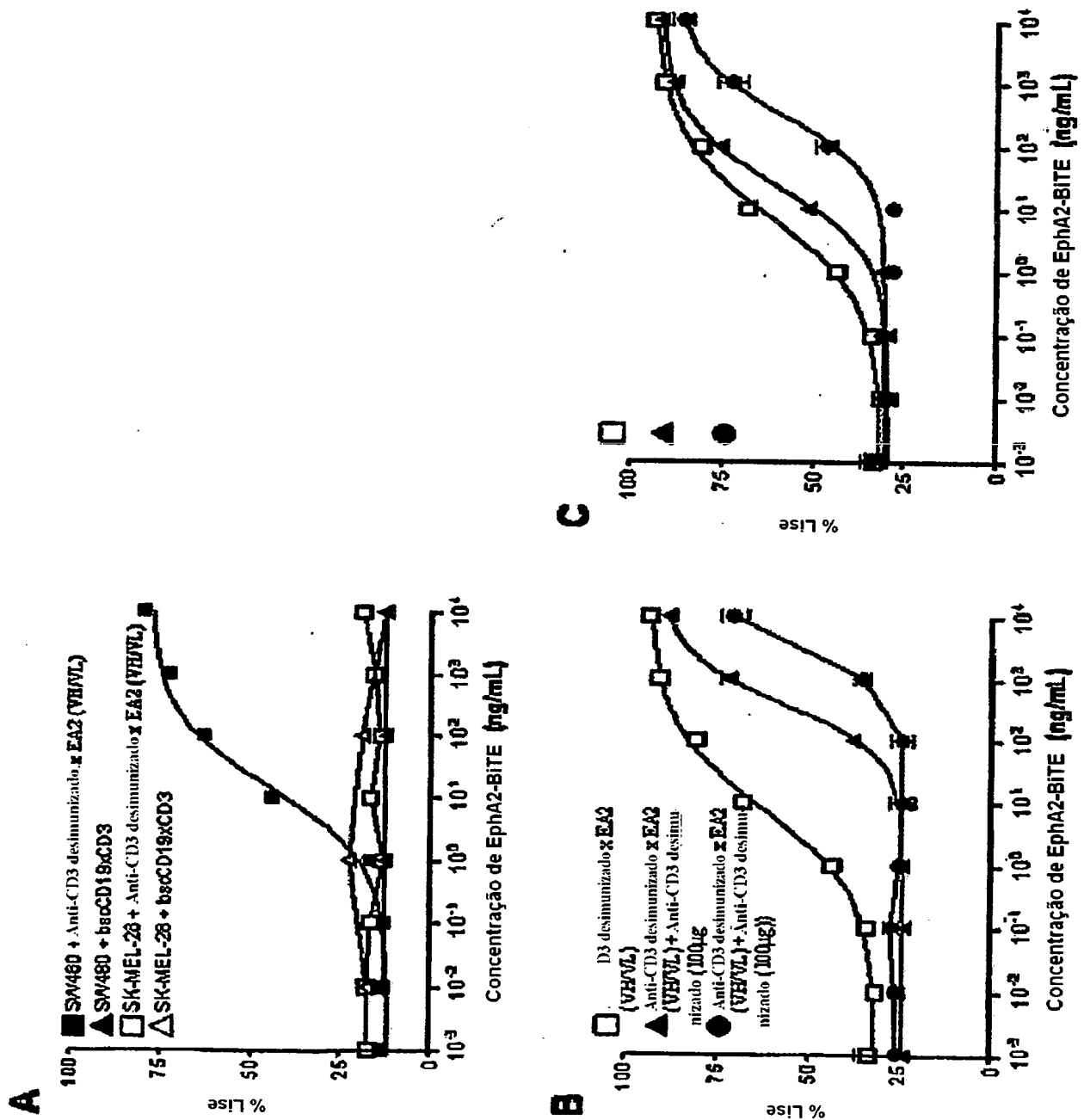


Figura 20

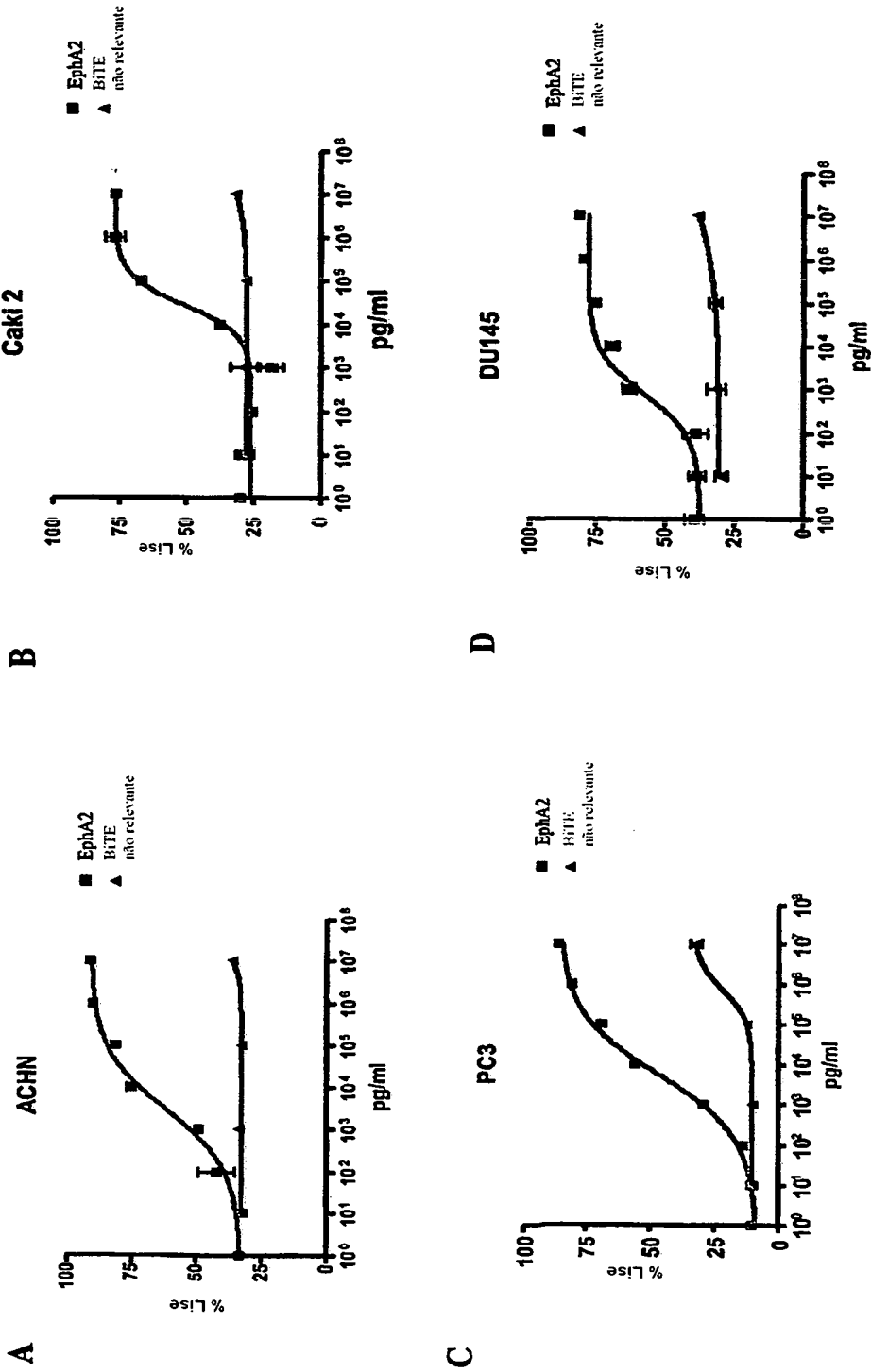


Figura 21

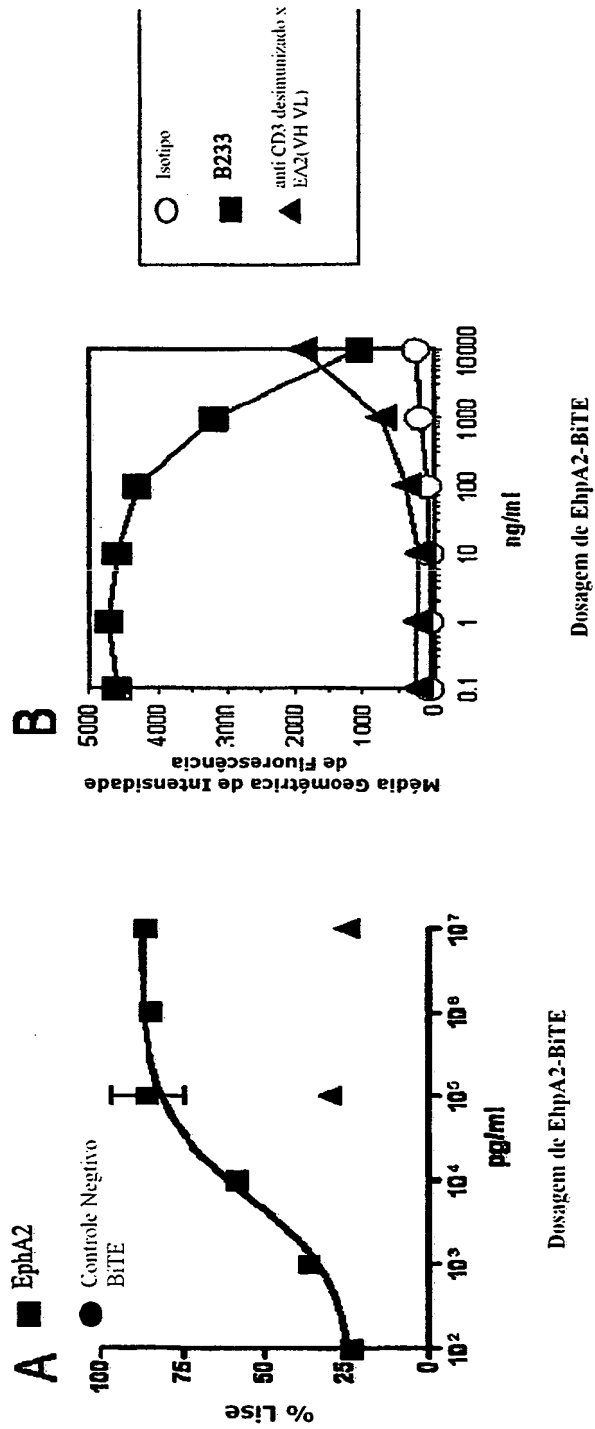


Figura 22

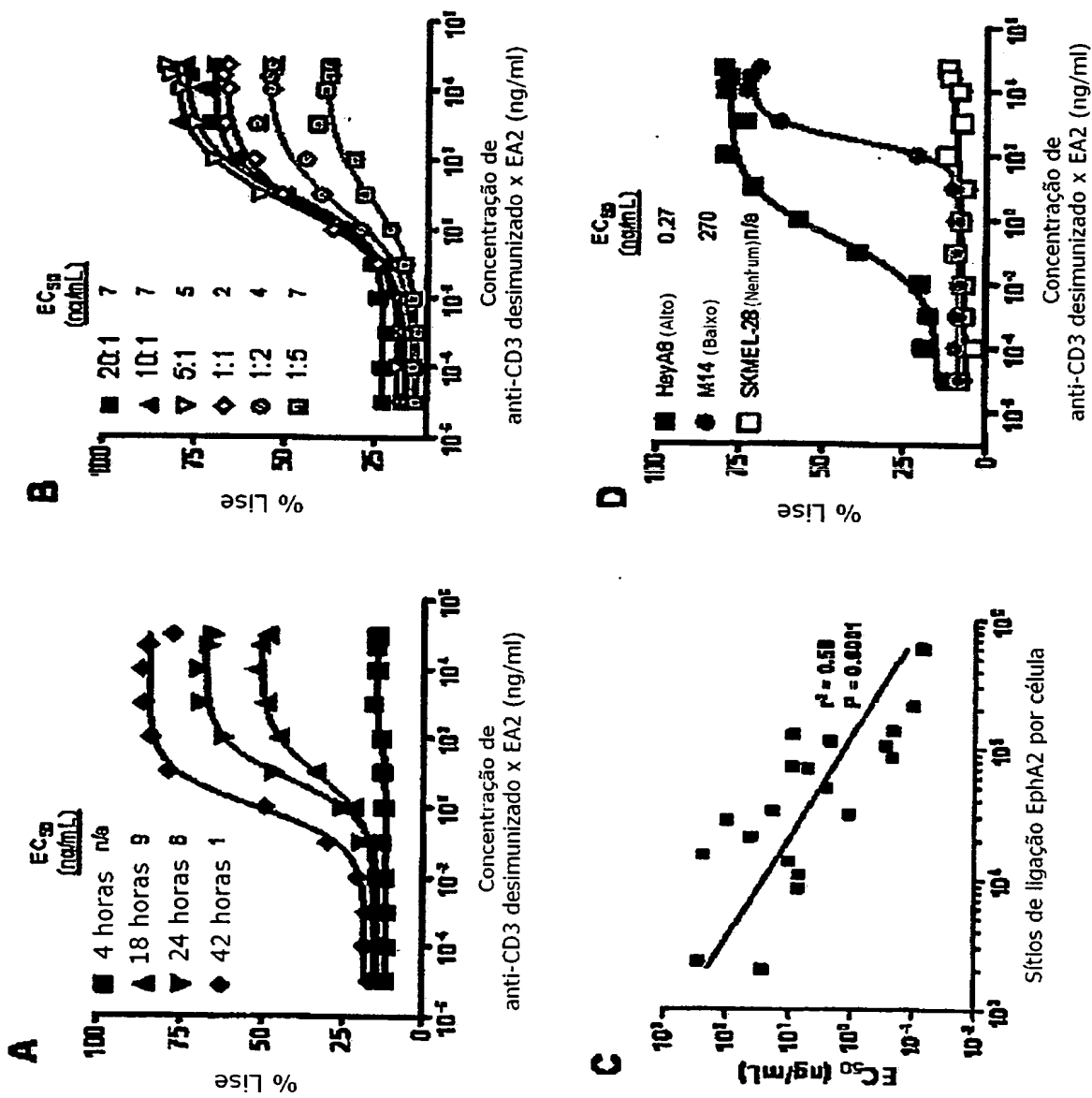
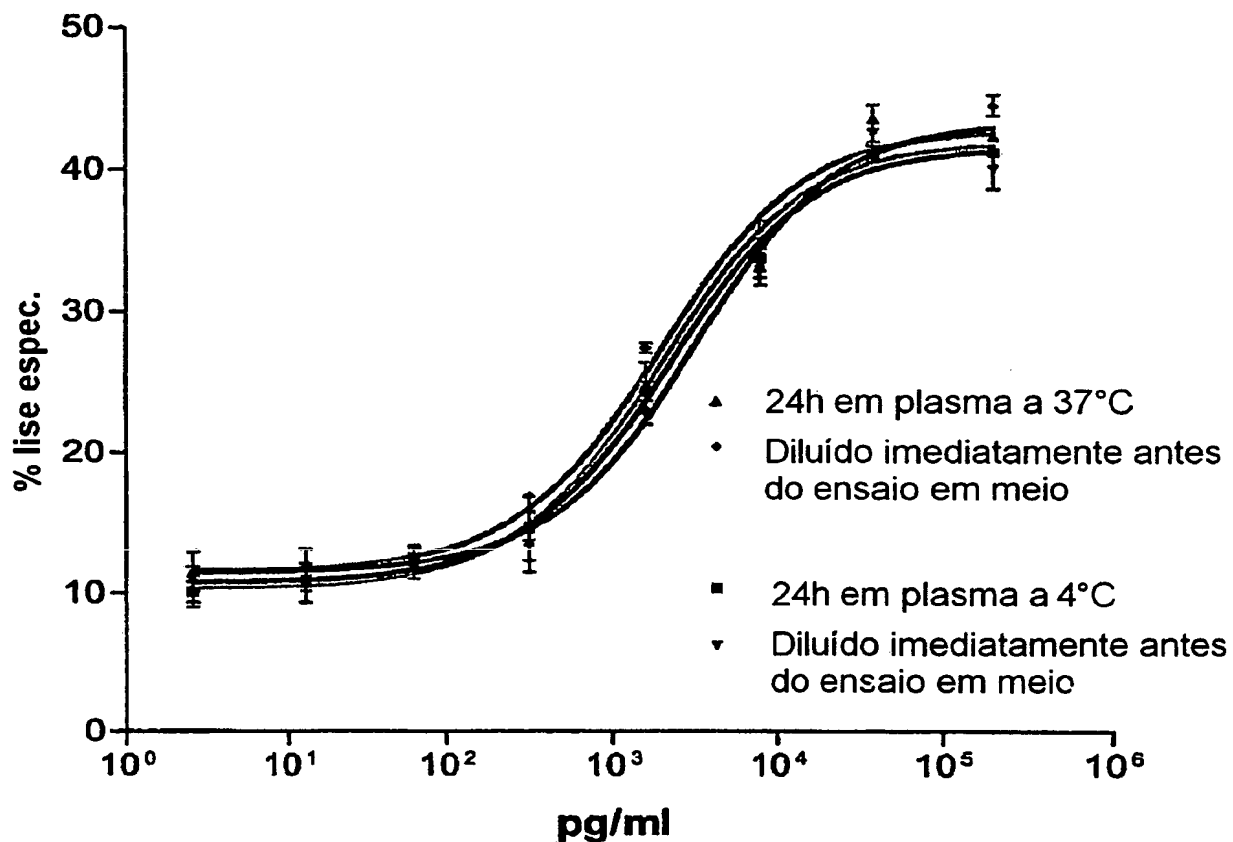


Figura 23



EC ₅₀ [ng/ml] de anti-CD3 desimmunizadoxEA2 (VH/VL)		R ²
