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

(11) BR 112012026766-3 B1

(22) Data do Depósito: 20/04/2011

(45) Data de Concessão: 03/11/2021

(54) Título: MÉTODOS IN VITRO PARA GERAR UM ANTICORPO IGG HETERODIMÉRICO, PARA A SELEÇÃO DE UM ANTICORPO BIESPECÍFICO, VETOR DE EXPRESSÃO, ANTICORPO IGG HETERODIMÉRICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM ANTICORPO IGG HETERODIMÉRICO

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; C07K 16/46; C07K 16/10; C07K 16/32.

(30) Prioridade Unionista: 20/04/2010 DK PA201000330; 24/04/2010 US 61/326082; 24/11/2010 DK PA201001066.

(73) Titular(es): GENMAB A/S.

(72) Inventor(es): JOYCE MEESTERS; EWALD VAN DEN BREMER; JOOST J. NEIJSSEN; PATRICK VAN BERKEL; TOM VINK; JANINE SCHUURMAN; ARAN FRANK LABRIJN; BART DE GOEIJ; JAN VAN DE WINKEL; PAUL PARREN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2011056388 de 20/04/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/131746 de 27/10/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/10/2012

(57) Resumo: MÉTODOS IN VITRO PARA GERAR UMA PROTEÍNA HETERODIMÉRICA, PARA A SELEÇÃO DE UM ANTICORPO BIESPECÍFICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROTEÍNA HETERODIMÉRICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA PROTEÍNA HETERODIMÉRICA. Novas proteínas que contém anticorpo heterodimérico Fc, tais como anticorpos biespecíficos e novos métodos para produzir tais proteínas.

“MÉTODOS *IN VITRO* PARA GERAR UM ANTICORPO IgG HETERODIMÉRICO, PARA A SELEÇÃO DE UM ANTICORPO BIESPECÍFICO, VETOR DE EXPRESSÃO, ANTICORPO IgG HETERODIMÉRICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM ANTICORPO IgG HETERODIMÉRICO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção diz respeito a novas proteínas que contém anticorpo heterodimérico Fc, tais como anticorpos biespecíficos, e novos métodos para produzir tais proteínas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Os anticorpos monoclonais têm nos anos recentes se tornado moléculas terapêuticas bem sucedidas, em particular para o tratamento de câncer. Infelizmente, entretanto, os anticorpos monoclonais são frequentemente incapazes de curar doenças quando usados como monoterapia. Anticorpos biespecíficos podem potencialmente superar algumas das limitações da terapia de anticorpo monoclonal, por exemplo, eles podem ser usados como mediadores para direcionar um medicamento ou composto tóxico para alvejar células, como mediadores para redirecionar mecanismos efetores para os locais associados com doença ou como mediadores para aumentar a especificidade para células de tumor, por exemplo, pela ligação a uma combinação de moléculas alvo que é exclusivamente encontrada nas células de tumor.

[003] Formatos e usos diferentes de anticorpos biespecíficos foram recentemente revisados por Chames e Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276. Um dos maiores obstáculos no desenvolvimento de anticorpos biespecíficos tem sido a dificuldade de produzir o material em qualidade e quantidade suficientes pelas tecnologias tradicionais, tais como os métodos de hibridoma híbrido e conjugação química (Marvin e Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26: 649). A coexpressão em uma célula hospedeira de dois

anticorpos, que consiste de cadeias pesadas e leves diferentes, leva a uma mistura de produtos de anticorpo possíveis além do anticorpo biespecífico desejado.

[004] Várias estratégias têm sido descritas para favorecer a formação de um produto heterodimérico, isto é biespecífico, na coexpressão de construções de anticorpo diferentes.

[005] Lindhofer *et al*. (1995 J Immunol 155: 219) descreveram que a fusão de hidridomas de rato e camundongo para produzir anticorpos diferentes leva ao enriquecimento de anticorpos biespecíficos funcionais, por causa do emparelhamento da cadeia pesada/leve restrito das espécies preferenciais. Uma outra estratégia para promover a formação de heterodímeros em homodímeros é uma estratégia "knob-into-hole" em que uma protuberância é introduzida na interface de um primeiro polipeptídeo de cadeia pesada e uma cavidade correspondente na interface de um segundo polipeptídeo de cadeia pesada, tal que a protuberância possa ser posicionada na cavidade de modo a promover a formação de heterodímero e impedir a formação de homodímero. "Protuberâncias" são construídas pela substituição de cadeias laterais de aminoácido pequenas da interface do primeiro polipeptídeo com cadeias laterais maiores. As "cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar às protuberâncias são criadas na interface do segundo polipeptídeo pela substituição de cadeias laterais de aminoácido grandes com os menores (Patentes US 5.731.168). EP1870459 (Chugai) e WO 2009089004 (Amgen) descrevem outras estratégias para favorecer a formação de heterodímero na coexpressão de domínios de anticorpo diferentes em uma célula hospedeira. Nestes métodos, um ou mais resíduos que compõem a interface CH3-CH3 em ambos os domínios CH3 são substituídos com um aminoácido carregado tal que a formação de homodímero seja eletrostaticamente desfavorável e a heterodimerização seja eletrostaticamente favorável. A WO2007110205 (Merck) descreve ainda uma

outra estratégia, em que as diferenças entre os domínios CH3 de IgA e IgG são explorados para promover a heterodimerização.

[006] Dall'acqua *et al*. (1998 Biochemistry 37: 9266) identificaram cinco resíduos de aminoácido energeticamente chaves (366, 368, 405, 407 e 409) que estão envolvidos no contato CH3-CH3 na interface de um homodímero CH3.

[007] A WO 2008119353 (Genmab) descreve um método *in vitro* para produzir anticorpos biespecíficos em que um anticorpo biespecífico é formado pela troca do "ramo Fab" ou "meia-molécula" (trocando de uma cadeia pesada e cadeia leve ligada) entre dois anticorpos equivalentes a IgG4 monoespecífico ou IgG4 na incubação sob condições redutoras. Esta reação de troca do ramo Fab é o resultado de uma reação de isomerização de ligação de dissulfeto e dissociação-associação de domínios CH3 em que as ligações de dissulfeto de cadeia pesada nas regiões de articulação dos anticorpos precursores (originalmente monoespecíficos) são reduzidas e as cisteínas livres resultantes formam uma ligação de dissulfeto de cadeia pesada interna com resíduos de cisteína de uma outra molécula de anticorpo precursora (originalmente com uma especificidade diferente), e simultaneamente domínios CH3 dos anticorpos precursores liberam e reformam pela dissociação-associação. O produto resultante é um anticorpo biespecífico tendo dois ramos Fab que potencialmente são sequências diferentes *compased*. Deve ser mencionado que o processo é aleatório, entretanto e a troca do ramo Fab também pode ocorrer entre duas moléculas com sequência idêntica ou duas moléculas biespecíficas podem engrenar na troca do ramo Fab para regenerar anticorpos que compreendem a especificidade de anticorpo precursor monoespecífico original.

[008] Foi agora surpreendentemente descoberto que pela introdução de mutações assimétricas nas regiões CH3 das duas proteínas de partida monoespecíficas, a reação de troca de ramo Fab pode ser forçada a tornar-se

direcional e deste modo produzir proteínas heterodiméricas altamente estáveis.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] Consequentemente, em um aspecto, a presente invenção fornece um método eficiente *in vitro* para a produção de proteínas Fc heterodiméricas altamente estáveis que contém com base nos materiais de partida que contém Fc homodimérico estável. Por exemplo, um anticorpo biespecífico altamente estável pode ser formado com alto rendimento e pureza com base em dois anticorpos monoespecíficos estáveis como material de partida.

[0010] Assim, em um aspecto, a invenção diz respeito a um método *in vitro* para gerar uma proteína heterodimérica, o dito método compreendendo as seguintes etapas:

a) fornecer uma primeira proteína homodimérica que compreende uma região Fc de uma imunoglobulina, a dita região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

b) fornecer uma segunda proteína homodimérica que compreende uma região Fc de uma imunoglobulina, a dita região Fc compreendendo uma segunda região CH3,

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubar a dita primeira proteína junto com a dita segunda proteína sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, e

d) obter a dita proteína heterodimérica.

[0011] O método, por exemplo, pode ser usado para a produção *in vitro* de proteínas heterodiméricas, tais como anticorpos biespecíficos, para vários usos, tais como usos terapêuticos ou de diagnóstico. Uma vantagem deste método *in vitro* é que o emparelhamento de cadeia pesada/cadeia leve permanece intacto durante a reação, assim nenhuma combinação indesejada de cadeia pesada e cadeias leves é obtida no produto. Isto ao contrário de alguns dos métodos de coexpressão descritos na técnica anterior (ver acima) onde uma cadeia leve comum que pode formar um anticorpo funcional com ambas as cadeias pesadas necessita ser descoberto de modo a evitar a formação de produtos de cadeia pesada/cadeia leve não funcionais, por causa do emparelhamento aleatório de cadeia pesada/cadeia leve na célula. Além disso, o processo *in vitro* pode ser realizado no laboratório que permite controle, flexibilidade e rendimento maiores da proteína heterodimérica do que é permitido pela coexpressão.

[0012] O método *in vitro* da invenção também pode ser usado para criar bibliotecas de composto de tamanho maior, por exemplo, em um método de triagem para identificar combinações vantajosas de especificidades. Por exemplo, para algumas combinações de alvos de anticorpo, nenhum anticorpo biespecífico será funcional, isto é ser capaz de ligar a ambos alvos ao mesmo tempo e mediar os efeitos funcionais desejados. Em tais casos, um anticorpo biespecífico tendo uma propriedade desejada, por exemplo, ligação de alvo ideal ou morte de célula, pode ser identificado:

a) fornecendo-se um primeiro conjunto de anticorpos homodiméricos tendo regiões variáveis diferentes, em que os ditos anticorpos do dito primeiro conjunto compreendem uma primeira região CH3,

b) fornecendo-se um segundo conjunto de anticorpos homodiméricos tendo regiões variáveis diferentes, em que os ditos anticorpos do dito segundo conjunto compreendem uma segunda

região CH3,

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubando-se combinações de anticorpos do dito primeiro conjunto e do dito segundo conjunto sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, gerando assim um conjunto de anticorpos biespecíficos,

d) opcionalmente restaurando-se as condições para não redutoras,

e) ensaiando-se o conjunto de anticorpos biespecíficos resultantes quanto a uma dada propriedade desejada, e

f) selecionando-se um anticorpo biespecífico tendo a propriedade desejada.

[0013] Em outros aspectos, a presente invenção diz respeito a proteínas heterodiméricas obtidas ou obteníveis pelo método da invenção e aos métodos para produzir proteínas heterodiméricas da invenção pela coexpressão em uma célula hospedeira adequada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014] FIGURA 1: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca de ramo Fab interespécies. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por GSH entre os anticorpos IgG4 indicados EGFR (2F8) e CD20 (7D8) foi determinada por um ELISA. Uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 1 μg/ml foi analisado no ELISA. A ligação biespecífica foi mais alta depois da troca do ramo Fab entre os anticorpos IgG4 de rhesus (Rh) e ser humano (Hu) do que entre dois anticorpos da mesma espécie.

[0015] FIGURA 2: Alinhamento das sequências de aminoácido da fechadura do núcleo (isto é a sequência CPPC na IgG1 humana que inclui os dois resíduos de cisteína que potencialmente formam as interligações de dissulfeto da cadeia pesada e resíduos correspondentes em outros isótipos humanos ou outras espécies) e interface CH3-CH3 dos isótipos de anticorpo se ser humano e rhesus.

[0016] FIGURA 3: A geração de anticorpos biespecíficos usando IgG1 humana mutante exigidos para a troca do ramo Fab. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por GSH entre anticorpo IgG4 CD20 (7D8) humano e os anticorpos IgG1 humanos EGFR (2F8) indicados foi determinada por um ELISA. o gráfico apresentado mostra números médios de três experimentos de troca do ramo Fab independentes, em que uma concentração de anticorpo total de 1 µg/ml foi usada para o ELISA. A ligação biespecífica foi mais alta depois da troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-CPSC-ITL e IgG4-7D8 do que entre dois anticorpos IgG4. A combinação de IgG4-7D8 com IgG1-2F8-CPSC ou IgG1-2F8-ITL não resultou em anticorpos biespecíficos sob as condições usadas.

[0017] FIGURA 4: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab *in vivo* de anticorpos IgG4 humano e IgG1 mutante. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vivo* em camundongos imunodeficientes entre os anticorpos IgG4 CD20 (7D8) humano e os IgG1 e IgG4 EGFR (2F8) humanos indicados mutantes foi determinada por um ELISA. O gráfico apresentado mostra números médios (n = 4). A reatividade biespecífica é apresentada como a concentração de anticorpos biespecíficos em relação à concentração de IgG total (porcentagem). A IgG4 humana com uma articulação (CPPC) ou mutação R409K estabilizadas no domínio CH3 não é capaz de participar na troca do ramo Fab. A IgG1 tanto com uma sequência CPSC na articulação quanto uma mutação K409R no domínio CH3 é exigida para a troca do ramo Fab. (*) A

ligação biespecífica para as misturas que contém IgG1-2F8, IgG4-2F8-CPPC ou IgG4-2F8-R409K foi abaixo do limite de detecção e, portanto arbitrariamente ajustada a zero.

[0018] FIGURA 5: Geração de anticorpos biespecíficos usando a troca do ramo Fab induzida por 2-mercapto-etilamina•HCl (2-MEA) entre anticorpos IgG1 e IgG4 humanos. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os anticorpos EGFR (2F8) e CD20 (7D8) humanos indicados foi determinada por um ELISA. Uma série de concentração de 0 a 40 mM de 2-MEA foi testada. o gráfico apresentado mostra o resultado do ELISA em que uma concentração de anticorpo total de 20 µg/ml foi usada. A troca do ramo Fab eficientemente induzida por 2-MEA, também entre anticorpos que contém uma articulação estabilizada (CPPC). No que diz respeito aos domínios CH3, uma combinação de IgG4 humano x IgG1 humano com a tripla mutação T350I-K370T-F405L, resultou em níveis mais altos de reatividade biespecífica comparada com dois anticorpos IgG4 do tipo selvagem.

[0019] FIGURA 6: Geração de anticorpos biespecíficos usando troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre os anticorpos IgG1 e IgG4 humanos.

[0020] A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os anticorpos EGFR (2F8) e CD20 (7D8) humanos indicados foi determinada pela espectrometria de massa para todas as amostras da série de concentração de 0 a 40 mM de 2-MEA. (A) Os exemplos representativos dos perfis de espectrometria de massa para as amostras das reações troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC com 0 mM, 7 mM e 40 mM de 2-MEA são mostrados. (B) Depois da quantificação dos dados da espectrometria de massa, a porcentagem de anticorpo biespecífico foi calculada e plotada contra a concentração de 2-MEA na reação de troca do ramo Fab. IgG4-2F8 x IgG4-7D8 resultou em ~50 % de anticorpo biespecífico. IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC resultou em

~95 % de anticorpo biespecífico.

[0021] FIGURA 7: Análise de estabilidade de anticorpos biespecíficos heterodiméricos obtidos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA. A estabilidade de amostras biespecíficas geradas pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA pela combinação de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (A), ou IgG4-2F8 x IgG4-7D8 (B) foi testada pela medição da ligação biespecífica de EGFR/CD20 em um ELISA depois de uma reação de troca do ramo Fab induzida por GSH na presença das concentrações indicadas de IgG4 irrelevante. A ligação biespecífica é apresentada em relação à ligação biespecífica do material de partida (controle), que foi ajustado a 100 %. (A) Ligação biespecífica do produto biespecífico induzido por 2-MEA derivado de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC foi preservada, indicando um produto estável que não participou na troca do ramo Fab sob condições de GSH. (B) Ligação biespecífica de EGFR/CD20 do produto biespecífico induzido por 2-MEA derivado de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 foi diminuído, indicando que o produto participou na troca do ramo Fab com o IgG4 irrelevante sob condições de GSH.

[0022] FIGURA 8: Taxa de depuração de plasma de um anticorpo biespecífico heterodimérico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA. Três grupos de camundongos (3 camundongos por grupo) foram injetados com os anticorpos indicados: (1) 100 µg de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC; (2) 100 µg de anticorpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante; (3) 50 µg de IgG1-2F8-ITL + 50 µg de IgG4-7D8-CPPC. (A) Concentrações de anticorpo total com o tempo, determinadas pelo ELISA. As curvas das concentrações plasmáticas de anticorpo total foram as mesmas para todos os anticorpos. (B) Concentração de anticorpo biespecífico como determinado por um ELISA. A biespecificidade do anticorpo injetado foi a mesma com e sem a adição de um excesso de IgG4 irrelevante. (*) Ligação

biespecífica para a mistura de IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC foi abaixo do limite de detecção e, portanto os símbolos correspondentes não puderam ser plotados neste gráfico. Os valores médios de dois experimentos de ELISA são mostrados.

[0023] FIGURA 9: Pureza de anticorpo biespecífico gerado pela troca do ramo Fab entre IgG1-2F8 e IgG4-7D8-CPPC humanos. (A) SDS-PAGE redutor (a) mostra faixas das cadeias pesadas e leves para ambas tanto para a amostra biespecífica quanto para a amostra de controle de IgG1. SDS-PAGE não redutor (b). (B) Os resultados de pico da análise de HP-S mostra que >98 % da amostra biespecífica é homogênea, e praticamente nenhum agregado de anticorpo foi detectável. (C) A espectrometria de massa mostra que a troca do ramo Fab resultou em aproximadamente 100 % do produto biespecífico.

[0024] FIGURA 10: Comparação entre mutante triplo (ITL), mutantes duplos (IT, IL, TL) e mutante único (L) de IgG1-2F8 humano na geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab com IgG4-7D8 humano. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os mutantes triplo e duplo de IgG1-2F8 humano e IgG4-7D8 do tipo selvagem com uma articulação CPSC (A) ou IgG4-7D8-CPPC mutante com uma articulação estabilizada (B), ou o IgG1-2F8-F405L e IgG4-7D8 mutante único com uma articulação CPSC do tipo selvagem ou CPPC estabilizada (C), foi determinada por um ELISA. Uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml ou 0 a 10 µg/ml foi analisada no ELISA para os experimentos incluindo os mutantes duplos e simples, respectivamente. As combinações com os mutantes duplos IgG1-2F8-IL e -TL resulta na ligação de EGFR/CD20 biespecífica similar como o mutante triplo IgG1-ITL. As combinações com o IgG1-2F8-IT não resulta em um produto biespecífico. As combinações com o mutante simples IgG1-2F8-F405L resulta na ligação EGFR/CD20 biespecífica.

[0025] FIGURA 11: Geração de anticorpos biespecíficos usando troca

do ramo Fab induzida por 2-MEA em temperaturas diferentes. A geração de anticorpos biespecíficos pela combinação dos anticorpos EGFR (2F8) e CD20 (7D8) humanos indicados nas reações de troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA a 0°C, 20°C e 37°C foi seguido no devido tempo por um ELISA. A ligação biespecífica foi mais eficiente a 37°C, e mais lenta a 20°C. A 0°C, nenhuma geração de ligação biespecífica foi medida.

[0026] FIGURA 12: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab *in vitro* induzida por agentes redutores diferentes. Um ELISA foi usado para medir a geração de anticorpos biespecíficos pela combinação de IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC humanos em uma reação de redução com as séries de concentração dos agentes redutores indicados. A ligação biespecífica foi medida depois das reações com DTT (máximo obtido a 2,5 mM de DTT) e 2-MEA (máximo obtido a 25 mM de 2-MEA), mas não com GSH. (*) Dados para a concentração de GSH >10 mM foram excluídos devido à formação de agregados de anticorpo.

[0027] FIGURA 13: troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL e os mutantes IgG1-7D8-K409X indicados foi determinada por um ELISA. (A) Uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml foi analisada. O controle positivo é um lote purificado de anticorpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC. (B) A troca é apresentada como ligação biespecífica a 20 µg/ml em relação ao controle positivo (barra preta). As barras cinza escuras representam a ligação biespecífica entre o controle de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8), o controle negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) e entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC. As barras cinza claras representam resultados das reações de troca do ramo Fab simultaneamente realizadas entre os mutantes IgG1-7D8-K409X indicados e IgG1-2F8-ITL.

[0028] FIGURA 14: A desglicosilação de anticorpo não afeta a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os anticorpos EGFR (2F8) e CD20 (7D8) indicados foi determinada por um ELISA. A troca com os anticorpos 7D8 foi comparada com as variantes enzimaticamente desglicosiladas. Uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 μg/ml foi analisada no ELISA. As reações de troca do ramo Fab que envolvem os anticorpos desglicosilados (desglic) mostraram curvas de ligação biespecífica idênticas como as variantes glicosiladas a partir das quais os mesmos foram derivados.

[0029] FIGURA 15: A capacidade para engrenar na troca do ramo Fab está correlacionada com a força da interação CH3-CH3. (A), (B) e (C) Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por GSH entre as construções IgG1-2F8 e IgG1-7D8 (A) ou IgG4-2F8 e IgG4-7D8 (B e C) com as mutações indicadas, apresentada como ligação biespecífica em um ELISA com o tempo. A biespecificidade é apresentada em relação ao controle de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 depois de 24 h. (D) e (E) Relação entre K_D aparente (Tabela 2) e geração de anticorpo biespecífico depois de 24 horas (FIGURAS 15A/B/C) para as moléculas com base em IgG1 (D) ou com base em IgG4 (E).

[0030] FIGURA 16: Alinhamento de sequência de anticorpo 2F8 anti-EGFr em uma cadeia principal de IgG1, IgG4 e IgG3 (parcial). A numeração de aminoácido de acordo com Kabat e de acordo com o índice da EU são representados (ambas descritas em Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Betesda, MD. (1991)).

[0031] FIGURA 17: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab *in vitro* induzida por agentes redutores diferentes. Um ELISA foi usado para medir a geração de anticorpos biespecíficos pela combinação de

IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanos em uma reação de redução com séries de concentração dos agentes redutores indicados. Os valores OD medidos foram normalizados para o sinal de uma amostra de controle biespecífica derivada da troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, que foi ajustada a 100 %. A ligação biespecífica máxima foi medida depois que as reações com DTT na faixa de concentração de 0,5 a 50 mM, 2-MEA na faixa de concentração de 25 a 50 mM e tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) na faixa de concentração de 0,5 a 5,0 mM, mas não com GSH. (*) Os dados para a concentração de GSH ≥ 25 mM foram excluídos devido à formação de agregados de anticorpo.

[0032] FIGURA 18: Geração de anticorpos biespecíficos usando troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanos.

(A) a geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA foi determinada por um ELISA. o gráfico apresentado mostra o resultado do ELISA em que uma concentração de anticorpo total de 20 µg/ml foi usada. 2-MEA eficientemente induziu a troca do ramo Fab. (B) a geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA foi determinada pela espectrometria de massa para todas as amostras da série de concentração de 0 a 40 mM de 2-MEA. Depois da quantificação dos dados da espectrometria de massa, a porcentagem de anticorpo biespecífico foi calculada e plotada contra a concentração de 2-MEA na reação de troca do ramo Fab. IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R resultou em ~100 % de anticorpo biespecífico, confirmando os dados do ELISA.

[0033] FIGURA 19: Pureza de anticorpo biespecífico gerado pela troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humano. A espectrometria de massa mostra que a troca do ramo Fab resultou em aproximadamente 100 % do produto biespecífico.

[0034] FIGURA 20: Depuração de plasma de um anticorpo biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA. Dois grupos de camundongos (3 camundongos por grupo) foram injetados com os anticorpos indicados: (1) 100 µg de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R; (2) 100 µg de anticorpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante. (A) Concentrações de anticorpo total com o tempo, determinada pelo ELISA. As curvas das concentrações plasmáticas de anticorpo total foram as mesmas para todos os anticorpos. (B) Concentração de anticorpo biespecífico como determinado por um ELISA. A biespecificidade do anticorpo injetado foi a mesma com e sem a adição de um excesso de IgG4 irrelevante.

[0035] FIGURA 21: Morte de célula mediada por CDC de células que expressam CD20 por um anticorpo biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. As séries de concentração dos anticorpos indicados foram usados para testar a sua capacidade para mediar CDC em células Daudi (A) e Raji (B). Ambas as linhagens de célula expressam CD20 mas não EGFR. A introdução da K409R em IgG1-7D8 não influenciou a sua capacidade para induzir CDC. O anticorpo biespecífico derivado da troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R foi capaz de induzir ainda CDC.

[0036] FIGURA 22: Morte de célula mediada por ADCC de células que expressam EGFR por um anticorpo biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. A série de concentração dos anticorpos indicados foram usados para testar a sua capacidade para mediar ADCC nas células A431. IgG1-7D8 pode não ligar as células A431 negativas em CD20 e consequentemente não induzir ADCC. ADCC foi induzida pelo anticorpo EGFR IgG1-2F8, também depois da introdução das mutações F405L no domínio CH3. A função efetora ADCC de

IgG1-2F8-F405L foi retida no formato biespecífico obtido pela troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

[0037] FIGURA 23: troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre os mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os mutantes IgG1-2F8-F405X indicados e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA. (A) Uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml foi analisada no ELISA. O controle positivo é um lote purificado de anticorpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. (B) A troca é apresentada como ligação biespecífica em 20 µg/ml de concentração de anticorpo em relação ao controle positivo (barra preta). As barras cinza escuras representam a ligação biespecífica entre o controle de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) e o controle negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). As barras cinza claras representam resultados de reações de troca do ramo Fab simultaneamente realizadas entre os mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R indicados ou controles.

[0038] FIGURA 24: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R. A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R indicados foi determinada por um ELISA. (A) Uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml foi analisada no ELISA. O controle positivo é um lote purificado de anticorpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. (B) A troca é apresentada como ligação biespecífica a 20 µg/ml de concentração de anticorpo em relação ao controle positivo (barra preta). As barras cinza escuras representam a ligação biespecífica entre o controle de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) e o controle negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). As barras cinza claras representam resultados de reações de troca do ramo Fab simultaneamente realizadas entre os mutantes IgG1-2F8-Y407X e

IgG1-7D8-K409R indicados ou controles.

[0039] FIGURA 25: Análise de anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA pela SDS-PAGE sob condições não redutoras (FIGURA 25(A)) e redutoras (FIGURA 25(B)).

[0040] FIGURA 26: Perfis HP-S do material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (FIGURA 26(B)), o material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (FIGURA 26(A)), a mistura (1:1) de ambos homodímeros (FIGURA 26(C)), e o produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (FIGURA 26(D)).

[0041] FIGURA 27: Espectrometria de massa (ESI-MS) do material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (FIGURA 27(B)), o material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (FIGURA 27(A)), a mistura (1:1) de ambos os homodímeros (FIGURA 27(C)), e o produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (FIGURA 27(D)).

[0042] FIGURA 28: Perfis de isoeletrofocalização capilar (cIEF) do material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (FIGURA 28(A)), do material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (FIGURA 28(B)), da mistura (1:1) de ambos homodímeros (FIGURA 28(C)), e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (FIGURA 28(D)).

[0043] FIGURA 29: Perfis de HPLC-CIEX do material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (FIGURA 29(A)), do material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (FIGURA 29(B)), da mistura (1:1) de ambos homodímeros (FIGURA 29(C)), e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (FIGURA 29(D)).

[0044] FIGURA 30: Análise espec de massa com ionização por

eletropulverização de IgG obtido pela cotransfecção dos vetores de expressão que codificam as cadeias pesada e leve de IgG1-7D8-K409R ou IgG1-2F8-F405. Os picos heterodiméricos são indicados com um *. Os picos homodiméricos são indicados com um †.

[0045] FIGURA 31: Reação de troca dos homodímeros IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R como monitorado pela Troca de Cátion pela Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC-CIEX) depois da injeção em intervalos diferentes.

[0046] FIGURA 32: Homodímeros residuais da reação de troca como mostrada na FIGURA 32 como detectado com o método CIEX (indicado pelas setas).

[0047] FIGURA 33: Geração de anticorpos biespecíficos em várias concentrações de IgG, concentrações de 2-MEA, temperaturas e tempos de incubação como determinado por um ELISA.

[0048] FIGURA 34: Geração de anticorpos biespecíficos em várias concentrações de IgG, concentrações de 2-MEA, temperaturas e tempos de incubação como determinados por um ELISA e comparados com o controle que foi arbitrariamente ajustado a 100 %.

[0049] FIGURA 35: Geração de anticorpos biespecíficos em várias concentrações de IgG, concentrações de 2-MEA, temperaturas e tempos de incubação como analisados pela HPLC-CIEX.

[0050] FIGURA 36: A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os mutantes IgG1-2F8-L368X indicados e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA usando uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml (FIGURA 37(A)). o controle positivo é um lote purificado de anticorpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. FIGURA 37(B) mostra a ligação biespecífica a 20 µg/ml em relação ao controle positivo (barra preta). As barras cinza escuras representam a ligação biespecífica entre o controle IgG4

(IgG4-7D8 x IgG4-2F8) e o controle negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). As barras cinza claras representam resultados das reações de troca do ramo Fab simultaneamente realizadas entre os mutantes IgG1-2F8-L368X indicados e IgG1-7D8-K409R.

[0051] FIGURA 37: A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os mutantes IgG1-2F8-K370X indicados e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA usando uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml (FIGURA 37(A)). O controle positivo é um lote purificado de anticorpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. FIGURA 37(B) mostra a ligação biespecífica a 20 µg/ml em relação ao controle positivo (barra preta). As barras cinza escuras representam a ligação biespecífica entre o controle IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) e o controle negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). As barras cinza claras representam resultados de reações de troca do ramo Fab simultaneamente realizadas entre os mutantes IgG1-2F8-D370X indicados e IgG1-7D8-K409R.

[0052] FIGURA 38: A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre os mutantes IgG1-2F8-D399X indicados e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA usando uma série de concentração (anticorpo total) de 0 a 20 µg/ml (FIGURA 38(A)). A FIGURA 38(B) mostra a ligação biespecífica a 20 µg/ml de concentração de anticorpo em relação ao controle positivo (barra preta). As barras cinza escuras representam a ligação biespecífica entre o controle de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) e o controle negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). As barras cinza claras representam resultados das reações de troca do ramo Fab simultaneamente realizadas entre os mutantes IgG1-2F8-D399X indicados e IgG1-7D8-K409R.

[0053] FIGURA 39: A troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre quatro combinações de mutante IgG1 diferentes a 15°C depois de 0, 30, 60,

105 e 200 min de incubações como determinado pelo ELISA intercalado.

[0054] FIGURA 40: A troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre diferentes combinações de mutante de IgG1 depois da incubação de anticorpo a 15°C por 90 min como determinado pelo ELISA intercalado.

[0055] FIGURA 41: Fosforilação de c-Met pelos anticorpos específicos de c-Met. As células A549 são incubadas por 15 min com HGF ou um painel de anticorpos diferentes. As proteínas são separadas pela eletroforese em gel de SDS-page e transferidas para membranas pelo western blotting. c-Met fosforilado, c-Met total e β-actina são detectados pelos anticorpos contra c-Met fosforilado, c-Met total ou β-actina.

[0056] FIGURA 42: Ensaio de proliferação com células NCI-H441. As células NCI-H441 foram incubadas por sete dias com IgG1 biespecífico monovalente 069/b12, anticorpos de controle (IgG1-069, Unicorpo-069, IgG1-b12) deixados sem tratamento. A massa de célula foi determinada e plotada como porcentagem de amostras não tratadas (ajustadas como 100 %)

[0057] FIGURA 43: a morte das células mediada por CDC de células que expressam CD20 pelos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L ou IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R. A série de concentração dos anticorpos indicados foram usados para testar a sua capacidade para mediar CDC nas células Daudi (A) e Raji (B). Ambas as linhagens de célula expressam CD20 mas não EGFR. Os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R foi tão eficaz quanto IgG1-7D8 na indução da morte de célula mediada por CDC. O anticorpo biespecífico derivado da troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R resulta em um anticorpo biespecífico que liga CD20 monovalente, que levemente afetou a indução da morte de célula mediada por CDC com um pouco.

[0058] FIGURA 44: Morte de células A431 induzida pelos anticorpos

biespecíficos anti-capa-ETA' pré-incubados HER2 x HER2. A viabilidade das células A431 depois de 3 dias de incubação com anticorpos HER2, pré-incubadas com anti-capa-ETA'. A viabilidade de célula foi quantificada usando Azul de Alamar. Os dados mostrados são intensidades de fluorescência (FI) de um experimento com células A431 tratadas com anticorpos HER2 conjugados com anti-capa-ETA' e anticorpos biespecíficos HER2 x HER2. A estaurosporina foi usada como controle positivo, ao passo que um anticorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo.

[0059] FIGURA 45: As moléculas HER2 x HER2 biespecíficas induziram a inframodulação do receptor de HER2. A porcentagem relativa dos níveis de expressão de HER2 em lisados de célula AU565 depois de 3 dias de incubação com 10 µg/ml de mAb. A quantidade de HER2 foi quantificada usando um ELISA de captura específico de HER2 e representado como inibição percentual comparada com células não tratadas. Os dados mostrados são a média de dois experimentos mais o desvio padrão.

[0060] FIGURA 46: Análise de colocalização de anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 (FITC) com marcador lisossômico LAMP1 (Cy5). A intensidade em pixel de FITC que se sobrepõem com Cy5 para vários anticorpos HER2 monoespecífico e anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 (FIGURA 46(B)) a intensidade em pixel de FITC em pixels positivos em LAMP1/Cy5 de três imagens diferentes é plotada para cada anticorpo testado. Os monoespecíficos mostram intensidades de pixel de FITC mais baixa nos pixels positivos em LAMP1/Cy5 comparados com os biespecíficos. A FIGURA 46(B) representa o valor médio de intensidade em pixel de FITC por pixel positivo em LAMP1/Cy5 calculada a partir de três imagens diferentes. Juntos estes resultados indicam que depois da internalização níveis mais altos de anticorpos biespecíficos, comparados com anticorpos monoespecíficos, determinam o local específico para vesículas positivas em Lamp1/Cy5.

[0061] FIGURA 47: Inibição da proliferação pelos anticorpos de HER-2 mono e biespecíficos. As células AU565 foram semeadas na presença de 10 µg/ml de anticorpo HER2 ou anticorpo biespecífico HER2 x HER2 em meio de cultura de célula isento de soro. Depois de três dias, a quantidade de células viáveis foi quantificada com Azul de Alamar e a viabilidade de célula foi apresentada como uma porcentagem relativa para as células não tratadas. Um anticorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo. Os dados mostrados são a porcentagem de células AU565 viáveis comparadas com as células não tratadas medidas em cinco vezes ± o desvio padrão. * indica que apenas um ponto de dados foi representado.