24 h em plasma a 37°C	3.1	0.972
Diluído imediatamente antes do ensaio em meio	1.9	0.977
24 h em plasma a 4°C	2.2	0.977
Diluído imediatamente antes do ensaio em plasma	2.0	0.981

Figura 24

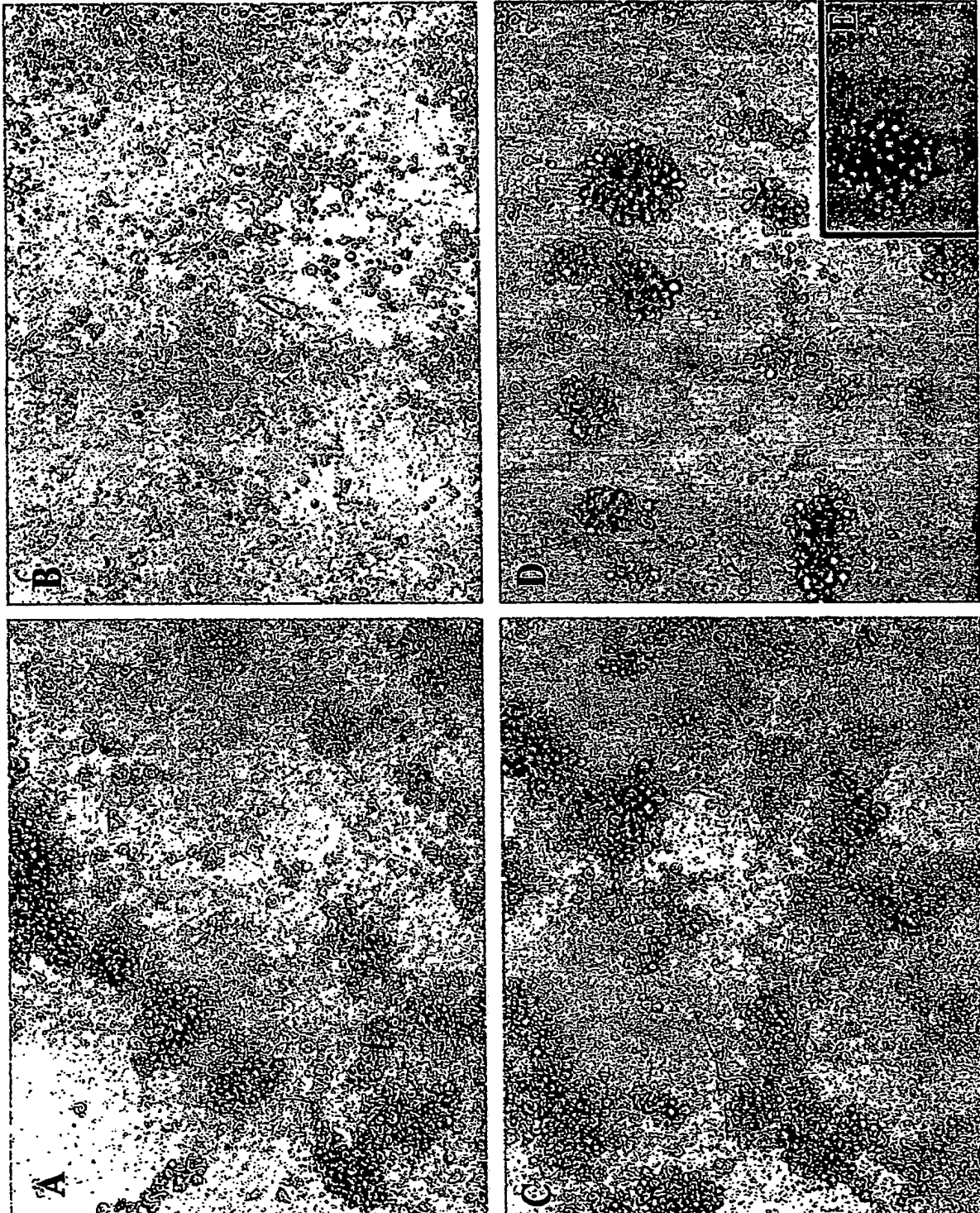
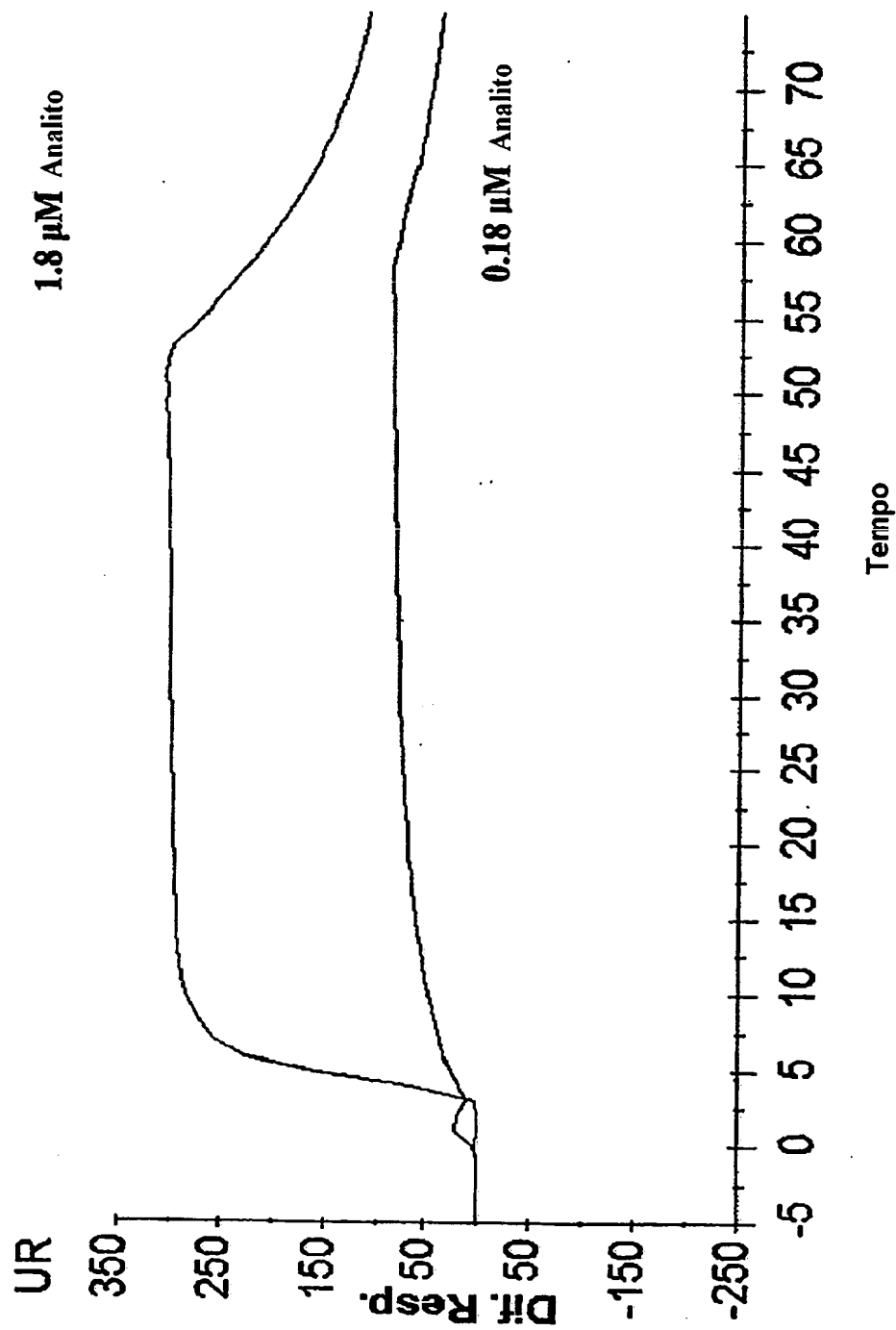