[0062] FIGURA 48: Ligação de IgG1 mono e biespecífico e anticorpos IgG1 deletados na articulação para FcRn de ser humano e camundongo em pH diferente. As placas com FcRn de ser humano e camundongo foram incubadas com anticorpos IgG1 mono- e biespecíficos diferentes ou moléculas de IgG1 apagadas na articulação. A ligação para FcRn foi analisada pelo ELISA a 405 nm. (A) Ligação de anticorpos IgG1 mono e biespecíficos e moléculas de IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1) para FcRn de ser humano no pH 7,4 e 6,0. A ligação ao FcRn humano é muito baixa no pH neutro. No pH 6,0 os anticorpos (biespecíficos) ligam-se eficientemente ao FcRn humano, a menos que eles contenham a mutação H435A. As moléculas de IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1) ligam FcRn humano com eficiência baixa. (B) A ligação de anticorpos IgG1 mono e biespecíficos e moléculas de IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1) ao FcRn de camundongo no pH 7,4 e 6,0. A ligação ao FcRn de camundongo é muito baixa no pH neutro. No pH 6,0 os anticorpos (biespecíficos) ligam-se muito eficientemente ao FcRn de camundongo, a menos que eles contenham a mutação H435A em ambos os ramos Fab. A molécula biespecífica que abriga a mutação H435A em apenas um ramo Fab é ainda capaz de ligar FcRn de camundongo. As moléculas de IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1) ligam

FcRn de camundongo com eficiência intermediária e a molécula de IgG1 biespecífica (Uni-G1) apagada na articulação que abriga a mutação H435A em apenas um ramo Fab é levemente menos eficiente.

[0063] FIGURA 49: A citotoxicidade mediada pela célula T de células AU565 pelos anticorpos biespecíficos Her2 x CD3 assim como pelos mutantes N297Q de anticorpos biespecíficos Her2 x CD3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

[0064] O termo "imunoglobulina" refere-se a uma classe de glicoproteínas estruturalmente relacionadas que consiste de dois pares de cadeias de polipeptídeo, um par de cadeias leves (L) de peso molecular baixo e um par de cadeias pesadas (H), todas as quatro interconectadas pelas ligações de dissulfeto. A estrutura de imunoglobulinas foi bem caracterizada. Ver por exemplo Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, Nova Iorque (1989)). Em resumo, cada cadeia pesada tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada tipicamente é compreendida de três domínios, CH1, CH2, e CH3. As cadeias pesadas são interconectadas via ligações de dissulfeto na chamada "região de articulação". Cada cadeia leve tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve tipicamente é compreendida de um domínio, CL. Tipicamente, a numeração dos resíduos de aminoácido na região constante é realizada de acordo com o índice EU como descrito em Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Betesda, MD. (1991). A FIGURA 16 dá uma vista geral da numeração de EU e Kabat para formas de isótipo diferentes do anticorpo 2F8 (WO 02/100348). As regiões VH e VL podem ser subdivididas ainda em regiões de hipervariabilidade (ou regiões

hipervariáveis que podem ser hipervariáveis na sequência e/ou forma de alças estruturalmente definidas), também chamadas de regiões determinadoras de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de armação (FRs). Cada VH e VL é tipicamente composta de três CDRs e quatro FRs, disposta do terminal amino para o terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver também Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)).

[0065] Quando aqui usado, o termo “ramo Fab” refere-se a um par de cadeia pesada-cadeia leve.

[0066] Quando aqui usado, o termo “região Fc” refere-se a uma região de anticorpo que compreende pelo menos a região de articulação, um domínio CH2 e um domínio CH3.

[0067] O termo “anticorpo” (Ab) no contexto da presente invenção refere-se a uma molécula de imunoglobulina, um fragmento de uma molécula de imunoglobulina, ou um derivado de cada um destes, que tem a capacidade para ligar especificamente a um antígeno sob condições fisiológicas típicas com uma meia vida de períodos significantes de tempo, tal como pelo menos cerca de 30 min, pelo menos cerca de 45 min, pelo menos cerca de uma hora, pelo menos cerca de duas horas, pelo menos cerca de quatro horas, pelo menos cerca de 8 horas, pelo menos cerca de 12 horas (h), cerca de 24 horas ou mais, cerca de 48 horas ou mais, cerca de 3, 4, 5, 6, 7 ou mais dias, etc., ou qualquer outro período definido funcionalmente relevante (tal como um tempo suficiente para induzir, promover, realçar, e/ou modular uma resposta fisiológica associada com a ligação de anticorpo ao antígeno e/ou tempo suficiente para o anticorpo recrutar uma atividade efetora). As regiões variáveis das cadeias pesada e leve da molécula de imunoglobulina contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos (Abs) podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (tais como

células efetoras) e componentes do sistema de complemento tal como C1q, o primeiro componente no caminho clássico de ativação de complemento. Um anticorpo também pode ser um anticorpo biespecífico, diacorpo, ou molécula similar. O termo “anticorpo biespecífico” refere-se ao anticorpo tendo especificidades para pelo menos dois epítopos diferentes, tipicamente epítopos não sobrepostos. Como indicado acima, o termo anticorpo aqui, a menos que de outro modo estabelecido ou claramente contradito pelo contexto, inclui fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade para especificamente se ligam ao antígeno. Tais fragmentos podem ser fornecidos por qualquer técnica conhecida, tal como clivagem enzimática, síntese de peptídeo e técnicas de expressão recombinantes. Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada pelos fragmentos de um anticorpo de comprimento total, por exemplo um fragmento $F(ab')_2$. Também deve ser entendido que o termo anticorpo, a menos que de outro modo especificado, também inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (mAbs), polipeptídeos equivalentes a anticorpo, tais como anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados. Um anticorpo como gerado pode possuir qualquer isótipo.

[0068] O termo “anticorpo de comprimento total” quando aqui usado, refere-se a um anticorpo que contém todos os domínios constantes e variáveis de cadeia pesada e leve que são normalmente encontrados em um anticorpo deste isótipo.

[0069] Como aqui usado, “isótipo” refere-se à classe da imunoglobulina (por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, ou IgM) que é codificada pelos genes da região constante de cadeia pesada.

[0070] O termo “anticorpo humano”, como aqui usado, é intencionado a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não

codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzida pela mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo "anticorpo humano", como aqui usado, não é intencionado a incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie de mamífero, tal como um camundongo, foi enxertada nas sequências da estrutura humana.

[0071] Quando aqui usado, o termo "anticorpo de cadeia pesada" ou "anticorpo de cadeia-pesada" refere-se a um anticorpo que consiste apenas de duas cadeias pesadas e carece das duas cadeias leves usualmente encontradas em anticorpos. Os anticorpos de cadeia pesada, que naturalmente ocorrem por exemplo em camelídeos, podem ligar antígenos a despeito de ter apenas domínios VH.

[0072] O termo "epítopo" significa um determinante de proteína capaz de ligação específica a um anticorpo. Os epítopos usualmente consistem de agrupamentos de superfície de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e usualmente têm características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Epítopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos em que a ligação ao primeiro mas não ao último é perdido na presença de solventes de desnaturação. O epítopo pode compreender resíduos de aminoácido diretamente envolvidos na ligação (também chamado componente imunodominante do epítopo) e outros resíduos de aminoácido, que não estão diretamente envolvidos na ligação, tais como resíduos de aminoácido que são eficazmente bloqueados pelo peptídeo que liga especificamente o antígeno (em outras palavras, o resíduo de aminoácido está dentro da área ocupada do peptídeo que liga especificamente o antígeno).

[0073] Como aqui usado, o termo "ligação" no contexto da ligação de um anticorpo a um antígeno predeterminado tipicamente é uma ligação com

uma afinidade que corresponde a um K_D de cerca de 10^{-6} M ou menos, por exemplo 10^{-7} M ou menos, tal como cerca de 10^{-8} M ou menos, tal como cerca de 10^{-9} M ou menos, cerca de 10^{-10} M ou menos, ou cerca de 10^{-11} M ou ainda menos quando determinada por exemplo pela tecnologia da ressonância plásmon de superfície (SPR) em um instrumento BIAcore 3000 usando o antígeno como o ligando e o anticorpo como o análito, e ligam-se ao antígeno predeterminado com uma afinidade que corresponde a um K_D que é pelo menos dez vezes mais baixo, tal como pelo menos 100 vezes mais baixo, por exemplo pelo menos 1.000 vezes mais baixo, tal como pelo menos 10.000 vezes mais baixo, por exemplo pelo menos 100.000 vezes mais baixa do que a sua afinidade para a ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) outros que não o antígeno predeterminado ou um antígeno intimamente relacionado. A quantidade com que a afinidade é mais baixa é dependente do K_D do anticorpo, de modo que quando o K_D do anticorpo é muito baixo (isto é, o anticorpo é altamente específico), então a quantidade com que a afinidade para o antígeno é mais baixa do que a afinidade para um antígeno não específico pode ser de pelo menos 10.000 vezes. O termo "K_D" (M), como aqui usado, refere-se à constante do equilíbrio de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular.

[0074] Quando aqui usado o termo "interação heterodimérica entre a primeira e segunda regiões CH3" refere-se à interação entre a primeira região CH3 e a segunda região CH3 em uma primeira-CH3/segunda-CH3 proteínas heterodiméricas.

[0075] Quando aqui usado o termo "interações homodiméricas da primeira e segunda regiões CH3" refere-se à interação entre uma primeira região CH3 e uma outra primeira região CH3 em uma primeira-CH3/primeira-CH3 proteínas homodimérica e a interação entre uma segunda região CH3 e uma outra segunda região CH3 em uma segunda-CH3/segunda-CH3 proteínas homodiméricas.

[0076] Um “anticorpo isolado,” como aqui usado, indica que o material foi removido do seu ambiente original (por exemplo, o ambiente natural se o mesmo é de ocorrência natural ou a célula hospedeira se a mesma é recombinantemente expressada). Também é vantajoso que os anticorpos estejam na forma purificada. O termo “purificado” não requer pureza absoluta; ao invés, é intencionado como uma definição relativa, indicando um aumento da concentração de anticorpo em relação à concentração de contaminantes em uma composição quando comparada com o material de partida.

[0077] O termo “célula hospedeira”, como aqui usado, é intencionado a referir-se a uma célula dentro da qual um vetor de expressão foi introduzido, por exemplo um vetor de expressão que codifica um anticorpo da invenção. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, transfectomas, tais como células CHO, células HEK293, células NS/0, e células linfocíticas.

[0078] Quando aqui usado, o termo “coexpressão” de duas ou mais construções de ácido nucleico, refere-se à expressão das duas construções em uma única célula hospedeira.

[0079] O termo “proteína de célula de tumor” refere-se a uma proteína localizada na superfície da célula de uma célula de tumor.

[0080] Como aqui usado, o termo “célula efetora” refere-se a uma célula imune que está envolvida na fase efetora de uma resposta imune, como oposto às fases cognitivas e de ativação de uma resposta imune. As células imunes exemplares incluem uma célula de uma origem mieloide ou linfoide, por exemplo linfócitos (tais como células B e células T incluindo células T citolíticas (CTLs)), células matadoras, células matadoras naturais, macrófagos, monócitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tais como neutrófilos, granulócitos, mastoides, e basófilos. Algumas células efetoras expressam receptores Fc específicos e realizam funções imunes específicas. Em algumas formas de realização, uma célula efetora é capaz de induzir

citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), tal como uma célula matadora natural, capaz de induzir a ADCC. Em algumas formas de realização, uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo ou célula alvo.

[0081] O termo “condições redutoras” ou “ambiente redutor” refere-se a uma condição ou um ambiente em que um substrato, aqui um resíduo de cisteína na região de articulação de um anticorpo, é mais provavelmente tornar-se reduzido do que oxidado.

[0082] O termo “isomerização de ligação de dissulfeto” refere-se a uma troca de ligações de dissulfeto entre cisteínas diferentes, isto é, o embaralhamento de ligações de dissulfeto.

Outros aspectos e formas de realização da invenção

[0083] Como descrito acima, em um primeiro aspecto, a invenção diz respeito a um método *in vitro* para gerar uma proteína heterodimérica, o dito método compreendendo as seguintes etapas:

a) fornecer uma primeira proteína homodimérica que compreende uma região Fc de uma imunoglobulina, a dita região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

b) fornecer uma segunda proteína homodimérica que compreende uma região Fc de uma imunoglobulina, a dita região Fc compreendendo uma segunda região CH3,

[0084] em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubar a dita primeira proteína junto com a dita segunda proteína sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, e

d) obter a dita proteína heterodimérica.

[0085] O formato biespecífico pode ser usado em muitos modos para

gerar combinações desejadas de anticorpos biespecíficos. Além de ser capaz de combinar anticorpos que alvejam antígenos diferentes em um modo muito seletivo o mesmo pode ser usado para mudar uma propriedade desejada, por exemplo para aumentar CDC, pela combinação de dois anticorpos diferentes que alvejam o mesmo antígeno. Além disso, o mesmo pode ser usado para remover atividade agonística parcial de um anticorpo antagonístico ou converter um anticorpo agonístico em um anticorpo antagonístico pela fabricação de um anticorpo biespecífico deste com um anticorpo irrelevante (inativo).

[0086] Em uma forma de realização, as proteínas homodiméricas são selecionadas do grupo que consiste de (i) uma região Fc, (ii) um anticorpo, (iii) uma proteína de fusão que compreende uma região Fc, tal como uma região Fc fundida a um receptor, citocina ou hormônio, e (iv) uma região Fc conjugada a um pró-medicamento, peptídeo, medicamento ou uma toxina.

[0087] Em algumas formas de realização, a dita primeira e/ou segunda proteína homodimérica compreendem, além da região Fc, uma ou mais ou todas das outras regiões de um anticorpo, isto é uma região CH1, uma região VH, uma região CL e/ou uma região VL. Assim, em uma forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica é um anticorpo de comprimento total. Em uma outra forma de realização, a dita segunda proteína homodimérica é um anticorpo de comprimento total.

[0088] Em uma forma de realização importante, as ditas primeira e segunda proteína homodiméricas são ambas anticorpos, preferivelmente anticorpos de comprimento total, e ligam epítopos diferentes. Em uma tal forma de realização, a proteína heterodimérica que é gerada é um anticorpo biespecífico. Os ditos epítopos podem estar localizados em antígenos diferentes ou no mesmo antígeno.

[0089] Em outras formas de realização, entretanto, apenas uma das proteínas homodiméricas é um anticorpo de comprimento total e a outra

proteína homodimérica não é um anticorpo de comprimento total, por exemplo uma região Fc sem uma região variável, expressada em conjunção com uma outra proteína ou sequência de peptídeo como um receptor, citocina ou hormônio, ou conjugados a um pró-medicamento, peptídeo, um medicamento ou uma toxina. Em uma outra forma de realização, nenhuma das proteínas homodiméricas é um anticorpo de comprimento total. Por exemplo, ambas as proteínas homodiméricas podem ser regiões Fc que são fundidas a uma outra proteína ou sequência de peptídeo como um receptor, citocina ou hormônio, ou conjugados a um pró-medicamento, peptídeo, um medicamento ou uma toxina.

[0090] Em uma forma de realização, a região Fc da primeira proteína homodimérica é de um isótipo selecionado do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e a região Fc da segunda proteína homodimérica é de um isótipo selecionado do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Em uma forma de realização preferida, as regiões Fc tanto da dita primeira quanto da dita segunda proteína homodimérica são do isótipo IgG1. Em uma outra forma de realização preferida, uma das regiões Fc das ditas proteínas homodiméricas é do isótipo IgG1 e a outra do isótipo IgG4. Na última forma de realização, o heterodimérico resultante compreende uma região Fc de um IgG1 e uma região Fc de IgG4 e pode assim ter propriedades intermediárias interessantes com respeito à ativação de funções efetoras. Um produto similar pode ser obtido se a dita primeira e/ou a dita segunda proteínas homodiméricas compreende uma mutação que remove o sítio aceitador para a glicosilação ligada à Asn ou é de outro modo manipulado para mudar as propriedades de glicosilação.

[0091] Em uma outra forma de realização, uma ou ambas das proteínas homodiméricas é a glico-engendrada para reduzir fucose e assim realçar ADCC, por exemplo pela adição de compostos ao meio de cultura durante a produção de anticorpo como descrito na US2009317869 ou como

descrito em van Berkel *et al*. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105: 350 ou pelo uso de células silenciadas em FUT8, por exemplo como descrito em Yamane-Ohnuki *et al* (2004) Biotechnol. Bioeng 87: 614. ADCC pode ser alternativamente otimizado usando o método descrito por Umaña *et al*. (1999) Nature Biotech 17: 176.

[0092] Em uma outra forma de realização, uma ou ambas das proteínas homodiméricas foram engendradas para realçar a ativação de complemento, por exemplo como descrito em Natsume *et al*. (2009) Cancer Sci. 100: 2411.

[0093] Em uma outra forma de realização, uma ou ambas das proteínas homodiméricas foram engendradas para reduzir ou aumentar a ligação ao receptor de Fc neonatal (FcRn) de modo a manipular a meia vida sérica da proteína heterodimérica.

[0094] Em uma outra forma de realização, uma das proteínas de partida homodiméricas foi engendrada para não ligar a proteína A, permitindo assim separar a proteína heterodimérica da dita proteína de partida homodimérica passando-se o produto em uma coluna de proteína A. Isto em particular pode ser útil para as formas de realização em que um excesso de uma proteína homodimérica é usado em relação à outra proteína homodimérica como material de partida. Em tais formas de realização, pode ser útil engendrar a proteína homodimérica que está em excesso de modo que a mesma libere a sua capacidade para ligar a proteína A. A seguir da reação de heterodimerização, a proteína heterodimérica pode ser depois separada de um excesso de proteína homodimérica não trocada pela passagem em uma coluna de proteína A.

[0095] Em uma outra forma de realização, uma das proteínas homodiméricas é uma região Fc ou um anticorpo de comprimento total que reconhece um epítopo não relevante ou um anticorpo de comprimento total que contém as sequências derivadas da linha germinativa que não sofreram a

hipermutação somática e não ligam autoantígenos. Em uma tal forma de realização a proteína heterodimérica funciona como um anticorpo monovalente. Em uma outra forma de realização, ambas as proteínas homodiméricas compreendem a mesma cadeia pesada, mas apenas uma das proteínas homodiméricas contém uma cadeia leve que forma um sítio de ligação de antígeno funcional com a dita cadeia pesada, ao passo que a outra proteína homodimérica contém uma cadeia leve não funcional, que não liga nenhum antígeno em combinação com a dita cadeia pesada. Em uma tal forma de realização, a proteína heterodimérica funciona como um anticorpo monovalente. Uma tal cadeia leve não funcional por exemplo pode ser uma sequência derivada da linha germinativa que não sofreu a hipermutação somática e não liga autoantígenos.

[0096] Os anticorpos a serem usados como material de partida homodimérico da presente invenção por exemplo podem ser produzidos pelo método do hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al*., Nature 256, 495 (1975), ou pode ser produzido pelos métodos de DNA recombinante. Os anticorpos monoclonais também podem ser isolados das bibliotecas de anticorpo de fago usando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al*., Nature 352, 624 628 (1991) e Marks *et al*., J. Mol. Biol. 222, 581 597 (1991). Os anticorpos monoclonais podem ser obtidos a partir de qualquer fonte adequada. Assim, por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser obtidos a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplênicas de murino obtidas de camundongos imunizados com um antígeno de interesse, por exemplo na forma de células que expressam o antígeno na superfície, ou um ácido nucleico que codifica um antígeno de interesse. Os anticorpos monoclonais também podem ser obtidos a partir de hibridomas derivados de células que expressam anticorpo de seres humanos imunizados ou mamíferos não humanos tais como ratos, cães, primatas, etc.

[0097] Os anticorpos a serem usados como material de partida

homodimérico da presente invenção por exemplo podem ser anticorpos quiméricos ou humanizados. Em uma outra forma de realização, uma ou ambas das proteínas de partida homodiméricas, exceto para qualquer uma das mutações especificadas, são de um anticorpo humano. Os anticorpos monoclonais humanos podem ser gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossômicos, por exemplo camundongos HuMAb, que carregam partes do sistema imune humano ao invés do sistema de camundongo. O camundongo HuMAb contém um dos minilocais de gene da imunoglobulina humana que codifica as sequencias de imunoglobulina da cadeia pesada (μ e γ) e leve κ humanas não rearranjadas, junto com mutações alvejadas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógenas (Lonberg, N. *et al*., Nature 368, 856 859 (1994)). Consequentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo e em resposta à imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanos introduzidos, sofrem a comutação de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais humanos de alta afinidade IgG,κ (Lonberg, N. *et al*. (1994), supra; revisado em Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. e Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995) e Harding, F. e Lonberg, N. Ann. Nova Iorque Acad. Sci 764 536 546 (1995)). A preparação de camundongos HuMAb é descrita em detalhes em Taylor, L. *et al*., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. *et al*., International Immunology 5, 647 656 (1993), Tuaillon *et al*., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. *et al*., International Immunology 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. *et al*., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996). Ver também US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 e WO 01/09187. Os esplenócitos destes camundongos transgênicos podem ser usados para gerar hibridomas que

secretam anticorpos humanos monoclonais de acordo com técnicas bem conhecidas.

[0098] Alem disso, os anticorpos humanos da presente invenção ou anticorpos da presente invenção de outras espécies podem ser identificados através das tecnologias do tipo demonstração, incluindo, sem limitação, demonstração de fago, demonstração de retroviral, demonstração ribossômica, demonstração de mamífero, e outras técnicas, usando técnicas bem conhecidas no ramo e as moléculas resultantes podem ser submetidas à maturação adicional, tal como maturação por afinidade, visto que tais técnicas são bem conhecida no ramo.

[0099] Em uma outra forma de realização da invenção, o anticorpo ou uma parte deste, por exemplo uma ou mais CDRs, é de uma espécie na família *Camelidae*, ver a WO2010001251, ou uma espécie de peixe cartilaginoso, tal como o tubarão lixa ou anticorpos de cadeia pesada ou domínio.

[00100] Em uma forma de realização do método da invenção, as ditas primeira e segunda proteínas homodiméricas fornecidas nas etapas a) e b) são purificadas.

[00101] Em uma forma de realização, a primeira e/ou segunda proteínas homodiméricas são conjugadas a um medicamento, um pró-medicamento ou uma toxina ou contém um grupo aceitador para os mesmos. Tal grupo aceitador por exemplo pode ser um aminoácido não natural.

[00102] Como descrito acima, as sequências da primeira e segunda regiões CH3 das proteínas de partida homodiméricas são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3.

[00103] Em uma forma de realização, a força aumentada da interação heterodimérica quando comparada a cada uma das interações homodiméricas

é devido às modificações de CH3 outras que não a introdução de ligações covalentes, resíduos de cisteína ou resíduos carregados.

[00104] Em algumas formas de realização, o produto da invenção é altamente estável e não sofre troca do ramo Fab sob condições brandamente redutoras *in vitro* ou, importantemente, *in vivo* na administração a um ser humano. Assim, em uma forma de realização, a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda proteínas na proteína heterodimérica resultante é tal que nenhuma troca na ramificação Fab pode ocorrer a 0,5 mM de GSH sob as condições descritas no Exemplo 13.

[00105] Em uma outra forma de realização, a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda proteínas na proteína heterodimérica resultante é tal que nenhuma troca na ramificação Fab ocorre *in vivo* em camundongos sob as condições descritas no Exemplo 14.

[00106] Em uma outra forma de realização, a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda proteínas na proteína heterodimérica resultante é mais do que duas vezes mais forte, tal como mais do que três vezes mais forte, por exemplo mais do que cinco vezes mais forte do que a mais forte das duas interações homodiméricas, por exemplo quando determinadas como descrito no Exemplo 30.

[00107] Em uma outra forma de realização, as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que as constantes de dissociação da interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda proteínas na proteína heterodimérica resultante está abaixo de 0,05 micromolar quando ensaiada como descrito no Exemplo 30.

[00108] Em uma outra forma de realização, as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que as constantes de dissociação de ambas interações homodiméricas estão acima de 0,01 micromolar, tal como acima de 0,05 micromolar preferivelmente entre 0,01 e 10 micromolares, tal como entre 0,05 e 10 micromolares, mais preferivelmente entre 0,01 e 5, tal

como entre 0,05 e 5 micromolares, ainda mais preferivelmente entre 0,01 e 1 micromolar, tal como entre 0,05 e 1 micromolar, entre 0,01 e 0,5 ou entre 0,01 e 0,1 quando ensaiadas como descrito no Exemplo 21. As formas de realização em que as proteínas de partida homodiméricas são relativamente estáveis pode ter a vantagem de que é mais fácil para produzir uma quantidade grande de proteína de partida e por exemplo evitar a agregação ou dobra errada.

[00109] Em algumas formas de realização, uma proteína heterodimérica estável pode ser obtida em alto rendimento usando o método da invenção com base em duas proteínas de partida homodiméricas que contêm apenas umas poucas, mutações assimétricas, completamente conservativas, nas regiões CH3.

[00110] Assim, em uma forma de realização, as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 contêm substituições de aminoácido em posições não idênticas.

[00111] Os substituintes de aminoácido podem ser aminoácidos naturais ou aminoácidos não naturais. Os exemplos de aminoácidos não naturais são por exemplo divulgados em Xie J e Schultz P. G., Current Opinion in Chemical Biology (2005), 9: 548-554, e Wang Q. *et al*., Chemistry & Biology (2009), 16: 323-336.

[00112] Em uma forma de realização, os aminoácidos são aminoácidos naturais.

[00113] Em uma forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica não tem mais do que uma substituição de aminoácido na região CH3, e a segunda proteína homodimérica não tem mais do que uma substituição de aminoácido na região CH3 em relação às regiões CH3 do tipo selvagem.

[00114] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição

selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409, e em que a dita primeira proteína homodimérica e a dita segunda proteína homodimérica não são substituídas nas mesmas posições.

[00115] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 366, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 368, 370, 399, 405, 407 e 409. Em uma forma de realização o aminoácido na posição 366 é selecionado de Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, Glu e Gly.

[00116] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 368, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 370, 399, 405, 407 e 409.

[00117] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 370, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 399, 405, 407 e 409.

[00118] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 399, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 405, 407 e 409.

[00119] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 405, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 407 e 409.

[00120] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 407, e a dita

segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405, e 409.

[00121] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido na posição 409, e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405, e 407.

[00122] Consequentemente, em uma forma de realização, as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 contêm mutações assimétricas, isto é mutações em posições diferentes nas duas regiões CH3, por exemplo uma mutação na posição 405 em uma das regiões CH3 e uma mutação na posição 409 em outra região CH3.

[00123] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405 e 407.

[00124] Em uma tal forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Phe na posição 405. Em uma outra forma de realização desta, a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Phe, Arg ou Gly na posição 405.

[00125] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um aminoácido outro que não Phe na posição 405 e um Lys na posição 409. Em uma outra forma de realização desta, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Phe na posição 405 e um

aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um aminoácido outro que não Phe, Arg ou Gly na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00126] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409. Em uma outra forma de realização desta, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um aminoácido outro que não Phe, Arg ou Gly na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00127] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00128] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00129] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00130] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00131] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na

posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00132] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00133] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Thr na posição 350, um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00134] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica compreende um Thr na posição 350, um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica compreende um Ile na posição 350, um Thr na posição 370, um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00135] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407.

[00136] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407.

[00137] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição

409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407.

[00138] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um Tyr na posição 407 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00139] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um Tyr na posição 407 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00140] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um Tyr na posição 407 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00141] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00142] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00143] Em uma outra forma de realização, a dita primeira proteína homodimérica tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem um Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00144] Em uma forma de realização, a primeira proteína

homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409, e a segunda proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Phe, Leu e Met na posição 368, ou

(i) um Trp na posição 370, ou

(ii) um aminoácido outro que não Asp, Cys, Pro, Glu ou Gln na posição 399.

[00145] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem um Arg, Ala, His ou Gly na posição 409, e a segunda proteína homodimérica tem um Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, ou Trp na posição 368, ou

(i) um Trp na posição 370, ou

(ii) um Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg ou Tyr na posição 399.

[00146] Em uma forma de realização, a primeira proteína homodimérica tem um Arg na posição 409, e a segunda proteína homodimérica tem

(i) um Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Trp na posição 370, ou

(iii) um Phe, His, Lys, Arg ou Tyr na posição 399.

[00147] Além das substituições de aminoácido especificadas acima, as ditas primeira e segunda proteínas homodiméricas podem conter outras substituições, deleções ou inserções de aminoácido em relação às sequências Fc do tipo selvagem.

[00148] Em uma outra forma de realização, as ditas primeira e segunda regiões CH3, exceto para as mutações especificadas, compreendem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 1 (IgG1m(a)):

SEQ ID NO: 1:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

[00149] Em uma outra forma de realização, as ditas primeira e segunda regiões CH3, exceto para as mutações especificadas, compreendem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 2 (IgG1m(f)):

SEQ ID NO: 2:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

[00150] Em uma outra forma de realização, as ditas primeira e segunda regiões CH3, exceto para as mutações especificadas, compreendem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 3 (IgG1m(ax)):

SEQ ID NO: 3:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHN
HYTQKSLSLSPGK

[00151] Em uma outra formas de realização, as proteínas homodiméricas fornecidas podem ser um anticorpo de rato e um anticorpo de camundongo, que mostram emparelhamento preferencial, como descrito por Lindhofer *et al*. (1995) J Immunol 155: 219 (ver acima), ou os chamados anticorpos variantes *knob-in-hole*, como descrito nas Patentes US 5.731.168 (ver acima). Em alguns casos, entretanto, a última das proteínas de partida homodiméricas pode ser mais difícil de produzir, por causa das interações CH3-CH3 homodiméricas muito fracas. Assim, as variantes aqui descritas tendo mutações nas posições 350, 370, 405 e 409, podem ser preferidas.

[00152] A sequência da região de articulação das proteínas de partida homodiméricas podem variar. Entretanto, a proteína heterodimérica resultante pode ser mais estável sob algumas circunstâncias se a região de articulação não é equivalente a IgG4, e, preferivelmente é equivalente a IgG1.

[00153] Assim, em uma forma de realização, nem a dita primeira nem a dita segunda proteína homodimérica compreende uma sequência Cys-Pro-Ser-Cys na região de articulação (núcleo).

[00154] Em uma outra forma de realização, tanto a dita primeira quanto a dita segunda proteína homodimérica compreendem uma sequência Cys-Pro-Pro-Cys na região de articulação (núcleo).

[00155] Em muitas formas de realização em que a primeira e a dita segunda proteína homodiméricas são anticorpos, os ditos anticorpos compreendem adicionalmente uma cadeia leve. Como explicado acima, as ditas cadeias leves podem ser diferentes, isto é diferem na sequência e cada um forma um domínio de ligação de antígeno funcional com apenas uma das cadeias pesadas. Em uma outra forma de realização, entretanto, as ditas primeira e segunda proteínas homodiméricas são anticorpos de cadeia pesada, que não precisam de uma cadeia leve para a ligação de antígeno, ver por exemplo Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446.

[00156] Como descrito acima, a etapa c) do método da invenção compreende incubar a dita primeira proteína junto com a dita segunda proteína sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização da ligação de dissulfeto. Os exemplos de condições adequadas são dadas aqui. As exigências mínimas para as cisteínas na região de articulação para sofrer a isomerização da ligação de dissulfeto pode diferir dependendo das proteínas de partida homodiméricas, em particular dependendo da sequência exata na região de articulação. É importante que as respectivas interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3 sejam suficientemente fracas para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização da ligação de dissulfeto sob as condições dadas.

[00157] Em uma forma de realização, as condições redutoras na etapa c) compreendem a adição de um agente redutor, por exemplo um agente

redutor selecionado do grupo que consiste de: 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutationa, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína e beta-mercapto-etanol, preferivelmente um agente redutor selecionado do grupo que consiste de: 2-mercaptoetilamina, ditiotreitol e tris(2-carboxietil)fosfina.

[00158] Em uma forma de realização, as condições redutoras que permitem a troca controlada do ramo Fab são descritas em termos do potencial de redox requerido. A tripeptídeo glutationa (GSH) é o tiol de peso molecular baixo principal nas células e controla o estado de redox do tiol-dissulfeto que é essencial para a sinalização de redox normal *in vivo*. As dinâmicas de equilíbrio do redox celular são obtidas pela manutenção da situação do tiol-para-dissulfeto de GSH reduzido e a sua forma oxidada GSSG. Os valores para a redução potencial podem ser medidos como em Rost e Rapoport, Nature 201: 185 (1964) e Aslund *et al*., J. Biol. Chem. 272: 30780-30786 (1997). O potencial redox E_h, que leva em consideração a estequiometria de dois GSH oxidados por GSSG é uma medida quantitativa para o estado redox. E_h é calculado pela equação de Nernst: $E_h = E_o + (RT/nF)\ln([GSSG\ (ox)]/[GSH\ (red)]^2)$. Eo é o potencial padrão para o par de redox no pH definido, R é a constante gasosa, T é a temperatura absoluta, F é a constante de Faraday e n é o número de elétrons transferidos. As estimativas *in vivo* para Eh para o par GSH/GSSG estão na faixa de -260 a -200 mV (Aw, T., News Physiol. Sci. 18: 201-204 (2003)). As células terminalmente diferenciadas mantém deste modo um Eh da ordem de -200 mV, ao passo que as células que proliferam ativamente mantém um Eh mais reduzido de aproximadamente -260 mV.

[00159] O potencial redox padrão para DTT é de -330 mV (Cleland *et al*. Biochemistry 3: 480-482 (1964)). TCEP foi mostrado reduzir DTT em solução e portanto tem um potencial redox mais negativo do que DTT. O valor exato entretanto não foi relatado. As condições redutoras que

possibilitam a troca controlada das condições do ramo Fab podem ser portanto descritas em termos de um potencial redox Eh requerido, que está idealmente abaixo do valor que é obtido sob condições plasmáticas normais *in vivo* e que está acima do potencial redox que reduz as ligações de dissulfeto do anticorpo fora daquelas localizadas na região de articulação e envolvidas na formação da ligação de dissulfeto intercadeia pesada.

[00160] Assim, em uma outra forma de realização, a etapa c) é realizada sob condições redutoras com um potencial redox variando abaixo de -50 mV, tal como abaixo de -150 mV, preferivelmente entre -150 e -600 mV, tal como entre -200 e -500 mV, mais preferivelmente entre -250 e -450 mV, tal como entre -250 e -400 mV, ainda mais preferivelmente entre -260 e -300 mV.

[00161] Em uma outra forma de realização, a etapa c) compreende a incubação por pelo menos 90 min em uma temperatura de pelo menos 20°C na presença de pelo menos 25 mM de 2-mercaptoetilamina ou na presença de pelo menos 0,5 mM de ditiotreitol. A incubação pode ser realizada em um pH de 5 a 8, tal como no pH 7,0 ou no pH 7,4.