Figura 25



Anti-CD3 desiminizado x EA2 (VH/VL)	
K_d	$4.26 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
K_a	$9.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
K_D	$4.46 \times 10^{-8} \text{ M}$

Figura 26

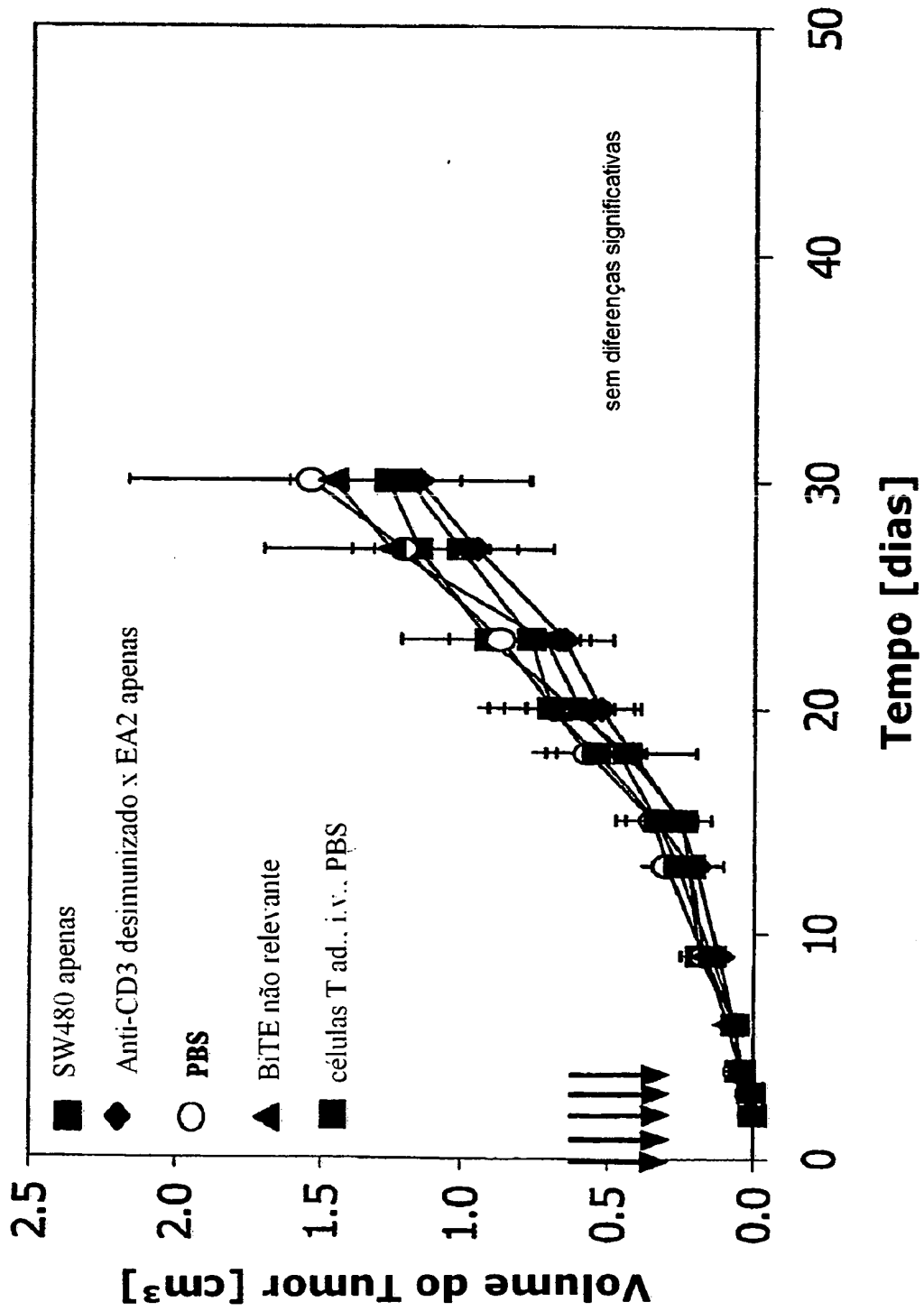


Figura 27

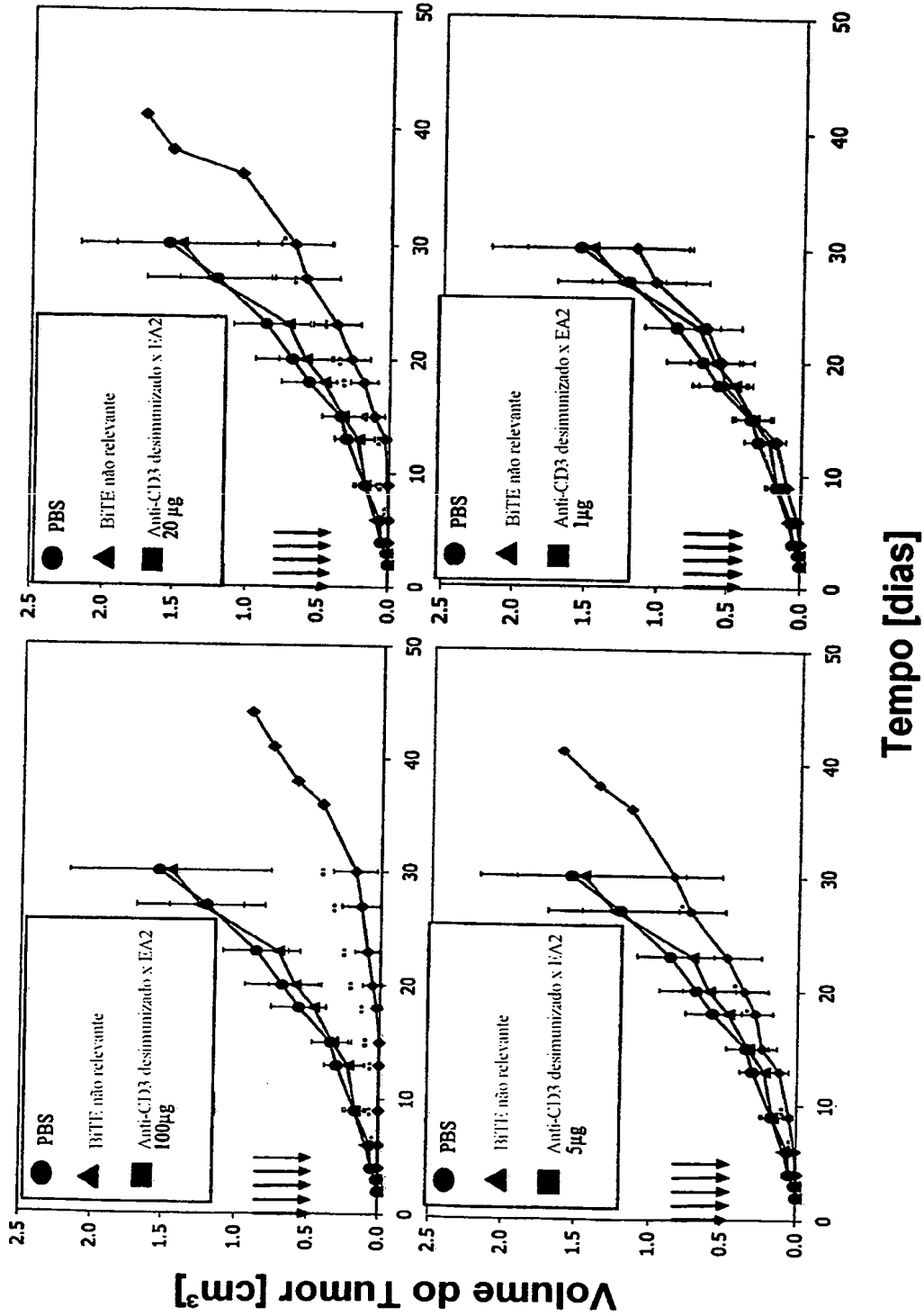


Figura 28

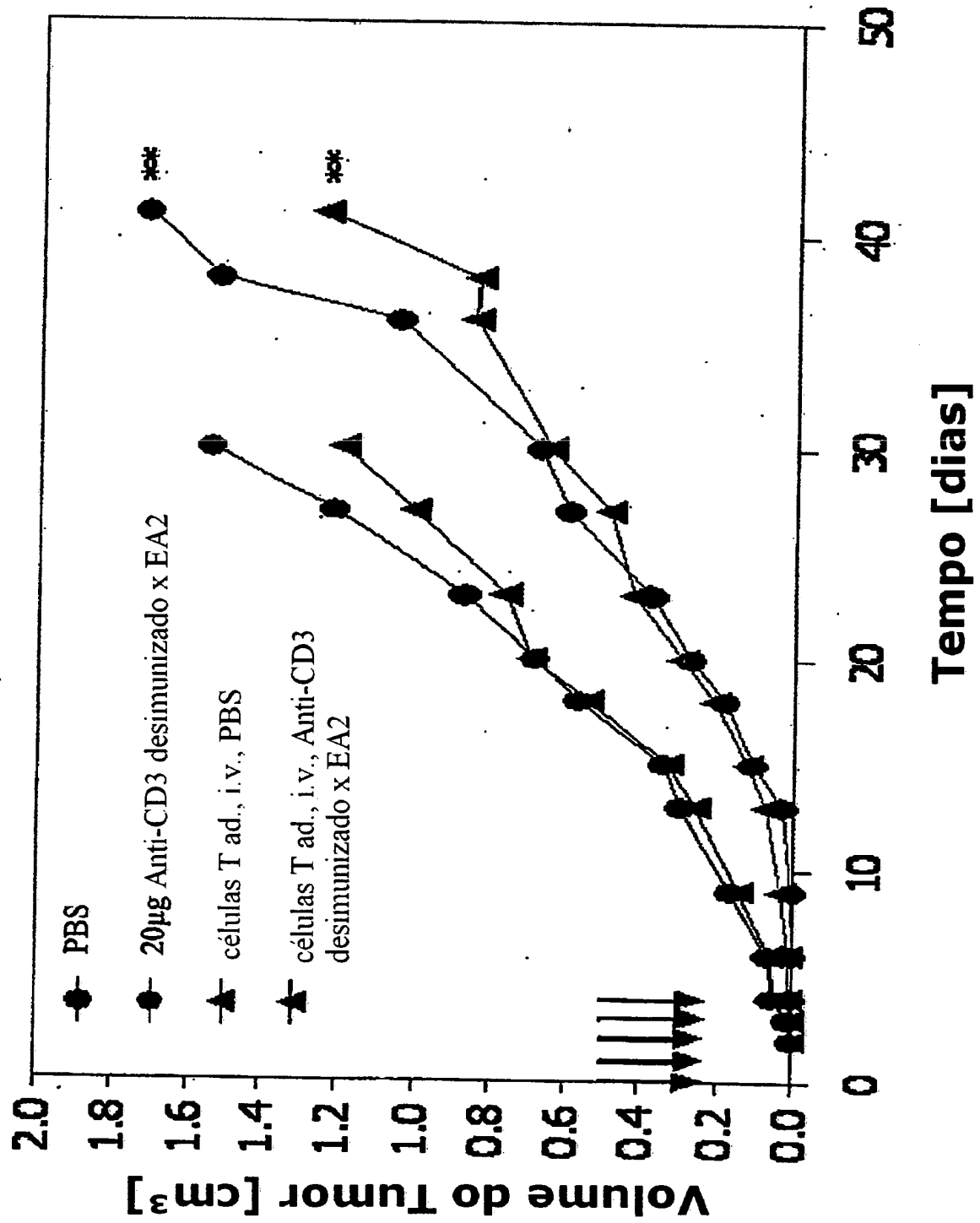


Figura 29A

DIVLTQSPATLSVTPGDSVNLSC**CDR1**
RASQISISNNLHWYQQKSHESPRLLIK**CDR2**
YVFQSIGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFC**CDR3**
QQSNSWPLTFGAGTKLELK

Figura 29B

EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFT**CDR1**
DYSMNWVRQPPGKALEWLG**CDR2**
FIRNKAN
DYTTEYSASVKGRFTISRDNLSQSYLQMNALRAEDSATYYCVR**CDR3**
YPRYHAMDSWGQ
GTSVTVSS