[00162] Em uma outra forma de realização, a etapa d) compreende restaurar as condições para que se tornem não redutoras ou menos redutoras, por exemplo pela remoção de um agente redutor, por exemplo pela dessalinização.

[00163] Em algumas formas de realização, o método da invenção produz um produto de anticorpo em que mais do que 80 %, tal como mais do que 90 %, por exemplo mais do que 95 %, tal como mais do que 99 % das moléculas de anticorpo são os anticorpos biespecíficos desejados.

[00164] A pós-produção é mais flexível e mais fácil de controlar comparado com os métodos da técnica anterior com base na coexpressão.

[00165] A natureza da pós-produção de fabricar anticorpos biespecíficos pela troca de Fab sob condições redutoras (tal como pela adição

de 2-MEA) como aqui divulgado a torna uma estratégia altamente adequada para a triagem (de alto rendimento) de combinações múltiplas de especificidades para a descoberta de anticorpo biespecífico. Além disso, o processo *in vitro* pode ser realizado no laboratório que possibilita maior controle, flexibilidade e rendimento da proteína heterodimérica do que é permitido pela coexpressão. Uma vantagem adicional desta estratégia é que a triagem pode ser feita no formato de produtos terapêuticos finais, eliminando a necessidade quanto ao engenheiramento na seleção inicial.

[00166] Como explicado acima, em um outro aspecto, o método da invenção pode ser usado para a triagem de "matriz", isto é para gerar um grande número de combinações diferentes de especificidades de ligação com base em dois conjuntos de anticorpos, um conjunto tendo as primeiras regiões de CH3 idênticas e o outro conjunto tendo regiões CH3 secundárias idênticas, em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3.

[00167] Assim, em uma forma de realização a invenção diz respeito a um método para a seleção de um proteína heterodimérica tendo uma propriedade desejada, o dito método compreendendo as etapas de:

a) fornecer um primeiro conjunto de proteínas homodiméricas que compreende uma região Fc em que as proteínas homodiméricas têm as primeiras regiões de CH3 idênticas,

b) fornecer um segundo conjunto de proteínas homodiméricas que compreende uma região Fc em que as proteínas homodiméricas têm regiões CH3 secundárias idênticas,

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das

interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubar as combinações das proteínas homodiméricas do dito primeiro conjunto e do dito segundo conjunto sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, gerando assim um conjunto de anticorpos biespecíficos,

d) opcionalmente restaurar as condições para não redutoras,

e) ensaiar o conjunto resultante de proteínas heterodiméricas quanto a uma dada propriedade desejada, e

f) selecionar uma proteína heterodimérica tendo a propriedade desejada.

[00168] Em uma forma de realização, a invenção diz respeito a um método para a seleção de um anticorpo biespecífico tendo uma propriedade desejada, o dito método compreendendo as etapas de:

a) fornecer um primeiro conjunto de anticorpos homodiméricos que compreende anticorpos com regiões variáveis diferentes, em que os ditos anticorpos do dito primeiro conjunto compreendem as primeiras regiões de CH3 idênticas,

b) fornecer um segundo conjunto de anticorpos homodiméricos que compreende anticorpos com regiões variáveis diferentes ou regiões variáveis idênticas, em que os ditos anticorpos do dito segundo conjunto compreendem regiões CH3 secundárias idênticas,

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubar combinações de anticorpos do dito primeiro conjunto e

do dito segundo conjunto sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, gerando assim um conjunto de anticorpos biespecíficos,

d) opcionalmente restaurar as condições para não redutoras,

e) ensaiar o conjunto de anticorpos biespecíficos resultantes quanto a uma dada propriedade desejada, e

f) selecionar um anticorpo biespecífico tendo a propriedade desejada.

[00169] Em uma forma de realização, os anticorpos homodiméricos do segundo conjunto têm regiões variáveis diferentes.

[00170] Em uma forma de realização, os anticorpos homodiméricos do segundo conjunto têm regiões variáveis idênticas, mas têm aminoácidos diferentes ou variações estruturais fora da região de ligação de antígeno.

[00171] Os dois conjuntos podem ser compostos de muitos modos diferentes como desejado. Assim, os dois conjuntos podem alvejar o mesmo epítopo ou epítopos diferentes no mesmo antígeno. Os dois conjuntos também podem alvejar antígenos diferentes, e cada conjunto pode conter ligação de anticorpos para o mesmo epítopo ou epítopos diferentes no antígeno em questão. Além disso, um dos conjuntos ou ambos os conjuntos podem cada um conter anticorpos que alvejam antígenos diferentes.

[00172] Em uma outra forma de realização, a dita propriedade desejada é a morte de célula, lise de célula, inibição da proliferação da célula, ou ligação às células que expressam ambos os alvos de antígeno.

[00173] A estratégia de triagem inclui dois paineis de vetores de anticorpo que contém uma faixa de especificidades, onde um painel é clonado em uma cadeia principal que é capaz de engrenar, na troca do ramo Fab sob condições redutoras (tal como pela adição de 2-MEA), com a cadeia principal do segundo painel. Por exemplo, o primeiro painel é clonado em uma cadeia

principal de IgG1-F405L e o segundo painel é clonado em uma cadeia principal de IgG1-K409R (para outra combinação de cadeia principal possível ver também os exemplos 19, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 38, e 39).

[00174] Cada membro dos dois paineis de vetores de anticorpo é depois expressado individualmente em escala pequena. Por exemplo, todos os vetores de anticorpo são transfectados transitoriamente em células HEK293 e expressados em culturas de 2,3 ml em placas de 24 reservatórios. Alternativamente, outros sistemas de produção adequados (pequena escala) conhecidos na técnica podem ser usados.

[00175] Os anticorpos expressados dos dois paineis de anticorpos são depois misturados aos pares em uma maneira equivalente à matriz em razões equimolares. Por exemplo, todos os anticorpos individuais são purificados pela cromatografia em proteína A em escala pequena e a concentração de anticorpo são medidas pela absorbância em um comprimento de onda de 280 nm. Outros métodos de purificação adequados (escala pequena) ou métodos para determinar a concentração de proteína conhecida na técnica podem ser alternativamente usados. Em uma outra forma de realização, a etapa de purificação pode ser pulada se aplicações a jusante não são afetadas pelo meio de expressão. Depois disso, as concentrações de anticorpo são normalizadas de modo que um volume adequado contém quantidades equimolares de ambos os anticorpos. Por exemplo, um painel de 8 anticorpos na cadeia principal F405L é individualmente misturada com 8 anticorpos na cadeia principal de K409R de modo que 64 misturas de 100 µl contenham 80 µg/ml de anticorpo A (F405L) e 80 µg/ml de anticorpo B (K409R). Alternativamente, se a estratégia contém uma etapa de purificação de anticorpo biespecífico-específico a jusante, a etapa para normalizar as quantidades de anticorpo pode ser pulada.

[00176] Às misturas de anticorpos, uma quantidade adequada de agente redutor é adicionada e incubada por um período adequado de tempo em uma

temperatura permissível. Por exemplo, a 100 µl contendo 80 µg/ml de anticorpo A (F405L) e 80 µg/ml de anticorpo B (K409R), 25 µl de 2-MEA a 125 mM são adicionados (concentração final de 2-MEA 25 mM) e incubados durante a noite a 25°C.

[00177] O agente redutor é em seguida removido das misturas (agora contendo anticorpos biespecíficos) para promover a oxidação das ligações de dissulfeto e para evitar interferência do agente redutor nos ensaios de triagem. Por exemplo, 2-MEA é removido realizando-se uma troca de tampão das 64 misturas usando placas de dessalinização de 96 reservatórios Zeba Spin (Pierce Biotechnology, #89807). Alternativamente, outros métodos adequados para remover o agente redutor conhecido na técnica podem ser usados.

[00178] Os anticorpos biespecíficos são depois caracterizados bioquímica ou funcionalmente para identificar os candidatos principais. Por exemplo, os 64 anticorpos biespecíficos são avaliados quanto à inibição da proliferação de linhagens de célula adequadas ou ligação às linhagens de célula adequada. Os candidatos principais identificados serão depois produzidos em larga escala e caracterizados em mais detalhes.

Produção pela coexpressão

[00179] As proteínas heterodiméricas da invenção também podem ser obtidas pela coexpressão de construções que codificam o primeiro e segundo polipeptídeos em uma única célula.

[00180] Assim, em um outro aspecto, a invenção diz respeito a um método para produzir uma proteína heterodimérica, o dito método compreendendo as seguintes etapas:

a) fornecer uma primeira construção de ácido nucleico que codifica um primeiro polipeptídeo que compreende uma primeira região Fc de uma imunoglobulina, a dita primeira região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

b) fornecer uma segunda construção de ácido nucleico que

codifica um segundo polipeptídeo que compreende uma segunda região Fc de uma imunoglobulina, a dita segunda região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

[00181] em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3, e

em que a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405 e 407.

e/ou

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que as constantes de dissociação de interações homodiméricas de cada uma das regiões CH3 estão entre 0,01 e 10 micromolares, tal como entre 0,05 e 10 micromolares, mais preferivelmente entre 0,01 e 5, tal como entre 0,05 e 5 micromolares, ainda mais preferivelmente entre 0,01 e 1 micromolar, tal como entre 0,05 e 1 micromolar, entre 0,01 e 0,5 ou entre 0,01 e 0,1 quando ensaiada como descrito no Exemplo 21.

c) coexpressar as ditas primeira e segunda construções de ácido nucleico em uma célula hospedeira, e

d) obter a dita proteína heterodimérica a partir da cultura de célula.

[00182] Os vetores de expressão adequados, incluindo promotores, realçadores, etc., e células hospedeiras adequadas para a produção de anticorpos são bem conhecidos na técnica. Os exemplos de células hospedeiras incluem células de levedura, bacterianas e de mamífero, tais

como células CHO ou HEK.

[00183] Em uma forma de realização deste método, a dita primeira região CH3 tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido outro que não Phe na posição 405.

e/ou

as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que as constantes de dissociação de interações homodiméricas de cada uma das regiões CH3 estão entre 0,01 e 10 micromolares, tal como entre 0,05 e 10 micromolares, mais preferivelmente entre 0,01 e 5, tal como entre 0,05 e 5 micromolares, ainda mais preferivelmente entre 0,01 e 1 micromolar, tal como entre 0,05 e 1 micromolar, entre 0,01 e 0,5 ou entre 0,01 e 0,1 quando ensaiadas como descrito no Exemplo 21.

[00184] Em uma outra forma de realização deste método:

a dita primeira região CH3 tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido outro que não Phe na posição 405, tal como outro que não Phe, Arg ou Gly na posição 405

ou

a dita primeira região CH3 tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido outro que não Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407.

[00185] Em algumas formas de realização, os ditos primeiro e segundo polipeptídeos são cadeias pesadas de comprimento total de dois anticorpos que ligam epítopos diferentes (isto é as ditas primeira e segunda construções de ácido nucleico codificam cadeias pesadas de comprimento total de dois anticorpos que ligam epítopos diferentes), e assim a proteína heterodimérica é um anticorpo biespecífico. Este anticorpo biespecífico pode ser um anticorpo

de cadeia pesada, ou a dita célula hospedeira pode expressar ainda uma ou mais construções de ácidos nucleicos que codificam uma cadeia leve. Se apenas uma construção de cadeia leve é coexpressada com as construções de cadeia pesada, então apenas um anticorpo biespecífico funcional é formado se a sequência de cadeia leve é tal que a mesma possa formar um domínio de ligação de antígeno funcional com cada uma das cadeias pesadas. Se duas ou mais construções de cadeia leve diferentes são coexpressadas com a cadeia pesada, produtos múltiplos serão formados.

[00186] Em outras formas de realização, o método da coexpressão de acordo com a invenção compreende qualquer uma das outras características descritas sob o método *in vitro* acima.

[00187] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a um vetor de expressão que compreende a primeira e segunda construções de ácido nucleico especificadas aqui acima. Ainda em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma célula hospedeira que compreende a primeira e segunda construções de ácido nucleico especificadas aqui acima.

Proteínas heterodiméricas

[00188] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma proteína heterodimérica obtida ou obtenível pelo método da invenção.

[00189] Além disso, o método da invenção possibilita a formação de moléculas assimétricas, moléculas com características diferentes em cada uma dos ramos Fab ou em cada um dos domínios CH3 ou moléculas com modificações distintas por toda a molécula, por exemplo moléculas com substituição(ões) de aminoácido não natural(is) para conjugação. Tais moléculas assimétricas podem ser geradas em quaisquer combinações adequadas. Isto é ilustrado mais abaixo por alguns exemplos não limitantes.

[00190] Os anticorpos biespecíficos podem ser usados para pré-alvejar uma célula alvo de interesse, incluindo mas não limitado a, uma célula de tumor. O pré-alvejamento de uma célula alvo pode ser usado para estudos de

formação de imagem ou para propósitos imunoterapêuticos.

[00191] Em uma forma de realização do método da invenção, o primeiro ramo Fab da molécula biespecífica se liga a uma célula de tumor, tal como uma proteína da superfície da célula de tumor ou carboidrato da superfície da célula de tumor, tal como uma das proteínas da superfície da célula de tumor aqui listada e o segundo ramo Fab reconhece uma molécula efetora radioativa incluindo mas não limitado a, um radiorrótulo acoplado ou ligado (via um quelador) a um peptídeo ou hapteno. Um exemplo de tal peptídeo radiorrotulado é o ácido dietilenotriaminopentaacético rotulado com índio (anti-DTPA(In) van Schaijk *et al*. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 7230s-7126s). Um outro exemplo é usar partículas coloidais rotuladas com hapteno tais como lipossomas, nanopartículas de radionuclídeos que carregam micelas poliméricas tais como por exemplo tecnécio-99 (Jestin *et al*. Q J Nucl Med Mol Imaging 2007; 51: 51-60).

[00192] Em uma outra forma de realização, uma molécula citostática alternativa ligada a hapteno tal como uma toxina é usada.

[00193] Em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro ramo Fab da molécula biespecífica é glicosilado na posição N297 (numeração EU) e o segundo ramo Fab da molécula biespecífica é aglicosilado (não glicosilado por exemplo pela mutação de N297 para Q ou mutação A ou E (Bolt S *et al*., Eur J Immunol 1993, 23: 403-411)). A glicosilação assimétrica na região Fc impacta a interação para receptores Fcγ e tem impacto sobre o efeito de citotoxicidade de célula dependente de anticorpo do anticorpo (Ha *et al*., Glycobiology 5 de abril de 2011) assim como interação com outras moléculas funcionais efetoras tais como C1q.

[00194] Em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro ramo Fab da molécula biespecífica interage com FcRn, o receptor de Fc neonatal (Roopenian DC, *et al*. Nat. Rev. Immunol. 2007, 7: 715-725) e o segundo ramo Fab é prejudicado na ligação a FcRn pela mutação do sítio de

interação FcRn nas moléculas por exemplo fazendo-se uma mutação H435A (Shields, R. L., *et al*, J Biol Chem, 2001, Firan, M., *et al*, Int Immunol, 2001).

[00195] Em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro ramo Fab da molécula biespecífica interage com a proteína A estafilocócica (proteína A, Deisenhofer *et al*, Biochemistry 20, 2361-2370 (1981) e proteína G estreptocócica (proteína G, Derrick *et al*., Nature 359, 752-754 (1992), frequentemente usado para a purificação de anticorpos, e o segundo ramo Fab de moléculas biespecíficas é prejudicada na interação com proteína A de G. Como um resultado, a remoção de quantidades residuais de homodímero com ligação de proteína A ou G prejudicada depois a troca em heterodímero é facilmente obtida pela purificação da molécula biespecífica com proteína A ou G.

[00196] Em uma outra forma de realização, a ligação aos receptores de Fcγ ou FcRn é melhorada ou diminuída em um dos dois ramos de Fab da molécula biespecífica.

[00197] Em uma outra forma de realização, a ligação a C1q é melhorada ou diminuída em um dos dois ramos de Fab da molécula biespecífica.

[00198] Em uma outra forma de realização, a proteína foi engendrada para realçar a ativação de complemento em um ou ambos dos dois ramos de Fab da molécula.

[00199] Em uma outra forma de realização, cada um dos ramos de Fab presentes na molécula biespecífica é derivado de uma subclasse de IgG diferente.

[00200] Em uma outra forma de realização, cada um dos ramos de Fab presentes na molécula biespecífica carrega mutações alotípicas diferentes (Jefferis & Lefranc, 2009, MABs 1: 332-8).

[00201] Em uma outra forma de realização, uma outra categoria das moléculas imunoterapêuticas assimétricas é gerada pela substituição do Fab

de um dos ramos de Fab da molécula biespecífica por uma citocina imuno ativa, estimuladora ou inibidora. Os exemplos não limitantes de tais citocinas são IL-2, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TNF-α, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, IL-13. Alternativamente, um fator (de crescimento) ou agente estimulador ou inibidor de hormônio é incluído nas moléculas.

[00202] Em uma outra forma de realização, um Fab de um dos ramos Fab é substituído por um peptídeo lítico, isto é peptídeos que são capazes para lisar as células de tumor, bactérias, fungos etc, incluindo mas não limitado aos peptídeos antimicrobianos como magainina, melitina, cecropina, KLAKKLAK e variantes destes (Schweizer *et al*. Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194, Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113, Marks *et al*, Cancer Res 2005; 65: 2373-2377, Rege *et al*, Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375) ou peptídeos líticos catiônicos (tecnologia CLYP, US2009/0269341).