Figura 30A

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTC **CDR1** RASQISISNNLH WYLQKPGQSPQLLIY **CDR2** YGFQSI **GVP**
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC **CDR3** QQANSWPLT FGGGTKLEIK

Figura 30B

EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTVS **CDR1** DYSMN WVRQAPGKGLEWIG **CDR2** FIRNKAN
AYTTEYSASVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT **CDR3** YPRYHAMDS **WG**
QGTMTVTVSS

Figura 31



Figura 32A

CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTAT
 ACCATGTCTTTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGAACCATTAGTGGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTG
 AAGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGACACGGCTGTGTATTACTGT
 GCGAGAGAAAGCTATCTTTACTTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTCTTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGT
 GGTCTGACATCCAGTTCAGCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCACTCTGTAGGAGACAGATCACCATCACTTGCAGAGCGGAGTCAGGACATTAAT
 AACATTTAAGCTGTACAGCAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATCGTGCAACAGATTGGTAGATGGGGTCCAGACAGGTTT
 AGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAAATTAATAACATAGAACTCTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCTGAAATATGATGTGTTT
 CCGTACACGTTCCGCCAAGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figura 32B

QVQLLESQGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYTMSTWVRQAPGQALEWNGTISGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYC
 CDR1 (VH) CDR2 (VH) CDR2 (VL)
 AREAIFTYWGRTGLVTVSSGGGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSSLASVGDRTVITCKASQDINNVLISWYQQKPGQAPRLLIYRANRLVDGVPDFR
 CDR3 (VH) [(Gly),Ser], linker CDR1 (VL) CDR2 (VL)
 SSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFC¹LYDVFPY²TFGGGTKEIK
 CDR3 (VL)

Figura 33A

CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCLGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGCAGCTAT
 ACCATGTCTTGGGTGCACAGGCCCTTGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGAACCATTAGTAGTCGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTG
 AAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
 GCGAGAGAAGCTATCTTTACTCACTGGGCGCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGTGGTTCCTGGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGT
 GGTCTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCACTCTGTAGGAGACAGATCACCATCACTTGAAGCGAGTCAGGACATTAAT
 AACTATCACAGCTGGTACCAAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATCGTGCAAAACAGATTGGTCGATGGGGTCCAGACAGGTTT
 AGTGGCAGCGGGTATGGAAACAGATTTTACCCTCACAAATTAACATAGAATCTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTGAAATATAATGTGTTT
 CCGTACACGTTCCGCCAAGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figura 33B

QVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFS[SYTMS]MVRQAPGQALEWMGFISSRGTYYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYIC
 CDR1 (VH) CDR2 (VH)
 AR[EA]IFTHMGRGTLVTVSS[GGGGSGGGSGGGGS]DIQLTQSPSSLASVGDRTVITTCASQDINNYSWYQOKPGQAPRLLIYRANRLVDGVPDRF
 CDR3 (VH) [(Gly),Ser], linker CDR1 (VL) CDR2 (VL)
 SGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFC[LYNVFPYTF]GQGTKEIK
 CDR3 (VL)

Figura 34A

CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTAT
 ACCATGTCTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGAACCAATTAGTAGTCTGGTACTTACACCTACTATFCCAGACAGTGTG
 AAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAAGAACTCAGTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
 GCGAGAGAAGCTATCTTTACTCAGTGGGCGGTGGCACCCCTGGTCAACCTCTCCTCAGGTGGTGGTCTTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGT
 GGTCTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCACTCTGTAGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCCAAGGCGAGTCAGGACATTAAAT
 AACTATGGCAGCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCGTGCAAAACAGATTGGTCGATGGGTCCAGACAGGTTTC
 AGTGGCAGCGGGTATGGAAACAGATTTTACCTTCACAAATTAATAACATAGAACTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGCTGAAATATAATCGGTTT
 CCGTACACGTTCCGGCCAAGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figura 34B

QVQLLESQGLVQPGSLRLSCAASGFTFS[SYTMS]WVRQAPGQALEWMG[TISSRGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYVC
 CDR1 (VH) CDR2 (VH)
 CDR3 (VH) [(Gly),Ser], linker
 AREA[FTH]MGRGTLVTVSS[GGGGSGGGGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDINNIGSMWYQQKPGQAPRLLIYRANRLVD]GVPDFR
 CDR1 (VL) CDR2 (VL)
 CDR3 (VL)
 SCSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFC[LKYNRPPT]FGQGTKVEIK

Figura 35A

CAGGTGACGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTAT
 ACCATGTCTTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGCGCTTGAGTGGATGGGACCAATTAGTAGTCGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTG
 AAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACACGCAAGCAACTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
 GCGAGAGAAGCTATCTTTACTTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTCTTGGCGCGCGCGCTCCGGTGGTGGT
 GGTCTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTCCTGTCTGCACTCTGTAGGAGACAGATCACCATCATCTGCAAGCGGAGTCAGGACATTAAAT
 AACTATTTAAGCTGGTACCAGCAAGAACCTGGCCAGGCTCCCATCTATCTGTCGCAAAACAGATTGTTTCGATGGGTCCAGACAGAGGTTTC
 AGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAAATTAACAATAGATCTGAGGATCTGCATATTACTTCTGCTGAAATATGATCGGTTT
 CCGTACACGTTCCGGCCAAGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figura 35B

QVQLLESQGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYTIMSVVRQAPGQALEMMGTISSRGTYITYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYC
 CDR1 (VH) CDR2 (VH) CDR2 (VL)
 AREALFTYWGRTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINNLYLSWYQKPGQAPRLLIYRANRLFDGVPDRF
 CDR3 (VH) [(gly),ser], linker CDR1 (VL) CDR2 (VL)
 SSGSYGTDFTLTINNIESEDAAYYFQLKYDRFPYTFGQGTKVEIK
 CDR3 (VL)

Figura 36

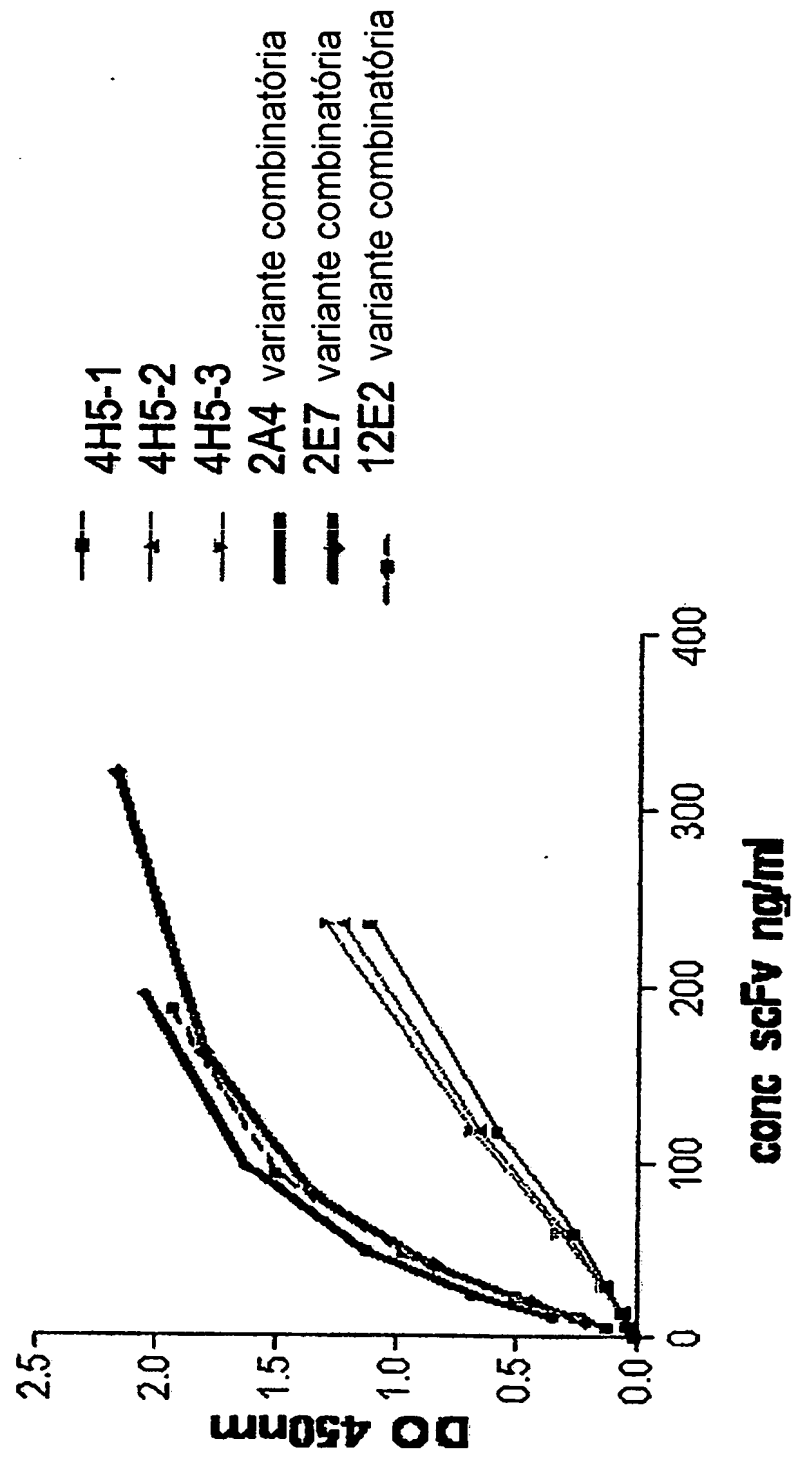


Figura 37

QVQLLES	GGGLVQ	PGGSLRL	SCAAS	GGFTFSS	SYTMS	WVRQA	PGQA	LEWMG	TIS	SGT	YY	2A4	scFv
QVQLLES	GGGLVQ	PGGSLRL	SCAAS	GGFTFSS	SYTMS	WVRQA	PGQA	LEWMG	TIS	SGT	YY	2E7	scFv
QVQLLES	GGGLVQ	PGGSLRL	SCAAS	GGFTFSS	SYTMS	WVRQA	PGQA	LEWMG	TIS	SGT	YY	12E2	scFv
QVQLLES	GGGLVQ	PGGSLRL	SCAAS	GGFTFSS	SYTMS	WVRQA	PGQA	LEWMG	TIS	SGT	YY	4H5	scFv

CDR2H															
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	2A4	scFv
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	2E7	scFv
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	12E2	scFv
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	4H5	scFv

CDR3H															
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	2A4	scFv
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	2E7	scFv
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	12E2	scFv
PDSV	KGRFTI	SRDN	AKNSLY	LQMN	SLRA	EDTAV	YYCAR	EA	IF	EW	GR	TLVT	VS	4H5	scFv

CDR1L																	
GGGG	SGGG	GGGS	DIQL	TQSP	SSL	SL	SA	SV	GD	RV	IT	CK	ASQ	DINN	Y	2A4	scFv
GGGG	SGGG	GGGS	DIQL	TQSP	SSL	SL	SA	SV	GD	RV	IT	CK	ASQ	DINN	Y	2E7	scFv
GGGG	SGGG	GGGS	DIQL	TQSP	SSL	SL	SA	SV	GD	RV	IT	CK	ASQ	DINN	Y	12E2	scFv
GGGG	SGGG	GGGS	DIQL	TQSP	SSL	SL	SA	SV	GD	RV	IT	CK	ASQ	DINN	Y	4H5	scFv

CDR2L																														
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	2A4	scFv
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	2E7	scFv
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	12E2	scFv
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	4H5	scFv

CDR3L																														
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	2A4	scFv
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	2E7	scFv
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	12E2	scFv
ANRL	LV	DG	VP	DR	FS	SG	SG	YG	TD	FT	LT	INN	IE	SE	DA	AA	YY	FC	LK	YN	V	FP	YT	FG	QG	TK	VE	IK	4H5	scFv

Caixa cinza indica diferenças entre aminoácidos. CDRs estão sublinhados.
O linker está circunscrito.

Figura 38

L1	5'-CCAGTGTAGGTTGTGCTAATACTTTGGCTGGC-3'	CDR1L P7 Ser (parental)
L2	5'-CCAGTGTAGGTTGTGDAATACTTTGGCTGGC-3'	CDR1L P7 His, Tyr, Asn
L3	5'-GGGACCCAGAGATGDACTGGAAGVCATACCTTGATCAGGAGC-3'	CDR2L P2 Ala, Gly, Val P5 Tyr, Ser, Phe
L4	5'-GGGACCCAGAGATGDACTGGAAGSTATACCTTGATCAGGAGC-3'	CDR2L P2 Thr, Ser P5 Tyr, Ser, Phe
L5	5'-GAGCGGCCAGCTGTGGMCTGTGACAGTAATAIG-3'	CDR3L P3 Ala, Ser
H6	5'-GCCTGTCGACCCCACTTCATGGAGTAATCGGWAAAGGTGAATCCAG-3'	CDRIH P5 Ser, Thr P10 Asn, Lys
H7	5'-GCCTGTCGACCCCACTTCATGGAGTAATCGGWAAAGGTGAATCCAG-3'	CDRIH P5 Ser, Thr P10 Ser, Thr
H8	5'-GCCTGTCGACCCCACTTCATGGAGTAATCGTCAAAGGTGAATCCAG-3'	CDRIH P5 Asp, P10 Asn, Lys
H9	5'-GCCTGTCGACCCCACTTCATGGAGTAATCGTCAAAGGTGAATCCAG-3'	CDRIH P5 Asp P10 Ser, Thr
H10	5'-GATGCACTGTACTCTGTGTGTAGKCAATTAGCTTTGTTTCTAATAAATC-3'	CDR2H P8 Asp, Ala
H11	5'-GATGCACTGTACTCTGTGTGTAGGAATTAGCTTTGTTTCTAATAAATC-3'	CDR2H P8 Ser
H12	5'-GTTTCCTTGGCCCCAGGAGTCCATAGCATGATRCCTAGGGTATCTC-3'	CDR3H P4 Tyr, His P9 Ser
H13	5'-GTTTCCTTGGCCCCACAGGTCCATAGCATGATRCCTAGGGTATCTC-3'	CDR3H P4 Tyr, His P9 Leu

Figura 39

Sequências alinhadas de cadeias pesadas variáveis de anti-EphA2 mAb humano		
EV K L V E S G G G L V Q P G G S L S C A A S G F T F T D Y S M N W V R Q P P G K A L E W L G F I R N K A N D Y T T	CDR1H	B 233 VH murino
EV Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A S G F T V S D Y S M N W V R Q A P G K G L E W I G F I R N K A N D Y T T		2G6 VH humanizado
EV Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A S G F T V S D Y S M N W V R Q A P G K G L E W I G F I R N K A N D Y T T	CDR2H	3F2 VH afinidade otimizada
EY S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y L Q M N A L R A E D S A T Y Y C V R Y P R Y H A M D S W G Q G T S V T V S S	CDR3H	B 233 VH murino
EY S A S V K G R F T I S R D D S K N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T T Y P R Y H A M D S W G Q G T M V T V S S		2G6 VH humanizado
EY S A S V K G R F T I S R D D S K N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T T Y P R Y H A M D S W G Q G T M V T V S S		3F2 VH afinidade otimizada
Sequências alinhadas de cadeias leves variáveis de anti-EphA2 mAb humano		
D I V L T Q S P A T L S V T P G D S V N L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q K S H E S P R L L I K Y V F Q S I S	CDR1L	B 233 VL murino
A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N N L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Y V F Q S I S		2G6 VL humanizado
A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N N L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Y V F Q S I S	CDR2L	3F2 VL afinidade otimizada
G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N S V E T E D F G M Y F C Q Q S N S W P L T F C A G T K L E L K	CDR3L	B 233 VL murino
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S N S W P L T F G G G T K L E I K		2G6 VL humanizado
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S N S W P L T F G G G T K L E I K		3F2 VL afinidade otimizada

Regiões CDR estão sublinhadas. Diferenças entre aminoácidos nas regiões CDR estão sombreadas.

Figura 40

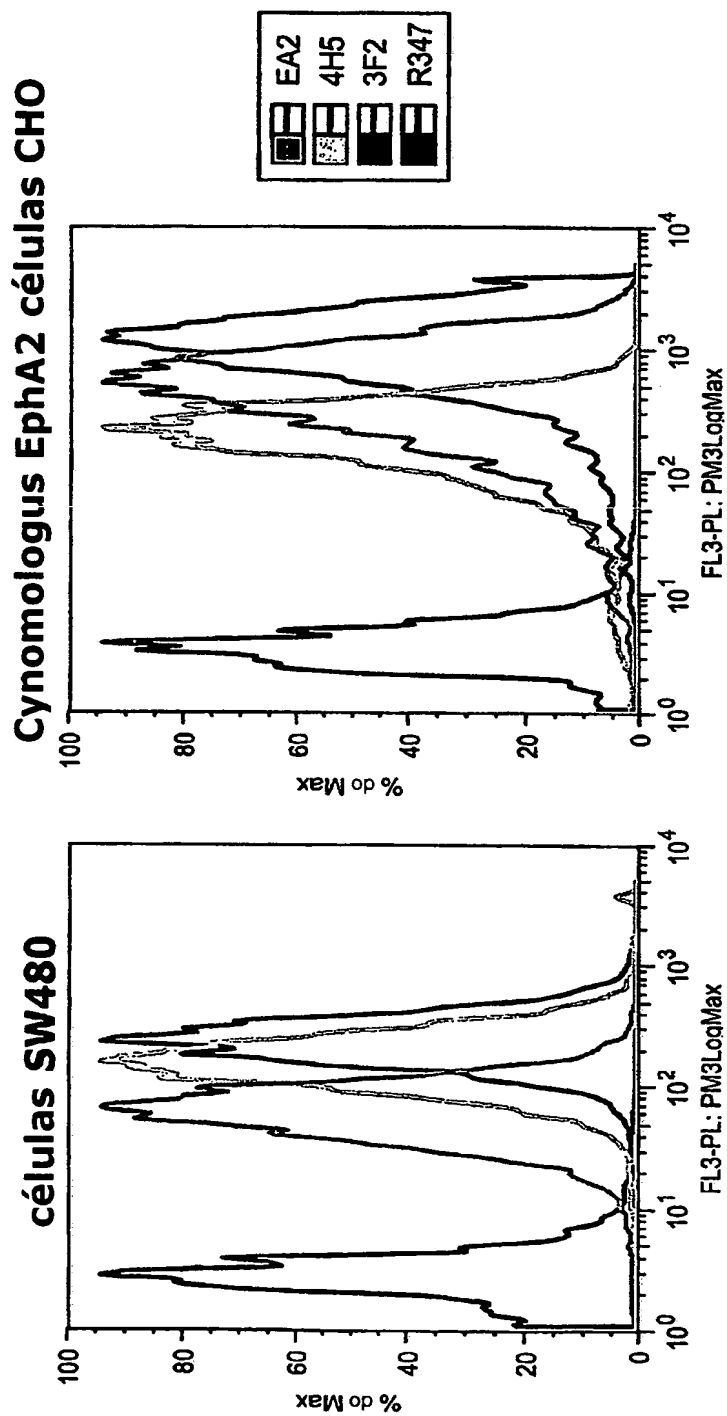


Figura 41

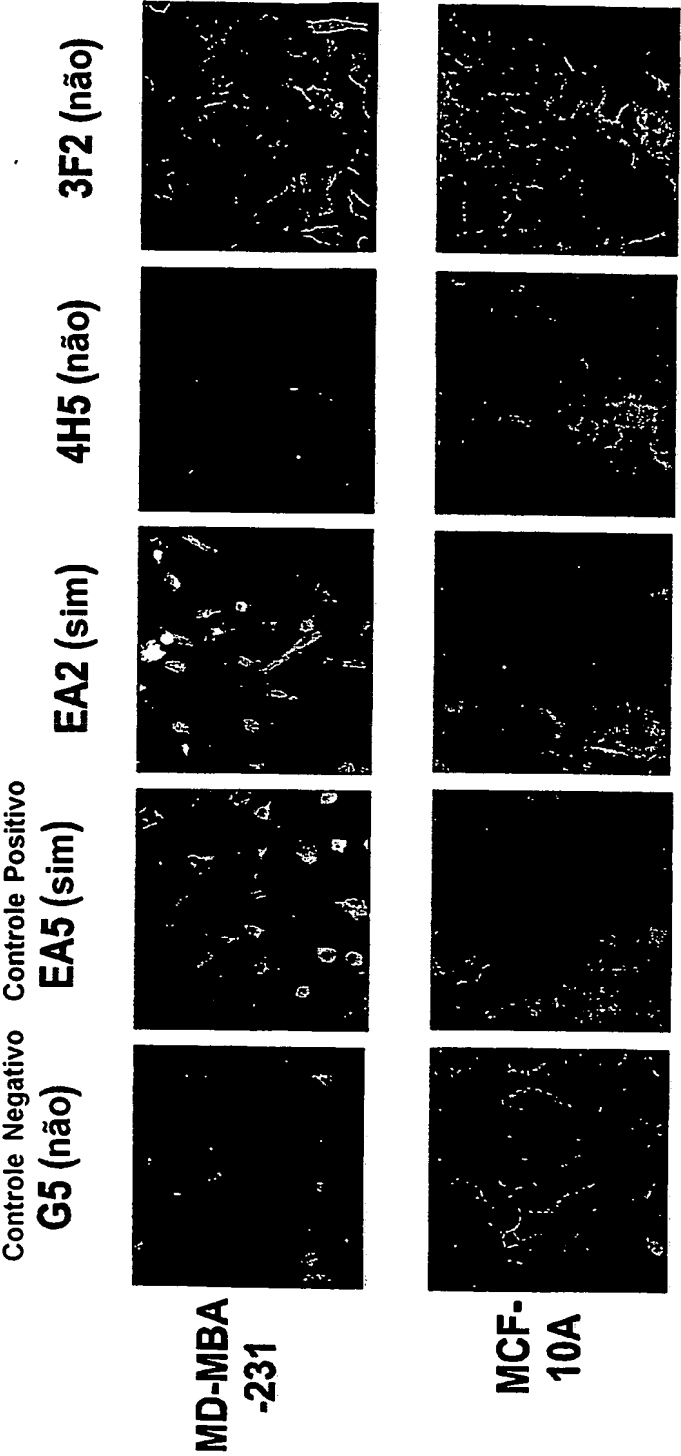


Figura 42A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC **CDR1** RASQSISNNLH **CDR2** YVFQSISGV
PSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYC **CDR3** QQSNSWPLTFGGGTKVEIK

Figura 42B

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFTFT **CDR1** DYSMNWVRQARGQRLEWIG **CDR2** FIRNKA
NDYTTEYSASVKGRVITITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR **CDR3** YPRYHAMDSW
GQGTSVTVSS