[00203] Em uma outra forma de realização, um ou ambos dos Fabs nos ramos de Fab são substituídos pelos receptores para citocinas e/ou fatores de crescimento, criando os chamados receptores isca, dos quais Enbrel® (etanercept) que alveja TNF-α e aprisiona VEGF, alvejando VEGF, são exemplos bem conhecidos. Combinando estes dois receptores isca em uma molécula mostrou atividade superior em relação aos receptores isca simples (Jung, J. Biol. Chem. 2011; 286: 14410-14418).

[00204] Em uma outra forma de realização, uma outra categoria de moléculas imunoterapêuticas assimétricas é gerada pela fusão de citocinas imunoativas, -estimuladoras ou -inibidoras ao terminal N ou terminal C de um, ou ambos, dos ramos Fab presentes nas moléculas biespecíficas. Isto pode positivamente impactar a atividade antitumor da molécula biespecífica. Os exemplos de tais moléculas, entretanto não são limitados à lista abaixo, são IL-2 (Fournier *et al*., 2011, Int. J. Oncology, doi: 10.3892/ijo.2011.976), IFN-α, IFN-β ou IFN-γ (Huan *et al*., 2007; J. Immunol. 179: 6881-6888, Rossie *et al*., 2009; Blood 114: 3864-3871), TNF-α. Alternativamente, a

fusão de terminal N ou terminal C de citocinas, tais como por exemplo G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, ou IL-13 pode positivamente impactar a função efetora biespecífica da molécula de anticorpo. Alternativamente um fator (de crescimento) ou agente estimulador ou inibidor de hormônio é incluído mas moléculas no terminal N ou terminal C.

[00205] Em uma outra forma de realização, a fusão no terminal N ou terminal C de um peptídeo lítico, tal como por exemplo peptídeos antimicrobianos como magainina, melitina, cecropina, KLAKKLAK e variantes destes (Schweizer *et al*. Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194, Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113, Marks *et al*, Cancer Res 2005; 65: 2373-2377, Rege *et al*, Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375) ou peptídeos líticos catiônicos (tecnologia CLYP, US2009/0269341) em um ou ambos dos ramos Fab pode realçar a atividade da molécula.

[00206] Em uma outra forma de realização, uma outra categoria de moléculas imunoterapêuticas assimétricas é de anticorpos monovalentes, moléculas que interagem com um ramo Fab ao alvo de escolha. Em tal molécula um dos ramos Fab presentes na molécula biespecífica é direcionada contra a molécula alvo de escolha, o segundo ramo Fab da molécula não carrega um Fab ou tem um Fab não ligador /não funcional tal como descrito para MetMab (Genentech; WO 96/38557). Alternativamente, as proteínas de fusão de Fc monoméricas tais como aquelas descritas para os Fatores VIII e IX (Peters *et al*., Blood 2010; 115: 2057-2064) podem ser geradas.

[00207] Alternativamente, as combinações de qualquer uma das moléculas assimétricas mencionadas acima podem ser geradas pelo método da invenção.

[00208] Ainda em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma proteína heterodimérica que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende uma primeira região Fc de uma imunoglobulina, a dita primeira região Fc compreendendo uma primeira região CH3, e um segundo

polipeptídeo compreendendo uma segunda região Fc de uma imunoglobulina, a dita segunda região Fc compreendendo uma segunda região CH3, em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3, e

em que a dita primeira proteína homodimérica tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda proteína homodimérica tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste de: 366, 368, 370, 399, 405 e 407

e/ou

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que as constantes de dissociação das interações homodiméricas de cada uma das regiões CH3 estão entre 0,01 e 10 micromolares, tal como entre 0,05 e 10 micromolares, mais preferivelmente entre 0,01 e 5, tal como entre 0,05 e 5 micromolares, ainda mais preferivelmente entre 0,01 e 1 micromolar, tal como entre 0,05 e 1 micromolar, entre 0,01 e 0,5 ou entre 0,01 e 0,1 quando ensaiadas como descrito no Exemplo 21.

[00209] Em uma forma de realização, a dita primeira região CH3 tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido outro que não Phe na posição 405

e/ou

as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que as constantes de dissociação das interações homodiméricas de cada uma das regiões CH3 estão entre 0,01 e 10 micromolares, tal como entre 0,05 e 10 micromolares, mais preferivelmente entre 0,01 e 5, tal como entre 0,05 e 5 micromolares, ainda mais preferivelmente entre 0,01 e 1 micromolar, tal

como entre 0,05 e 1 micromolar, entre 0,01 e 0,5 ou entre 0,01 e 0,1 quando ensaiadas como descrito no Exemplo 21.

[00210] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica

a dita primeira região CH3 tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido outro que não Phe na posição 405, tal como outros que não Phe, Arg ou Gly, na posição 405

ou

a dita primeira região CH3 tem um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido outro que não Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407.

[00211] Em outras formas de realização, a proteína heterodimérica de acordo com a invenção compreende qualquer uma das outras características descritas acima para os métodos de produção.

[00212] Assim, em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, o dito primeiro polipeptídeo é uma cadeia pesada de comprimento total de um anticorpo, preferivelmente um anticorpo humano.

[00213] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, o dito segundo polipeptídeo é uma cadeia pesada de comprimento total de um anticorpo, preferivelmente um anticorpo humano.

[00214] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, os ditos primeiro e segundo polipeptídeos são ambos cadeias pesadas de comprimento total de dois anticorpos, preferivelmente ambos anticorpos humanos que ligam epítopos diferentes, e assim a proteína heterodimérica resultante é um anticorpo biespecífico. Este anticorpo biespecífico pode ser um anticorpo de cadeia pesada, ou um anticorpo que além das cadeias pesadas compreende duas cadeias leves de comprimento

total, que pode ser idênticas ou diferentes.

[00215] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a região Fc do primeiro polipeptídeo é de um isótipo selecionado do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (exceto para as mutações especificadas) e a região Fc do segundo polipeptídeo é de um isótipo selecionado do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (exceto para as mutações especificadas).

[00216] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, as regiões Fc tanto do dito primeiro quanto do dito segundo polipeptídeos são do isótipo IgG1.

[00217] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, uma das regiões Fc dos ditos polipeptídeos é do isótipo IgG1 e a outra do isótipo IgG4.

[00218] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a força aumentada da interação heterodimérica quando comparada a cada uma das interações homodiméricas é devido às modificações CH3 outras que não a introdução de ligações covalentes, resíduos de cisteína ou resíduos carregados.

[00219] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a interação heterodimérica entre os ditos primeiro e segundo polipeptídeos na proteína heterodimérica é tal que nenhuma troca na ramificação Fab pode ocorrer em GSH 0,5 mM sob as condições descritas no Exemplo 13.

[00220] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a interação heterodimérica entre os ditos primeiro e segundo polipeptídeos na proteína heterodimérica resultante é tal que nenhuma troca na ramificação Fab ocorre *in vivo* em camundongos sob as condições descritas no Exemplo 14.

[00221] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica

da invenção, a dita primeira região CH3 compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um aminoácido outro que não Phe na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00222] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a dita primeira região CH3 compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00223] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a dita primeira região CH3 compreende Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00224] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a dita primeira região CH3 compreende um aminoácido outro que não Lys, Leu ou Met na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00225] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a dita primeira região CH3 compreende um Arg na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00226] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a dita primeira região CH3 compreende um Thr na posição 350, um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00227] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, a dita primeira região CH3 compreende um Thr na posição 350, um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a dita segunda região CH3 compreende um Ile na posição 350, um Thr na posição 370, um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00228] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, nem o dito primeiro nem o dito segundo polipeptídeos compreende uma sequência Cys-Pro-Ser-Cys na região de articulação.

[00229] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, tanto o dito primeiro quanto o dito segundo polipeptídeos compreendem uma sequência Cys-Pro-Pro-Cys na região de articulação.

[00230] Em uma outra forma de realização da proteína heterodimérica da invenção, o dito primeiro e/ou o dito segundo polipeptídeos compreendem uma mutação que remove o sítio aceitador para a glicosilação ligada a Asn.

Antígenos alvo

[00231] Como explicado acima, em uma forma de realização importante da invenção, a proteína heterodimérica é um anticorpo biespecífico que compreende duas regiões variáveis que diferem na especificidade de ligação, isto é ligam epítopos diferentes.

[00232] Em princípio, qualquer combinação de especificidades é possível. Como mencionado acima, os anticorpos biespecíficos podem ser potencialmente usados para superar algumas das limitações dos anticorpos monoespecíficos. Uma limitação possível de um anticorpo monoespecífico é uma falta de especificidade para as células alvo desejadas devido à expressão do antígeno alvo em outros tipos de célula para os quais nenhuma ligação de anticorpo é desejada. Por exemplo, um antígeno alvo super expressado nas células de tumor também pode ser expressado em tecidos saudáveis que podem resultar em efeitos colaterais indesejados no tratamento com um anticorpo direcionado contra este antígeno. Um anticorpo biespecífico tendo

uma outra especificidade contra uma proteína que é exclusivamente expressada no tipo de célula alvo potencialmente melhoraria a ligação específica às células de tumor.

[00233] Assim, em uma forma de realização da invenção, os ditos primeiro e segundo epítopos são localizados na mesma célula, por exemplo, uma célula de tumor. Os alvos adequados nas células de tumor incluem, mas não são limitados aos seguintes: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de envelope HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFrvIII, L1-CAM, AXL, Fator de tecido (TF), CD74, EpCAM e MRP3. As combinações possíveis de alvos de célula de tumor incluem, mas não são limitados a: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

[00234] Em uma outra forma de realização, os ditos primeiro e segundo epítopos podem estar localizados no mesmo antígeno alvo, em que a localização dos dois epítopos no antígeno alvo é tal que a ligação de um anticorpo para um epítopo não interfere com a ligação do anticorpo ao outro epítopo. Em uma outra forma de realização desta, as ditas primeira e segunda proteínas homodiméricas são anticorpos que se ligam a dois epítopos diferentes localizados no mesmo antígeno alvo, mas tem um modo de ação diferente para matar a célula alvo, por exemplo, uma célula de tumor. Por exemplo, em uma forma de realização, o antígeno alvo é erbB2 (HER2) e o anticorpo biespecífico combina os sítios de ligação de antígeno pertuzumab e trastuzumab. Em uma outra forma de realização, o antígeno alvo é erbB1 (EGFr) e o anticorpo biespecífico combina os sítios de ligação de antígeno zalutumumab e nimotuzumab.

[00235] Os anticorpos biespecíficos também podem ser usados como mediadores para realvejar mecanismos efetores para tecidos associados com doença, por exemplo, tumores. Assim, em uma outra forma de realização, o dito primeiro ou o dito segundo epítopos estão localizados em uma célula de tumor, tal como uma proteína de célula de tumor ou carboidrato de célula de tumor, e o outro epítopo está localizado em uma célula efetora.

[00236] Em uma forma de realização, a célula efetora é uma célula T.

[00237] Os alvos possíveis nas células efetoras incluem os seguintes: FcgamaRI (CD64): expressado em monócitos e macrófagos e neutrófilos ativados; FcgamaRIII (CD16): expressado em matadora natural e macrófagos; CD3: expressado nas células T circulantes; CD89: expressado no PMN (neutrófilos polimorfonucleares), eosinófilos, monócitos e macrófagos; CD32a: expressado nos macrófagos, neutrófilos, eosinófilos; FcεRI expressado em basófilo e mastoides. Em uma forma de realização o epítopo está localizado no CD3 expressado nas células T.

[00238] Em uma outra forma de realização, o primeiro anticorpo tem especificidade de ligação para um microorganismo patogênico e o segundo anticorpo tem especificidade de ligação para uma proteína de célula efetora, tal como CD3, CD4, CD8, CD40, CD25, CD28, CD16, CD89, CD32, CD64, FcεRI ou CD1.

[00239] Além disso, os anticorpos biespecíficos podem ser usados para alvejar um agente quimioterapêutico mais especificamente nas células nas quais o agente deve atuar. Assim, em uma forma de realização, uma das proteínas homodiméricas é um anticorpo que reconhece uma molécula pequena ou peptídeo, ou é capaz de formar uma ligação covalente com uma tal molécula, por exemplo, de acordo com o princípio descrito em Rader *et al*, (2003) PNAS 100: 5396. Em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro anticorpo tem especificidade de ligação para (isto é se liga a um epítopo em) uma célula de tumor ou proteína da superfície da célula

de tumor, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, EGFR3vIII, CEA, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, EPCAM, c-Met, AXL, L1-CAM, Fator de tecido, CD74 ou CXCR5 e o segundo anticorpo tem uma especificidade de ligação para um agente quimioterapêutico, tal como uma toxina (incluindo um peptídeo radiorrotulado), um medicamento ou um pró-medicamento.

[00240] Os anticorpos biespecíficos também podem ser usados para alvejar uma vesícula, por exemplo, uma vesícula densa em elétron, ou minicélula que contém uma toxina, medicamento ou pró-medicamento a um tumor. Ver por exemplo MacDiarmid *et al*. (2009) Nature Biotech 27: 643. As minicélulas são células acromossômicas que são produtos da divisão celular aberrante que não contêm DNA cromossômico. Assim, em uma outra forma de realização, em que o dito primeiro ou o dito segundo epítopos estão localizados em uma célula de tumor, tal como uma proteína de célula de tumor ou carboidrato de célula de tumor, e o outro epítopo está localizado em uma vesícula ou minicélula densa de elétron.

[00241] Além disso, a meia vida sérica de um anticorpo pode ser alterada pela inclusão em um anticorpo biespecífico de uma especificidade de ligação para uma proteína sérica. Por exemplo, a meia-vida sérica pode ser prolongada pela inclusão em um anticorpo biespecífico, de uma especificidade de ligação para albumina sérica. Assim, em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro anticorpo tem especificidade de ligação para uma célula de tumor ou proteína de célula de tumor, tal como erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de envelope de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFrvIII, L1-CAM, AXL, Fator de tecido (TF), CD74, EpCAM ou MRP3, CEA e o segundo anticorpo tem uma especificidade de ligação para uma proteína do sangue, tal como albumina sérica. Uma segunda especificidade de ligação também pode ser usada para alvejar um anticorpo a um tecido específico, tal como o sistema nervoso

central ou cérebro (através da barreira hematoencefálica). Assim, em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro anticorpo tem especificidade de ligação para um alvo específico de cérebro, tal como amiloide-beta (por exemplo, para o tratamento da doença de Alzheimer), Her-2 (por exemplo, para o tratamento de metástases do câncer de mama no cérebro), EGFr (por exemplo, para o tratamento de câncer cerebral primário), Nogo A (por exemplo, para o tratamento de lesão cerebral), TRAIL (por exemplo, para o tratamento do HIV), alfa-sinucleína (por exemplo, para o tratamento de Parkinson), Htt (por exemplo, para o tratamento de Huntington), um prion (por exemplo, para o tratamento da doença da vaca louca), uma proteína do vírus West Nile, e o segundo anticorpo tem uma especificidade de ligação para uma proteína da barreira hematoencefálica, tal como receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor de melanotransferrina (MTfR), receptor de lactoferrina (LfR), receptor 2 de Apolipoproteína E (ApoER2), proteínas 1 e 2 relacionadas com o receptor de LDL (LRP1 e LRP2), receptor para os produtos finais da glicosilação avançada (RAGE), receptor da toxina da difteria = fator de crescimento equivalente ao fator de crescimento epidérmico que liga heparina (DTR = HB-EGF), gp190 (Abbott *et al*, Neurobiology of Disease 37 (2010) 13-25).

Uma especificidade de ligação para uma proteína da barreira hematoencefálica também pode ser usada para alvejar uma outra, molécula, que não anticorpo, a um tecido específico, tal como o sistema nervoso central ou cérebro (através da barreira hematoencefálica). Assim, em uma outra forma de realização, uma das proteínas homodiméricas é um anticorpo de comprimento total tendo uma especificidade de ligação para uma proteína da barreira hematoencefálica (tal como TfR, receptor de insulina, MTfR, LfR, ApoER2, LRP1, LRP2, RAGE, DTR (= HB-EGF) ou gp190) e a outra proteína homodimérica é uma região Fc ligada no terminal N ou C a uma outra proteína, tal como uma citocina, um receptor solúvel ou outra proteína,

por exemplo, VIP (peptídeo intestinal vasoativo), BDNF (fator neurotrófico derivado de cérebro), FGF (fator de crescimento de fibroblasto), FGFs múltiplos, EGF (fator de crescimento epidérmico), PNA (ácido nucleico peptídico), NGF (fator de crescimento de nervo), Neurotrofina (NT)-3, NT-4/5, fator neurotrófico derivado de célula glial, fator neurotrófico ciliar, neurturina, neurregulinas, interleucinas, fator de crescimento transformador (TGF)-alfa, TGF-beta, eritropoietina, fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento derivado de plaqueta, artemina, persefina, netrinas, cardiotrofina-1, fator de célula tronco, *midkine*, pleiotrofina, proteínas morfogênicas ósseas, saposinas, semaforinas, fator inibidor de leucócito, alfa-L-iduronidase, iduronato-2-sulfatase, N-acetil-galactosamina-6-sulfatase, arilsulfatase B, alfa-glicosidase ácida, ou esfingomielinase (Pardridge, Bioparmaceutical drug targeting to the brain, Journal of Drug Targeting 2010, 1-11; Pardridge, Re-engineering Biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses. Bioconjugate Chemistry 2008, 19: 1327-1338.