Figura 43

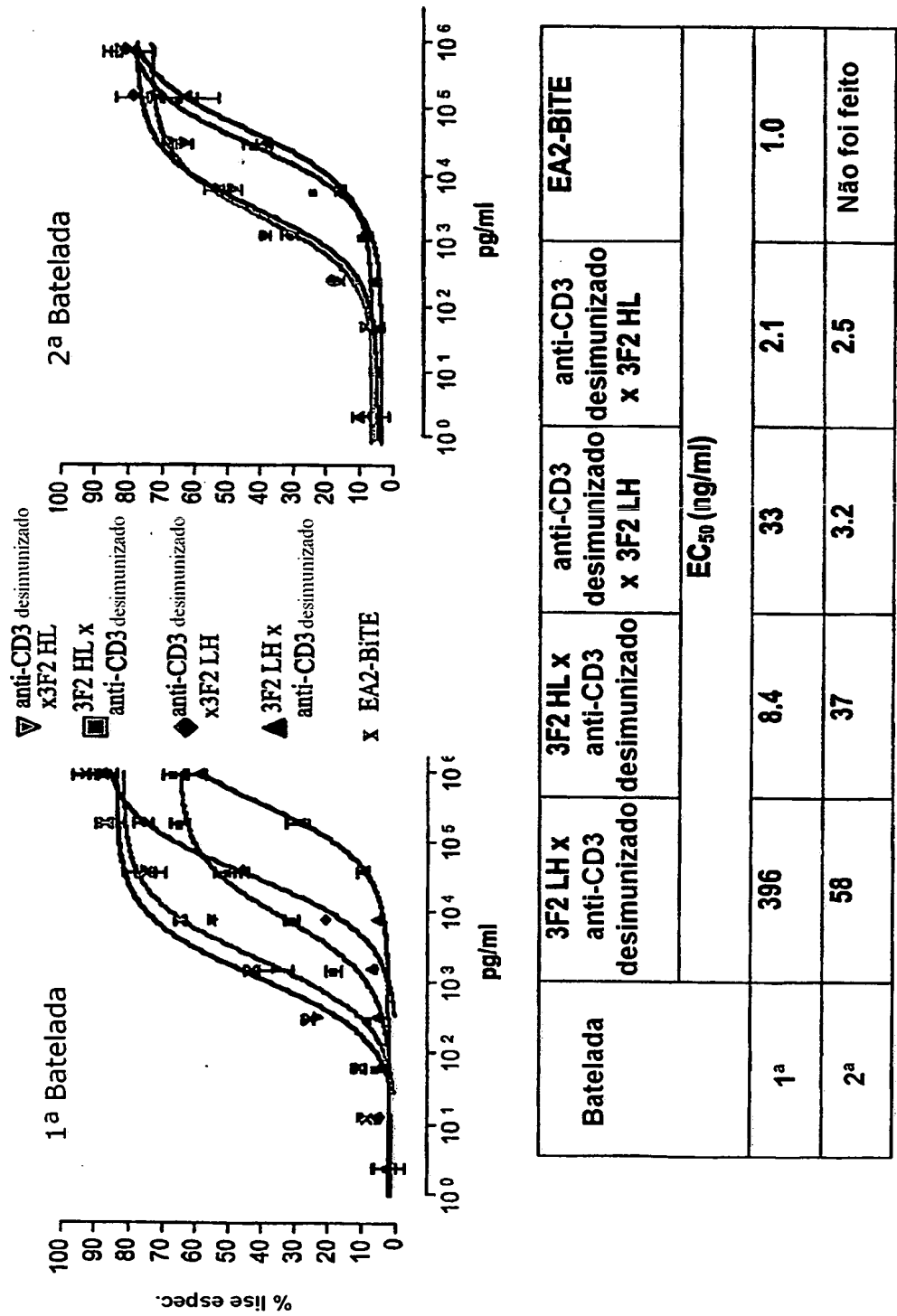


Figura 44

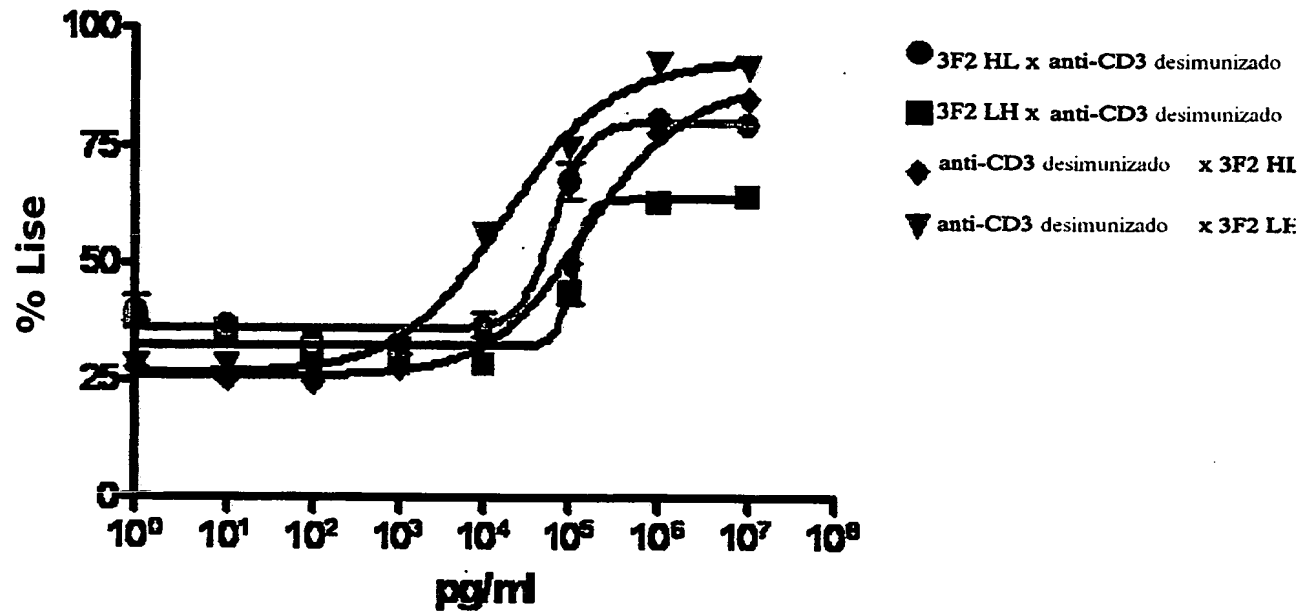


Figura 45

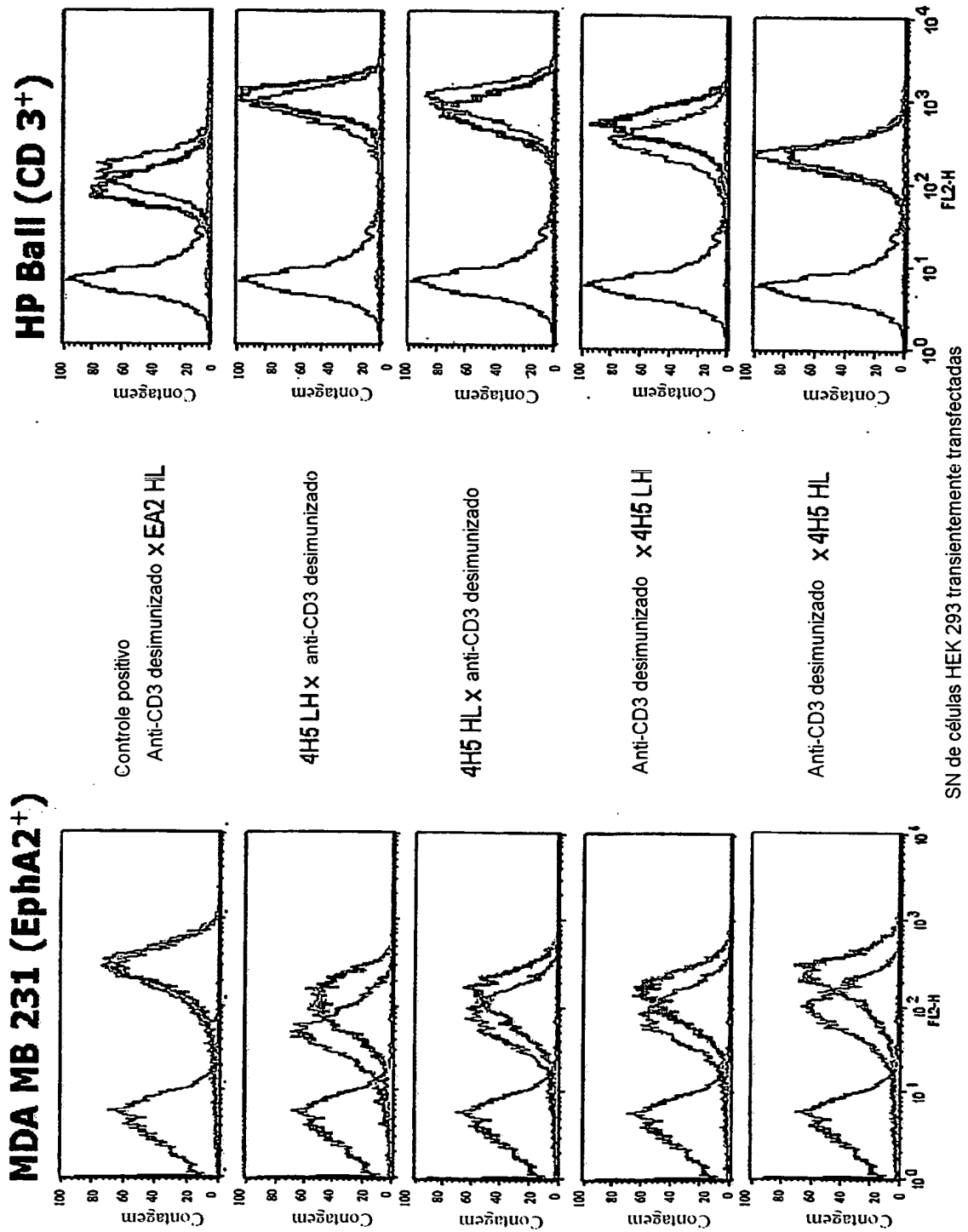


Figura 46

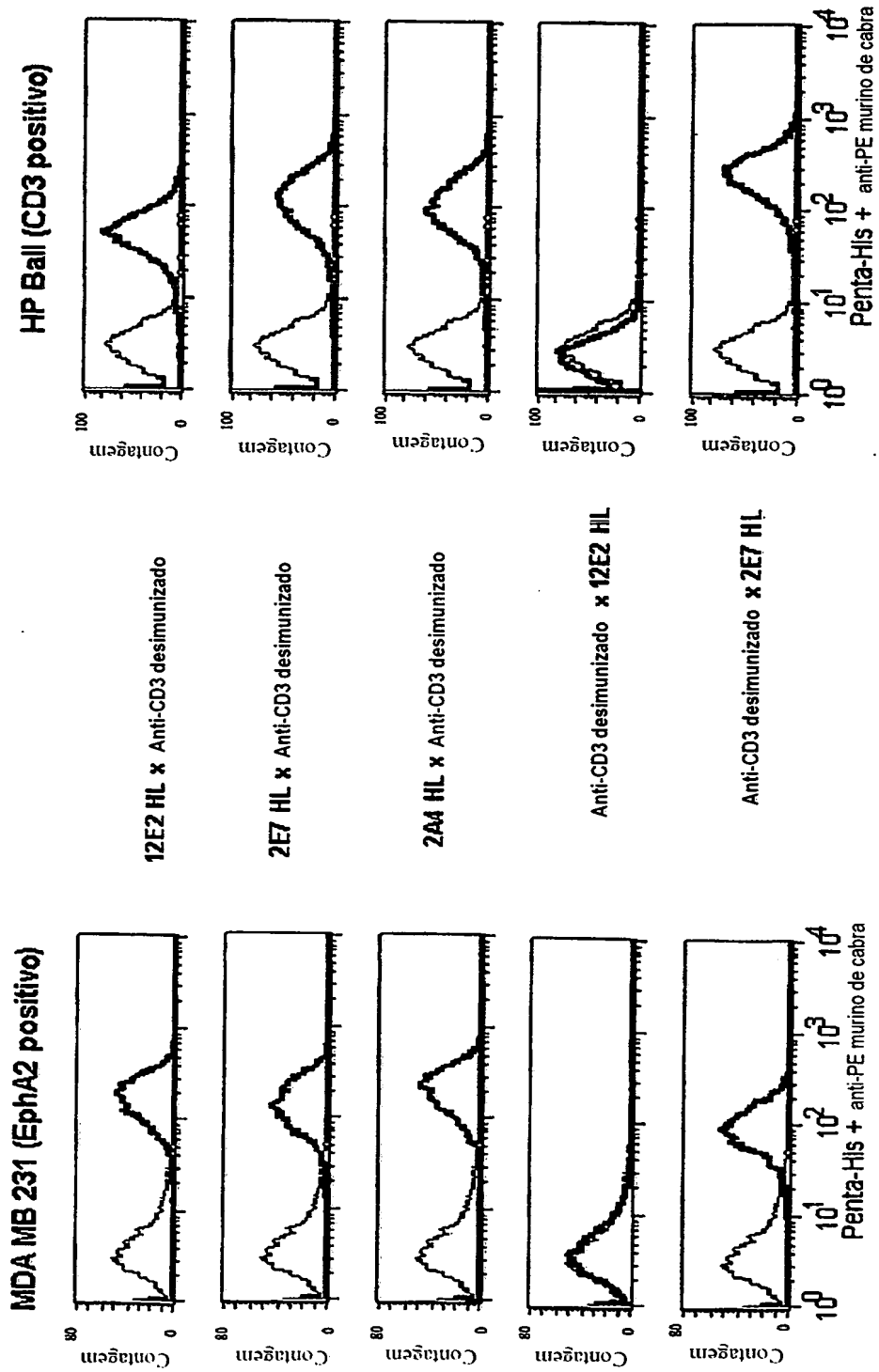


Figura 47