[00242] Além disso, uma segunda especificidade de ligação pode ser usada para alvejar fatores de coagulação sanguínea a um sítio desejado particular de ação. Por exemplo, um anticorpo biespecífico tendo uma primeira especificidade de ligação para uma célula de tumor e uma segunda especificidade de ligação para um fator de coagulação sanguínea pode coagular sangue diretamente em um tumor, e assim interromper o crescimento do tumor. Assim, em uma outra forma de realização do método da invenção, o primeiro anticorpo tem especificidade de ligação para uma célula de tumor ou proteína de célula de tumor, tais como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 ou CXCR5 e o segundo anticorpo tem um especificidade de ligação para uma proteína envolvida na coagulação sanguínea, tal como fator de tecido.

[00243] Outras combinações de especificidade de ligação particularmente interessantes incluem: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 +

IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA classe II, CD38+CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + ramo que não de ligação e combinações de receptores ligados à proteína G.

[00244] Em uma outra forma de realização, os anticorpos biespecíficos de acordo com a invenção podem ser usados para depurar patógenos, autoanticorpos patogênicos ou compostos nocivos tais como venenos e toxinas da circulação pelo alvejamento aos eritrócitos essencialmente como descrito em Taylor *et al*. J. Immunol. 158: 842-850 (1997) e Taylor e Ferguson, J. Hematother. 4: 357-362, 1995. O dito primeiro epítopo está localizado em uma proteína de eritrócito (célula sanguínea vermelha) incluindo, mas não limitado ao receptor complemento de eritrócito 1 e o dito segundo epítopo está localizado no composto ou organismo a ser alvejado para a depuração.

[00245] Em uma outra forma de realização, o segundo ramo Fab compreende uma proteína de fusão que representa um autoantígeno ou um sítio de conjugação para ligar um autoantígeno tal como dsDNA. O alvejamento de patógenos, autoanticorpos ou compostos nocivos pelos anticorpos biespecíficos da invenção seguidos pela depuração mediada por eritrócito pode assim ter utilidade terapêutica no tratamento de várias doenças e síndromes.

Conjugação

[00246] Em outras formas de realização da invenção, a primeira e/ou

segunda proteínas homodiméricas estão ligadas a um composto selecionado do grupo que consiste de: uma toxina (incluindo um radioisótopo), um pró-medicamento ou um medicamento. Tal composto pode tornar a morte das células alvos mais eficaz, por exemplo, na terapia contra o câncer. A proteína heterodimérica resultante é assim um imunoconjugado. O composto pode ser alternativamente ligado à proteína heterodimérica resultante, isto é depois que a troca do ramo Fab tenha ocorrido.

[00247] Os compostos adequados para formar imunoconjugados da presente invenção incluem taxol, citochalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, diidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina, antimetabólitos (tais como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracila, decarbazina, hidroxiureia, asparaginase, gencitabina, cladribina), agentes alquilantes (tais como mecloretamina, tioepa, clorambucila, melfalan, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatina e outros derivados de platina, tais como carboplatina), antibióticos (tais como dactinomicina (antigamente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (antigamente daunomicina), doxorrubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina da difteria e moléculas relacionadas (tais como cadeia A da difteria e fragmentos ativos desta e moléculas híbridas), toxina ricina (tal como ricina A ou uma toxina da cadeia A da ricina desglicosilada), toxina da cólera, uma toxina equivalente a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-IIV), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina da coqueluche, toxina do tétano, inibidor da protease de Bowman-Birk da soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina,

modeccina, gelanina, cadeia A da abrina, cadeia A da modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor da *Saponaria officinalis*, toxinas gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina e enomicina. Outras moléculas conjugadas adequadas incluem ribonuclease (RNase), DNase I, enterotoxina estafilocócica A, proteína antiviral do caruru dos cachos, toxina da difteria, endotoxina de *Pseudomonas*, Maitansinoides, Auristatinas (MMAE, MMAF), Caliqueamicinas e análogos de Duocarmicina (Ducry e Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21: 5-13), Dolostatina-10, Dolostatina-15, Irinotecano ou seu metabólito ativo SN38, pirrolbenzodiazepinas (PBD's).

[00248] Em uma outra forma de realização da invenção, a primeira e/ou segunda proteínas homodiméricas são ligadas a um emissor de alfa, incluindo, mas não limitado a Tório-227, Rádio-223, Bismuto-212, e Actínio-225.

[00249] Em uma outra forma de realização da invenção, a primeira e/ou segunda proteínas homodiméricas são ligadas a um radionuclídeo emissor beta, incluindo, mas não limitado a Iodo-313, Ítrio-90, Flúor-18, Rênio-186, Gálio-68, Tecnécio-99, Índio-111, e Lutécio-177.

[00250] Em uma outra forma de realização, o composto a ser conjugado compreende um ácido nucleico ou molécula associada com o ácido nucleico. Em uma tal faceta da presente invenção, o ácido nucleico conjugado é uma ribonuclease citotóxica, um ácido nucleico de antessentido, uma molécula de RNA inibidora (por exemplo, uma molécula de siRNA) ou um ácido nucleico imunoestimulador (por exemplo, uma molécula de DNA que contém motivo CpG imunoestimulador).

[00251] Qualquer método conhecido na técnica para conjugar pode ser utilizado, incluindo os métodos descritos por Hunter *et al*., Nature 144, 945 (1962), David *et al*., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain *et al*., J. Immunol.

Met. 40, 219 (1981) e Nygren, J. Histochem. e Cytochem. 30, 407 (1982). Os conjugados podem ser produzidos conjugando-se quimicamente a outra porção ao lado do terminal N ou lado do terminal C da proteína (ver, por exemplo, Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Tais derivados de anticorpo conjugados também podem ser gerados pela conjugação em resíduos internos ou açúcares, onde apropriado. Os agentes podem ser ligados direta ou indiretamente a uma proteína da presente invenção. Um exemplo de ligação indireta de um segundo agente é a ligação por uma porção espaçadora. As tecnologias de ligação para medicamento-conjugados foram recentemente resumidas por Ducry e Stump (2010) Bioconjugate Chem. 21: 5.

Composições e usos

[00252] Em um outro aspecto principal, a invenção diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende uma proteína heterodimérica de acordo com a invenção como aqui descrita e um carregador farmaceuticamente aceitável.

[00253] As composições farmacêuticas podem ser formuladas de acordo com técnicas convencionais tais como aquelas divulgadas em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Uma composição farmacêutica da presente invenção pode incluir, por exemplo, diluentes, enchedores, sais, tampões, detergentes (por exemplo, um detergente não iônico, tal como Tween-20 ou Tween-80), estabilizadores (por exemplo, açúcares ou aminoácidos isentos de proteína), preservantes, fixativos de tecido, solubilizadores, e/ou outros materiais adequados para a inclusão em uma composição farmacêutica.

[00254] Os carregadores farmaceuticamente aceitáveis incluem qualquer um e todos os solventes adequados, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de

isotonicidade, antioxidantes e agentes retardantes de absorção, e os semelhantes que são fisiologicamente compatíveis com um composto da presente invenção. Os exemplos de carregadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da presente invenção incluem água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, etanol, dextrose, poliois (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol). Os carregadores farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós-estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

[00255] As composições farmacêuticas da presente invenção também podem compreender antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, (1) antioxidantes solúveis em água, tal como ácido ascórbico, cloridreto de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e os semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tal como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol, e os semelhantes; e (3) agentes queladores de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e os semelhantes.

[00256] As composições farmacêuticas da presente invenção também podem compreender agentes de isotonicidade, tais como açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol, glicerol ou cloreto de sódio nas composições.

[00257] As composições farmacêuticas da presente invenção também podem conter um ou mais adjuvantes apropriados para a via escolhida de administração tais como preservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes, agentes dispersantes, preservantes ou tampões, que podem

realçar a vida de prateleira ou eficácia da composição farmacêutica. Os compostos da presente invenção podem ser preparados com carregadores que protegerão o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Tais carregadores podem incluir gelatina, monoestearato de glicerila, diestearato de glicerila, polímeros biodegradáveis, biocompatíveis tais como etileno acetato de vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido poliláctico sozinhos ou com uma cera, ou outros materiais bem conhecidos na técnica. Os métodos para a preparação de tais formulações são no geral conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

[00258] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes, por exemplo, como enumerados acima, como requerido, seguido pela microfiltração de esterilização.

[00259] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas podem ser variados de modo a se obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para se obter a resposta terapêutica desejada para um paciente particular, composição, e modo de administração, sem que seja tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção utilizadas, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular que é utilizado, da duração do tratamento, outros medicamentos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares utilizadas, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente que é tratado, e como fatores bem conhecidos nas artes médicas.

[00260] A composição farmacêutica pode ser administrada por qualquer via e modo adequados. Em uma forma de realização, uma composição farmacêutica da presente invenção é administrada parenteralmente. “Administrada parenteralmente” como aqui usado significa modos de administração outros que não a administração enteral e tópica, usualmente por injeção, e incluem a injeção e infusão epidérmica, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, intracraniana, intratoráxica, epidural e intrasternal.

[00261] Em uma forma de realização que a composição farmacêutica é administrada pela injeção ou infusão intravenosa ou subcutânea.

[00262] Em um aspecto principal, a invenção diz respeito a uma proteína heterodimérica de acordo com a invenção, tal como um anticorpo biespecífico de acordo com a invenção, para o uso como um medicamento. A proteína heterodimérica da invenção pode ser usada para vários propósitos. Em particular, como explicado acima as proteínas heterodiméricas da invenção podem ser usados para o tratamento de várias formas de câncer, incluindo câncer metastático e câncer refratário.

[00263] Assim, em um aspecto, a invenção diz respeito a um método para inibir o crescimento e/ou proliferação de e/ou para matar uma célula de tumor que compreende a administração de uma proteína heterodimérica de acordo com a invenção como aqui descrita a um indivíduo em necessidade deste.

[00264] Em uma outra forma de realização as proteínas heterodiméricas da invenção são usadas para o tratamento de doenças imunes e autoimunes, doenças inflamatórias, doenças infecciosas, doenças cardiovasculares, doenças do CNS e músculo-esqueletais.

[00265] Os regimes de dosagem nos métodos acima de tratamento e

usos são ajustados para fornecer a resposta ideal desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

[00266] As dosagens eficientes e os regimes de dosagem para as proteínas heterodiméricas dependem da doença ou condição a serem tratadas e podem ser determinadas pelas pessoas habilitadas na técnica. Uma faixa exemplar, não limitante para uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo biespecífico da presente invenção é de cerca de 0,1 a 100 mg/kg, tal como de cerca de 0,1 a 50 mg/kg, por exemplo, de cerca de 0,1 a 20 mg/kg, tal como de cerca de 0,1 a 10 mg/kg, por exemplo, de cerca de 0,5, tal como de cerca de 0,3, cerca de 1, cerca de 3, cerca de 5, ou cerca de 8 mg/kg.

[00267] Um médico ou veterinário tendo habilidade comum na técnica pode facilmente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica requerida. Por exemplo, o médico ou veterinário pode começar com doses da proteína heterodimérica utilizada na composição farmacêutica em níveis mais baixos do que aquele requerido de modo a obter o efeito terapêutico desejado e gradualmente aumentar a dosagem até que o efeito desejado seja obtido. No geral, uma dose diária adequada de uma composição da presente invenção será aquela quantidade do composto que é a dose eficaz mais baixa para produzir um efeito terapêutico. A administração, por exemplo, pode ser parenteral, tal como intravenosa, intramuscular ou subcutânea.

[00268] Uma proteína heterodimérica da invenção também pode ser administrada profilaticamente de modo a reduzir o risco de desenvolver doença, tal como câncer, retardar o início da ocorrência de um evento na progressão da doença, e/ou reduzir o risco de recaída quando uma doença, tal como o câncer está em remissão.

[00269] As proteínas heterodiméricas, tais como anticorpos biespecíficos, da presente invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinado com outros agentes terapêuticos relevantes para a doença ou condição a ser tratada. Consequentemente, em uma forma de realização, o medicamento que contém proteína heterodimérica é para combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos, tais como um dos agentes citotóxicos, quimioterapêuticos ou antiangiogênicos. Tal administração combinada pode ser simultânea, separada ou sequencial. Em uma outra forma de realização, A presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir doença, tal como câncer, método este que compreende a administração a um indivíduo em necessidade deste de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína heterodimérica, tal como um anticorpo biespecífico da presente invenção, em combinação com radioterapia e/ou cirurgia.

[00270] As proteínas heterodiméricas, tais como anticorpos biespecíficos, da presente invenção também podem ser usadas para propósitos de diagnóstico.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Vetores de expressão para a expressão de IgG1-2F8 e IgG1-7D8 humanos

[00271] As regiões que codificam VH e VL de HuMab 2F8 (WO 02/100348) e HuMab 7D8 (WO 04/035607) foram clonadas no vetor de expressão pConG1f (que contém a sequência genômica da região constante do alotipo IgG1f humana (Lonza Biologics)) para a produção da cadeia pesada de IgG1 humana e pConKappa (que contém a região constante de cadeia leve capa humana, Lonza Biologics) para a produção da cadeia leve capa. Para os anticorpos de IgG4 as regiões VH foram inseridas no vetor pTomG4 (que contém a sequência genômica da região constante de IgG4 humana no vetor pEE12.4 (Lonza Biologics)). Alternativamente, nas construções subsequentes,

os vetores foram usados que contém as regiões codificadoras totalmente otimizadas no códon codificadoras da cadeia pesada (IgG1 ou IgG4) no vetor pEE12.4 ou na cadeia leve capa humana de HuMab 2F8 ou HuMab 7D8 no vetor pEE6.4 (Lonza Biologics).

Exemplo 2 Vetores de expressão para a expressão de IgG1-2F8 apagada na articulação, e fragmentos CH2-CH3 de IgG1 e IgG4 humanas que contêm mutações específicas.

[00272] Para introduzir mutações na articulação e regiões CH3 das cadeias pesadas de anticorpo, o kit de mutagênese loco dirigida Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA) foi usado de acordo com as recomendações do fabricante. Alternativamente, as construções foram totalmente sintetizadas ou as regiões VH foram clonadas em um vetor que já contém as substituições que codificam o aminoácido específico.

[00273] As construções que codificam os fragmentos CH2 e CH3 foram construídas pela PCR ou sintetizadas totalmente otimizadas no códon. Estas construções tiveram um peptídeo de sinal de terminal N e um rótulo His de 6 aminoácidos e contiveram os aminoácidos 341-447 da região constante de IgG1/4 humano. As construções foram clonadas em pEE12.4.

[00274] Para construir moléculas de IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1), uma construção de DNA sintético foi fabricada que codifica o formato Uni-G1 para os isótipos de IgG1 humano com especificidade de EGFR. Nesta construção a região de articulação natural (como definida pelo exon de articulação) foi apagada. Uma mutação de Ser para Cys extra na posição 158 foi feita na construção de IgG1 para recuperar a ligação Cys entre as cadeias HC e LC neste subtipo. A sequência de proteína é mostrada abaixo. A construção foi inserida no vetor pEE6.4 e chamada de pHG1-2F8.

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDTA
VYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP

CSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Exemplo 3: Vetores de expressão para a expressão de IgG4-2F8 e IgG4-7D8 de rhesus

[00275] Os vetores que contém as regiões codificadoras para as cadeias pesadas e leves capa de IgG4 do macaco Rhesus chinês e as regiões VH e VL de Humab 2F8 e 7D8 foram sintetizadas, totalmente otimizadas no códon e inseridos em pEE12.4 (cadeia pesada) e pEE6.4 (cadeia leve). A sequência da região constante de cadeia pesada como usada (com base nas sequências descritas por Scinicariello *et al*., Immunology 111: 66-74, 2004) foi a que segue (alinhada com a sequência humana):

```
Human IgG4        ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
Rhesus (Ch) IgG4  -STKGPSVFPLASCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

Human IgG4        TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
Rhesus (Ch) IgG4  TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYVCNVVHEPSNTKVDKRVEFT--

Human IgG4        PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
Rhesus (Ch) IgG4  PPCPACPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV

Human IgG4        QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
Rhesus (Ch) IgG4  QFNWYVDGAEVHHAQTKPRERQFNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKV

Human IgG4        SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
Rhesus (Ch) IgG4  SNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYILPPPQEELTKNQVSLTCLVTGFY

Human IgG4        PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
Rhesus (Ch) IgG4  PSDIAVEWESNGQPENTYKTTPPVLDSDGSYLLYSKLTVNKSRWQPGNIF

Human IgG4        SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
Rhesus (Ch) IgG4   TCSVMHEALHNHYTQKSLSVSPGK
```

[00276] A sequência da região constante de cadeia leve (CL) de Rhesus usada foi:

AVAAPSVFIFPPSEDQVKSGTVSVVCLLNNFYPREASVKWKVDGVLK
TGNSQESVTEQDSKDNTYSLSSTLTLSSTDYQSHNVYACEVTHQGLSS

PVTKSFNRGEC

Exemplo 4: Produção de anticorpo pela expressão transitória em células HEK-293F

[00277] Os anticorpos foram produzidos, sob condições isentas de soro, pelos vetores de expressão de cadeia pesada e leve de cotransfecção relevante em células HEK-293F (Invitrogen), usando 293fectin (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Exemplo 5: Purificação de anticorpos IgG1 e IgG4

[00278] Os anticorpos de IgG1 e IgG4 foram purificados pela cromatografia de afinidade em proteína A. Os sobrenadantes da cultura de célula foram filtrados em um filtro sem saída de 0,20 µM, seguido pelo carregamento em uma coluna de proteína A de 5 ml (rProteína A FF, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e a elução da IgG com ácido cítrico 0,1 M-NaOH, pH 3. O eluído foi imediatamente neutralizado com 2 M de Tris-HCl, pH 9 e dialisado durante a noite em 12,6 mM de fosfato de sódio, 140 mM de NaCl, pH 7,4 (B. Braun, Oss, Países Baixos). Depois da diálise, as amostras foram filtradas estéreis em um filtro sem saída de 0,20 µM. A concentração das IgGs purificadas foi determinada pela nefelometria e absorbância a 280 nm. As proteínas purificas foram analisadas pela SDS-PAGE, IEF, espectrometria de massa e glicoanálise.