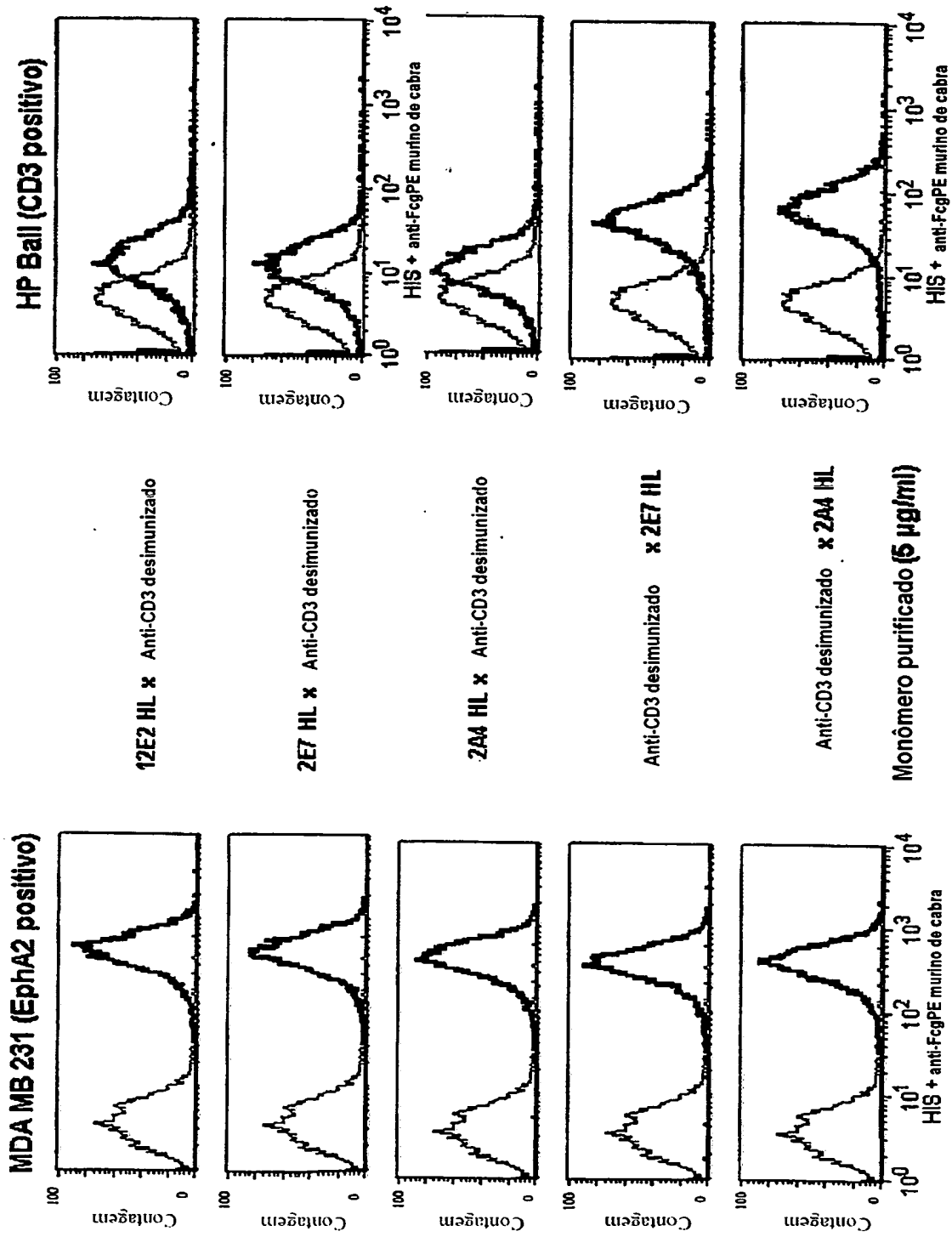


Figura 48

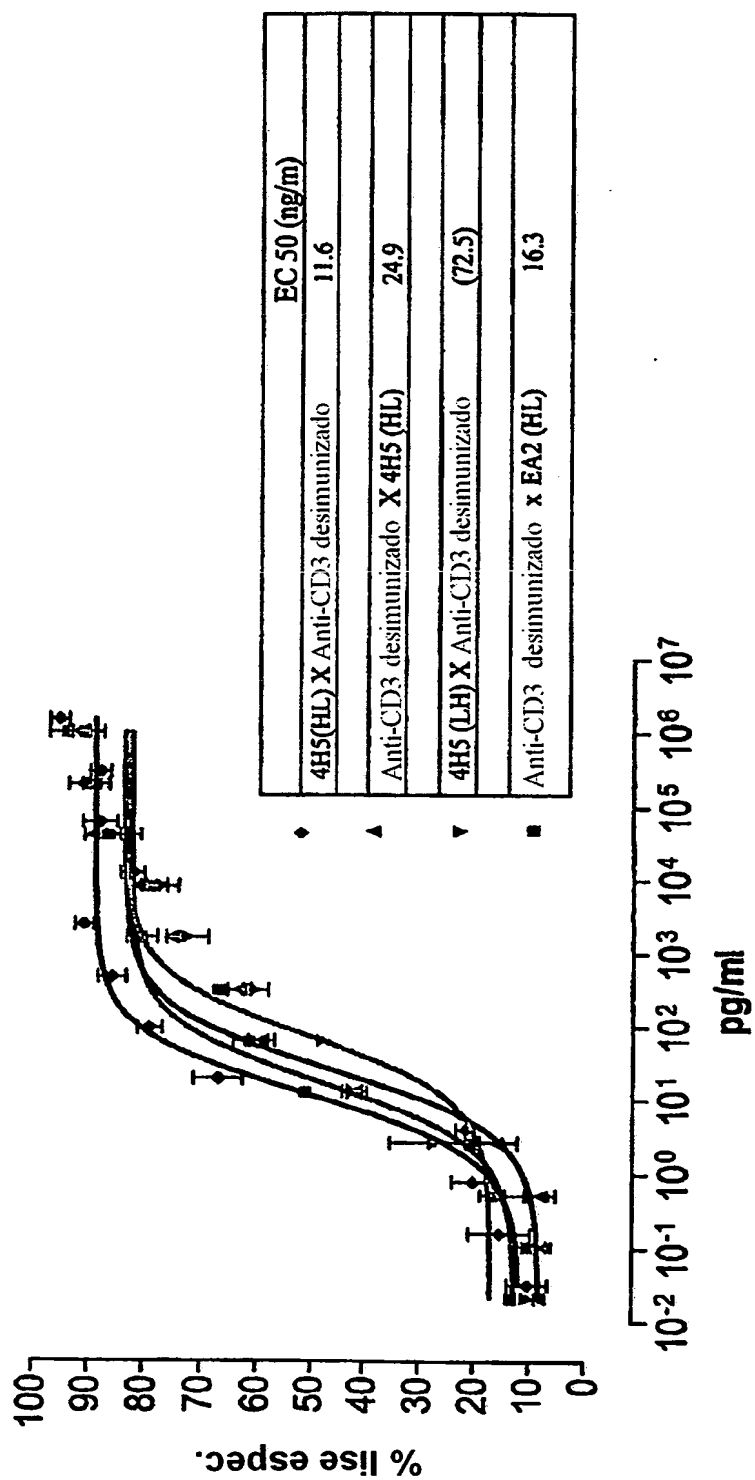


Figura 49

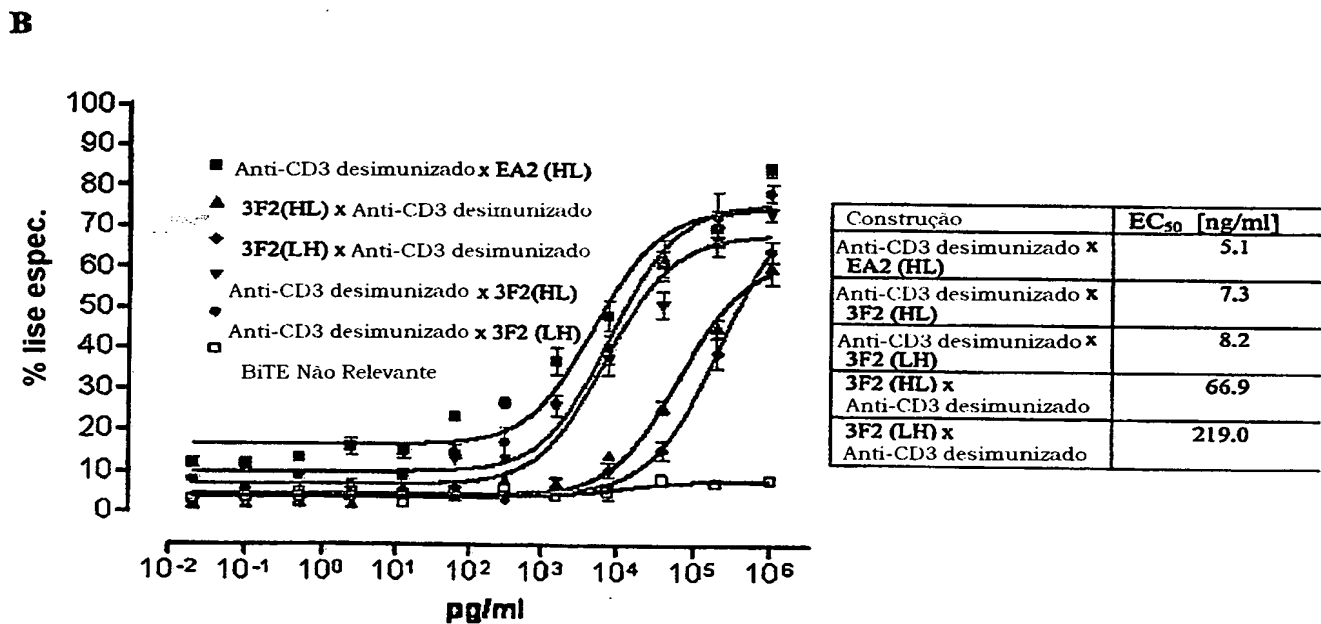
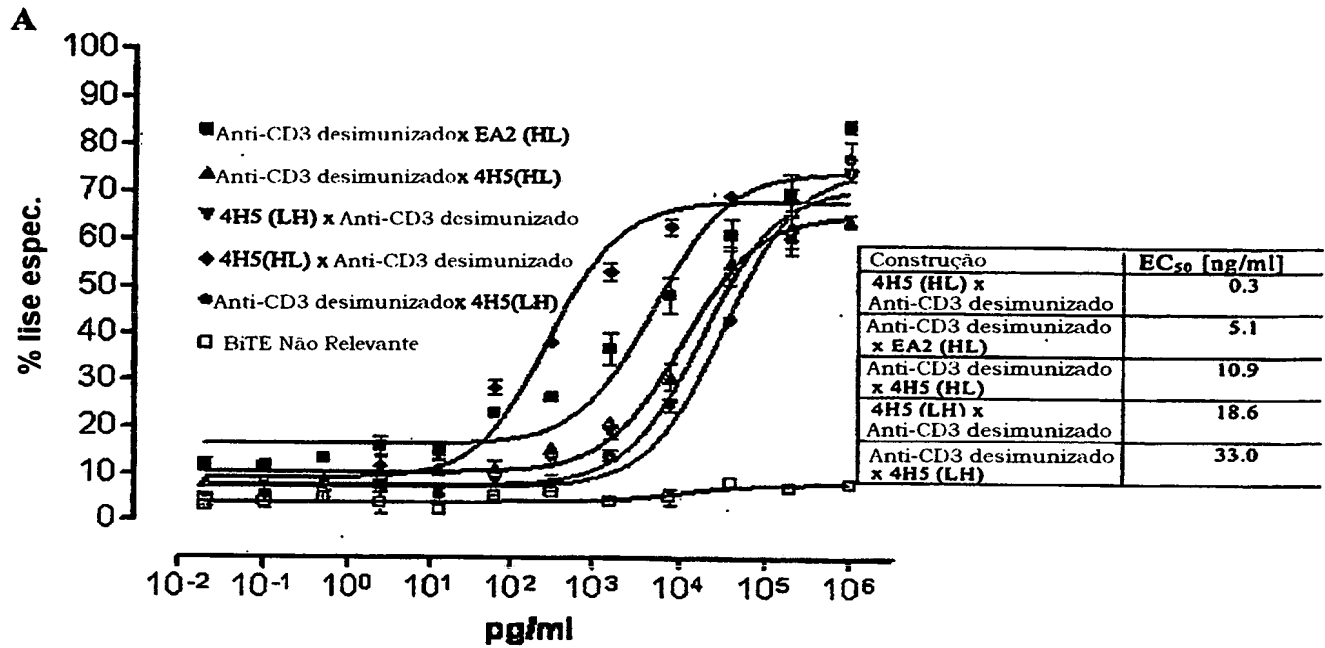
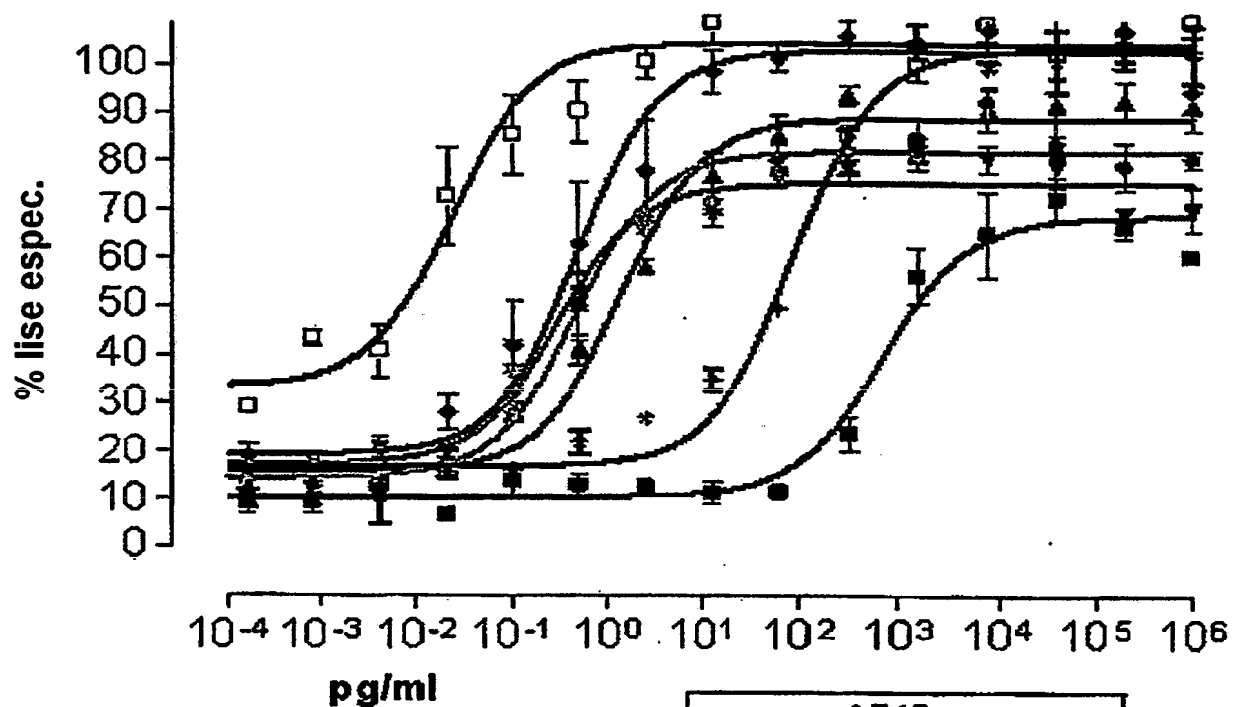


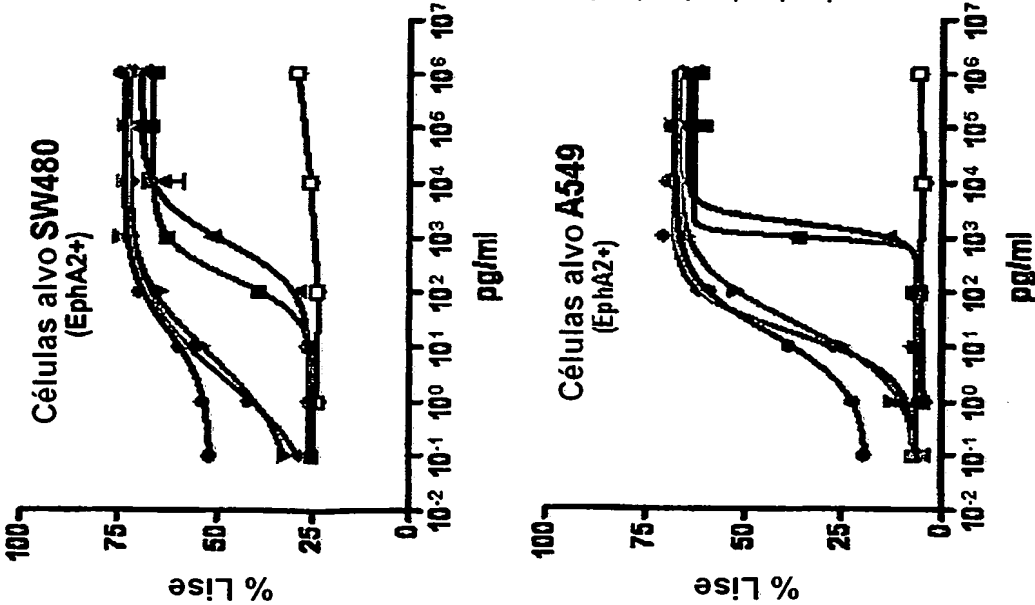
Figura 50

A549



EC 50 [pg/ml]	
A549	
1ª Batelada March JPT	
□ 2A4 HL x anti-CD3 desimmunizado	5.8
◆ 12E2 HL x anti-CD3 desimmunizado	5.5
▼ anti-CD3 desimmunizado x 2A4 HL	4.1
● 2E7 HL x anti-CD3 desimmunizado	33.7
▲ anti-CD3 desimmunizado x 2E7 HL	5.8
* 4H5 HL x anti-CD3 desimmunizado	308.0
■ anti-CD3 desimmunizado x EA2 HL	836.0

Figura 51



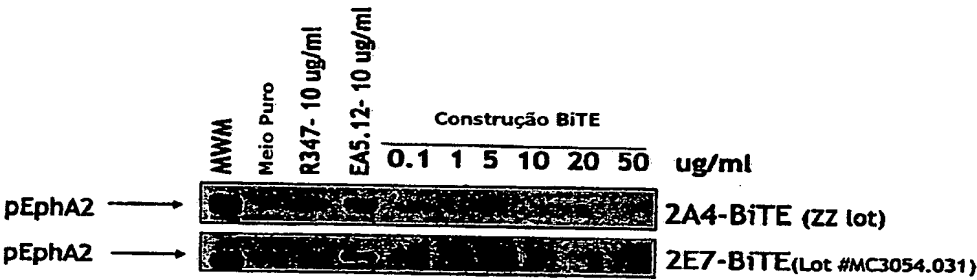
□	MED1 - 538	N/A
▲	Anti-CD3 desimmunizado x EA2 HL	790
▼	2E7 HL x Anti-CD3 desimmunizado	6.7
◆	2A4 HL x Anti-CD3 desimmunizado	2.3
●	12E2 HL x Anti-CD3 desimmunizado	20
■	4H5 HL x Anti-CD3 desimmunizado	170

□	MED1 - 538	N/A
▲	Anti-CD3 desimmunizado x EA2 HL	1800
▼	2E7 HL x Anti-CD3 desimmunizado	25
◆	2A4 HL x Anti-CD3 desimmunizado	17
●	12E2 HL x Anti-CD3 desimmunizado	16
■	4H5 HL x Anti-CD3 desimmunizado	990

40 a 340 vezes de aumento em potência quando comparado com Anti-CD3 desimmunizado x EA2 HL

Figura 52

SW480



A549

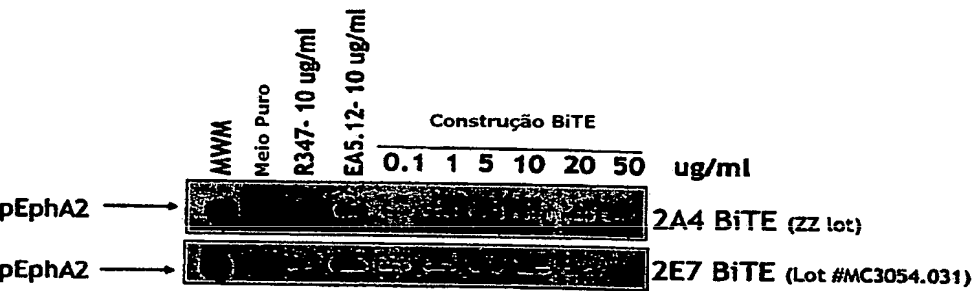
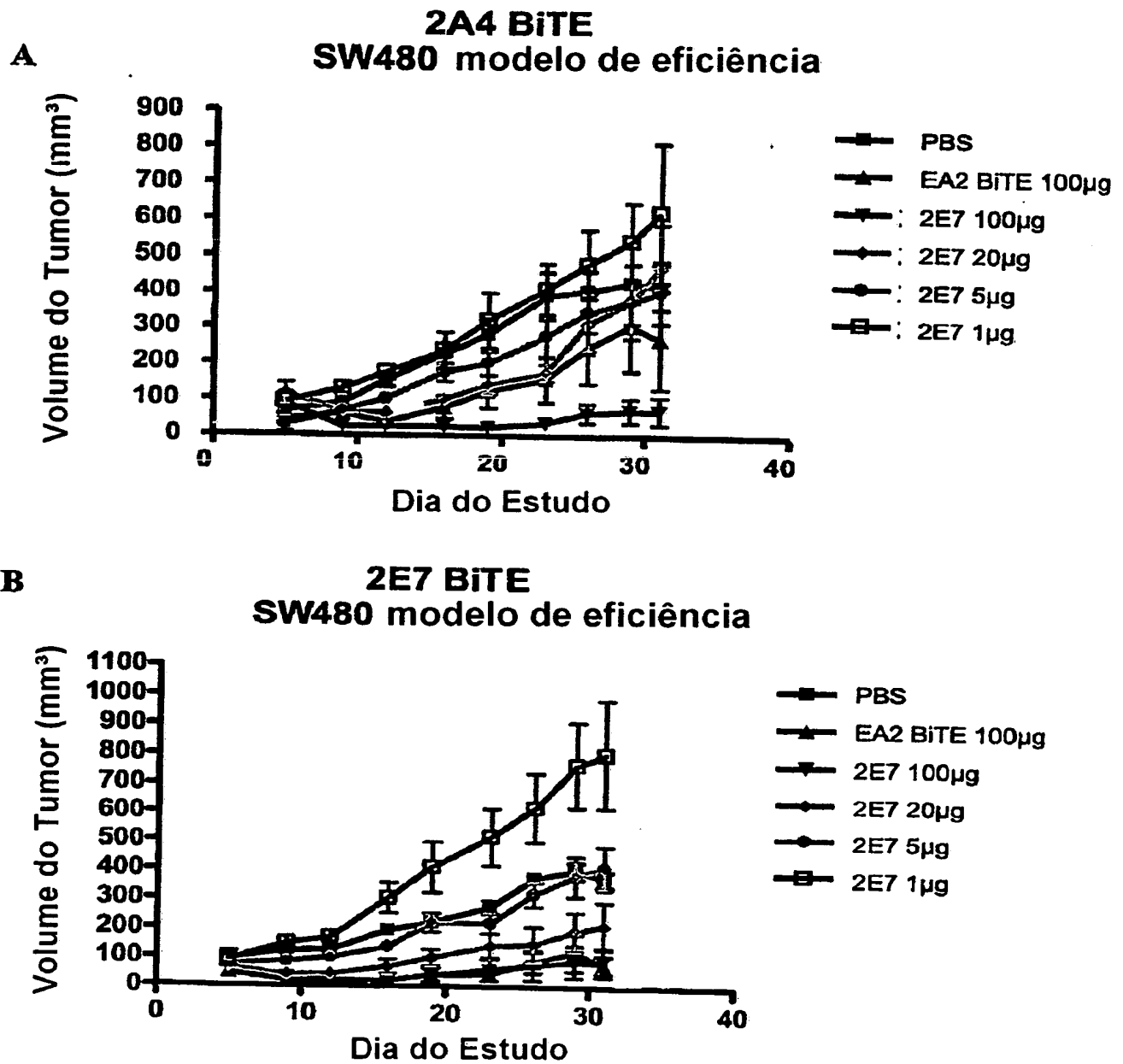


Figura 53



RESUMO**ANTICORPOS DE CADEIA SIMPLES BIESPECÍFICOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS**

5 A presente invenção refere-se a anticorpos de cadeia simples biespecíficos compreendendo um primeiro domínio de ligação que liga-se imuno especificamente com o CD3 de antígeno de células T e um segundo domínio de ligação que
10 liga-se imuno especificamente com o receptor de EphA2. Tais anticorpos de cadeia simples biespecíficos são abrangidos pelo termo "EphA2-BiTEs". A presente invenção refere-se ainda a métodos e composições destinados ao tratamento, à prevenção e/ou ao gerenciamento de desordens associadas com a expressão e/ou a atividade anormal de EphA2. Tais
15 desordens incluem, sem limitação, câncer, desordens de células hiperproliferativas não-cancerígenas e infecções. A invenção revela vetores que compreendem polinucleotídeos codificando os EphA2-BiTEs da invenção, células de hospedeiros transformadas pelos mesmos e seus usos na
20 produção dos referidos EphA2-BiTEs. A presente invenção também fornece composições, incluindo composições farmacêuticas, compreendendo qualquer um dos referidos EphA2-BiTEs, polinucleotídeos ou vetores, sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos ou
25 profiláticos. São ainda descritos métodos de varredura dos referidos EphA2-BiTEs e kits compreendendo qualquer uma das referidas composições e reagentes de diagnóstico.