Exemplo 6: Purificação de fragmentos de CH2-CH3

[00279] As proteínas de CH2-CH3 rotuladas com His foram purificadas pela cromatografia de afinidade de íon metálico (Ni^{2+}) imobilizado (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemanha), dessalinizadas usando colunas PD-10 (GE Healthcare) equilibradas com PBS e esterilizadas por filtração em filtros sem saída de 0,2 µM. A concentração das proteínas purificadas foi determinada pela absorbância a 280 nm. A qualidade das proteínas purificadas foi analisada pela SDS-PAGE.

Exemplo 7: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do

ramo Fab induzida por GSH entre anticorpos IgG4 de ser humano e rhesus

[00280] Como mencionado acima, a WO 2008119353 (Genmab) descreve um método *in vitro* para produzir anticorpos biespecíficos em que um anticorpo biespecífico é formado pela troca do "ramo Fab" ou "meia-molécula" (troca de uma cadeia pesada e cadeia leve ligadas) entre dois anticorpos IgG4 ou equivalente a IgG4 monoespecíficos na incubação sob condições redutoras. Esta reação de troca do ramo Fab é o resultado de uma reação de isomerização de ligação de dissulfeto em que as ligações de dissulfeto intercadeia pesada nas regiões de articulação de anticorpos monoespecíficos são reduzidas e as cisteínas livres resultantes formam uma nova ligação de dissulfeto intercadeia pesada com resíduos de cisteína de uma outra molécula de anticorpo com uma especificidade diferente. O produto resultante é um anticorpo biespecífico tendo dois ramos Fab com sequências diferentes.

[00281] Para testar quanto à troca do ramo Fab entre anticorpos IgG4 de ser humano e rhesus, IgG4-2F8 de ser humano (anti-EGFR), IgG4-7D8 de ser humano (anti-CD20), IgG4-2F8 de Rhesus e IgG4-7D8 de Rhesus foram usados para fabricar todas as combinações possíveis de dois anticorpos. Para a troca do ramo Fab *in vitro*, as misturas de anticorpo, que contém cada anticorpo em uma concentração final de 4 µg/ml em 0,5 ml de PBS com 0,5 mM de glutationa reduzida (GSH), foram incubadas a 37°C por 24 h. Para interromper a reação de redução, 0,5 ml de PBS/0,05 % de Tween 20 (PBST) foram adicionados à mistura de reação.

[00282] A presença de anticorpos biespecíficos foi testada pela determinação da ligação biespecífica usando um ensaio imunossorvente ligado á enzima (ELISA) intercalado. As placas de ELISA (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemanha) foram revestidas durante a noite com 2 µg/ml (100 µL/reservatório) de domínio extracelular recombinante de EGFR em PBS a 4°C. As placas foram lavadas uma vez com PBST. A série de diluição das

amostras de anticorpo (0 a 1 μg/ml em diluições de 3 vezes) em PBST/0,2 % de BSA (PBSTB) foram transferidas para as placas de ELISA revestidas (100 μL/reservatório) e incubadas em um agitador de placa (300 rpm) por 60 min na temperatura ambiente (RT). As amostras foram descartadas e as placas foram lavadas uma vez com PBS/0,05 % de Tween 20 (PBST). Em seguida, as placas foram incubadas em um agitador de placa (300 rpm) com 2 μg/ml de anticorpo monoclonal anti-idiotípico de camundongo 2F2 SAB1.1 (direcionado contra 7D8; Genmab) em PBTB (100 μL/reservatório) por 60 min. As placas foram lavadas uma vez com PBS/0,05 % Tween 20 (PBST). Em seguida, as placas foram incubadas em um agitador de placa (300 rpm) com um IgG anticamundongo de cabra conjugado com HRP (15G; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA; 1:5.000) em PBSTB (100 μL/reservatório) por 60 min na temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS/0,05 % Tween 20 (PBST). ABTS (50 mg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) foi adicionado (100 μL/reservatório) e incubado protegido da luz por 30 min na temperatura ambiente. a reação foi interrompida com 2 % de ácido oxálico (100 μL/reservatório; Riedel de Haen Seelze, Alemanha). Depois de 10 min na temperatura ambiente, a absorbância a 405 nm foi medida em uma leitora de placa de ELISA.

[00283] A FIGURA 1 mostra que uma combinação de IgG4 de ser humano e rhesus resultou em mais ligação biespecífica (uma OD mais alta a 405 nm) comparada com cada uma das combinações de moléculas de IgG4 da mesma espécie. Estes dados mostram que a troca do ramo Fab ocorre entre IgG4 de ser humano e rhesus IgG4. Além disso, a ligação biespecífica mais alta sugere que as meias moléculas de IgG4 de ser humano mostram dimerização preferencial para as meias moléculas de IgG4 de rhesus (heterodimerização), resultando em um equilíbrio da reação de troca do ramo Fab que é mudado para o heterodímero biespecífico ao invés de uma troca

estocástica com 50 % de heterodímero e 50 % de homodímeros.

Exemplo 8: Análise de sequência de IgG4 de ser humano e rhesus

[00284] A capacidade de um anticorpo para engrenar na troca do ramo Fab foi descrito para envolver o terceiro domínio constante (CH3) além de uma chamada região de articulação permissiva (por exemplo, que contém CPSC) que apenas requer um ambiente redutor a ser ativado (Van der Neut Kolfschoten, 2007, Science). Para os anticorpos humanos, a troca do ramo Fab foi descoberta ser uma característica inerente de IgG4, caracterizado por uma arginina (R) na posição 409 no domínio CH3 e uma articulação permissiva (226-CPSC-229) (ver a WO 2008145142 (Genmab)). Ao contrário, IgG1 de ser humano, que não engrena na troca do ramo Fab, tem uma Lisina (K) na posição 409 e uma articulação estável (isto é não permissiva) (226-CPPC-229) (numeração EU, ver também a FIGURA 16).

[00285] Em uma tentativa para elucidar a troca do ramo Fab aumentada entre IgG4 de ser humano e rhesus comparada com a troca do ramo Fab entre moléculas de IgG4 da mesma espécie, a articulação de núcleo e aminoácidos da interface de CH3-CH3 de anticorpos de ser humano e rhesus foram analisados (ver por exemplo Dall'Acqua, *et al* (1998) Biochemistry 37: 9266 para uma vista geral dos resíduos da interface CH3-CH3 de ser humano). A FIGURA 2 mostra que a sequência de articulação de núcleo em IgG4 de rhesus chinês é 226-CPAC-229 e que o domínio CH3 contém uma Lisina (K) na posição 409. Além disso, o alinhamento de sequência mostrou que IgG4 de rhesus é caracterizado por mais três substituições de aminoácido na interface CH3-CH3 quando comparada com IgG4 de ser humano: isoleucina (I) na posição 350 no rhesus versus treonina (T) no ser humano; treonina (T) na posição 370 no rhesus versus lisina (K) no ser humano; e leucina (L) na posição 405 no rhesus versus fenilalanina (F) no ser humano.

Exemplo 9: Geração de anticorpos biespecíficos usando a troca do ramo Fab induzida por GSH entre IgG4 de ser humano e IgG1de ser humano que contém sequências CH3 de IgG4 de rhesus.

[00286] Foi descrito para os anticorpos humanos que para permitir que a troca do ramo Fab ocorra nas moléculas de IgG1, a substituição da sequência de articulação de núcleo de IgG1 (CPPC) com a sequência IgG4 de ser humano (CPSC) por uma substituição de P228S não teve efeito, mas que a mutação CH3 a uma sequência equivalente a IgG4 foi requerida para a atividade de troca do ramo Fab (Van der Neut Kolfschoten, 2007, Science).

[00287] Com base na troca do ramo Fab entre IgG4 de ser humano e rhesus descrita no Exemplo 7, foi analisado se a sequência de CH3 do IgG4 de rhesus chinês engrenaria IgG1 de ser humano para a troca do ramo Fab. Portanto, a mutação tripla T350I-K370T-F405L (aludida a seguir como ITL) foi introduzida no IgG1-2F8 de ser humano além da mutação P228S que resulta na sequência de articulação CPSC. Os mutantes de IgG1-2F8 de ser humano foram combinados com IgG4-7D8 de ser humano para a troca do ramo Fab induzida por GSH *in vitro*. As misturas de anticorpo, que contém cada anticorpo em uma concentração final de 4 µg/ml em 0,5 ml de PBS com 0,5 mM de GSH, foram incubados a 37°C por 0-3-6-24 h. Para interromper a reação de redução, 0,5 ml de PBS/0,05 % de Tween 20 (PBST) foi adicionado à mistura de reação. As medições da ligação biespecífica em um ELISA foram realizadas como descrito no Exemplo 7.

[00288] A FIGURA 3 confirma que a introdução de uma articulação CPSC sozinha não engrena IgG1-2F8 humano para a troca do ramo Fab induzida por GSH quando combinado com IgG4-7D8 de ser humano. Também a introdução dos aminoácidos da interface CH3 específica de IgG4 de rhesus (ITL) no IgG1-2F8 humano, enquanto preserva a articulação IgG1 do tipo selvagem, não resultou em engrenamento para a troca do ramo Fab quando combinado com IgG4-7D8 de ser humano sob estas condições. Ao

contrário, uma sequência de cadeia principal variante de IgG1-2F8 de ser humano que abriga tanto uma sequência CPSC na articulação quanto os aminoácidos da interface CH3 específico de IgG4 de rhesus (ITL) mostrou ligação biespecífica aumentada depois da troca do ramo Fab induzida por GSH com IgG4-7D8 de ser humano comparada com dois anticorpos IgG4 de ser humano. Estes dados mostram que uma articulação que contém CPSC em combinação com um domínio CH3 que contém I, T e L nas posições 350, 370 e 405, respectivamente, é suficiente para engrenar IgG1 humano para a troca do ramo Fab induzida por GSH e que o equilíbrio da reação de troca é mudado para o produto biespecífico trocado quando combinado com IgG4 de ser humano.

Exemplo 10: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab *in vivo* entre IgG4 de ser humano e IgG1 ou IgG4 mutantes

[00289] Para identificar ainda mais as características requeridas para o engrenamento da troca do ramo Fab, IgG4 de ser humano e variantes de IgG1 foram analisadas *in vivo*. Quatro camundongos SCID fêmeas (Charles River, Maastricht, Países Baixos) por grupo foram injetados i.v. com misturas de anticorpo, que contém 600 µg de anticorpo (500 µg 7D8 + 100 µg 2F8) em um volume total de 300 µL. As amostras de sangue foram tiradas da veia safena em 3, 24, 48 e 72 horas depois da injeção. O sangue foi coletado em frascos contendo heparina e centrifugado a 10.000 g por 5 min para separar o plasma das células. A geração de anticorpos biespecíficos foi seguida pela avaliação de CD20 e reatividade EGFR biespecífica em um ELISA usando amostras de plasma diluídas em série em PBSTB como descrito no Exemplo 7. Os anticorpos biespecíficos nas amostras de plasma foram quantificados pelo ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Software, San Diego, CA) usando uma mistura de anticorpo trocado *in vitro* como referência.

[00290] A FIGURA 4 mostra que IgG4-2F8 de ser humano, em que a articulação ou a sequência CH3 são convertidas para a sequência de IgG1 de

ser humano correspondente (CPPC ou R409K, respectivamente), não engrena mais na troca do ramo Fab *in vivo*. Vice e versa, IgG1 de ser humano, em que tanto a região de articulação quanto as sequências da interface CH3 são convertidas para as sequências de IgG4 de ser humano correspondentes (CPSC e K409R), é capaz de participar na troca do ramo Fab *in vivo*. Estes dados mostram que uma articulação que contém CPSC (S na posição 228) em combinação com um domínio CH3 que contém uma arginina (R) na posição 409 é suficiente para permitir a troca do ramo Fab pela IgG1 de ser humano *in vivo*.

Exemplo 11: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA: desvio/rompimento de uma articulação estabilizada

[00291] 2-Mercaptoetilamina·HCl (2-MEA) é um agente redutor brando que foi descrito para clivar seletivamente ligações de dissulfeto na região de articulação de anticorpos, enquanto preserva as ligações de dissulfeto entre as cadeias pesada e leves. Portanto, uma série de concentração de 2-MEA foi testada quanto a sua capacidade para induzir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab entre dois anticorpos que contém regiões de articulação CPSC ou CPPC. As misturas de anticorpo, que contém cada anticorpo em uma concentração final de 0,5 mg/ml, foram incubados com uma série de concentração de 2-MEA (0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 25,0 e 40,0 mM) em um volume total de 100 µl de TE a 37°C por 90 min. Para deter a reação de redução, o agente redutor 2-MEA foi removido pela dessalinização das amostras usando colunas giratórias (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acordo com as recomendações do fabricante. A ligação biespecífica foi medida em um ELISA como descrito no Exemplo 7.

[00292] A troca do ramo Fab induzida por 2-MEA foi testada quanto à combinação IgG4-2F8 x IgG4-7D8, que contém regiões de articulação CPSC

e conhecidas participar na troca do ramo Fab induzida por GSH, e quanto à combinação IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, que não participa na troca do ramo Fab induzida por GSH devido às regiões de articulação estabilizadas (descrito no Exemplo 9, FIGURA 3). Surpreendentemente, 2-MEA foi descoberto induzir a separação de cadeias leves das cadeias pesadas como determinado pela SDS-PAGE não redutora (dados não mostrados). Não obstante, anticorpos biespecíficos funcionais foram gerados como mostrado na FIGURA 5. O nível máximo de ligação biespecífica depois da troca do ramo Fab entre IgG4-2F8 de ser humano do tipo selvagem e IgG4-7D8 foi atingido em uma concentração de 2,0 mM de 2-MEA e foi comparável ao nível atingido com 0,5 mM de GSH como descrito no Exemplo 9 (FIGURA 3). Entretanto, 2-MEA foi capaz de induzir a troca do ramo Fab entre os anticorpos humanos IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC (com regiões de articulação estabilizadas) em uma maneira dependente da dose. Enquanto que pouco ou nenhum dos anticorpos biespecíficos foram formados em concentrações baixas de 2-MEA, provavelmente devido à presença de uma sequência CPPC na região de articulação de ambos os anticorpos, a geração de anticorpos biespecíficos foi muito eficiente em concentrações mais altas de 2-MEA. A ligação biespecífica máxima foi atingida em 25 mM de 2-MEA e excedeu a ligação máxima depois da troca do ramo Fab entre os dois do anticorpos IgG4 do tipo selvagem. Estes níveis de ligação máxima foram comparáveis com o que é descrito no Exemplo 9 (FIGURA 3) para o tratamento com GSH do anticorpo correspondente com uma articulação CPSC (IgG1-2F8-CPSC-ITL). Como IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC ambos contêm uma articulação de CPPC, estes dados indicam que 2-MEA poderia desviar a exigência de uma articulação CPSC para a troca do ramo Fab *in vitro*.

Exemplo 12: Espectrometria de massa para seguir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

[00293] A geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA é descrita no Exemplo 11, onde a ligação biespecífica foi mostrada por um ELISA (FIGURA 5). Para confirmar que os anticorpos biespecíficos são formados, as amostras foram analisadas pela espectrometria de massa com ionização de eletropulverização (ESI-MS) para determinar os pesos moleculares. Primeiro, as amostras foram desglicosiladas pela incubação de 200 µg de anticorpo durante a noite a 37°C com 0,005 U de N-Glicanase (cat. no. GKE-5006D; Prozyme) em 180 µL de PBS. As amostras foram dessalinizadas em um Aquity UPLC® (Waters, Milford, EUA) com uma coluna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm a 60°C e eluído com um gradiente de uma mistura de MQ água (Eluente A) e acetonitrila grau LC-MS (Eluente B) (Biosolve, Valkenswaard, Países Baixos) que contém 0,05 % de ácido fórmico (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemanha). Os espectros de massa de ionização com eletropulverização em tempo de voo foram registrados em linha em um espectrômetro de massa micrOTOF® (Bruker, Bremen, Alemanha) operando no modo de íon positivo. Antes da análise, uma escala de 500 a 4000 m/z foi calibrada com mistura de sintonia ES (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Os espectros de massa foram desconvoluídos pelo uso de Entropia Máxima que é fornecida com o software DataAnálise® v. 3.4 (Bruker, Bremen, Alemanha). Com base na massa molecular dos anticorpos usados para a troca do ramo Fab neste experimento, os anticorpos biespecíficos puderam ser discriminados dos anticorpos originais (também descritos no Exemplo 15, FIGURA 9C para IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC). Para o pico de anticorpo biespecífico, a área sob a curva foi determinada e dividida pela área total sob as curvas para calcular a porcentagem de anticorpo biespecífico em cada amostra.

[00294] A FIGURA 6A mostra três perfis de espectrometria de massa representativos da reação de troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC com 0 mM de 2-MEA (dois picos que correspondem aos

anticorpos precursores), 7 mM de 2-MEA (três picos que correspondem ao precursor e aos anticorpos biespecíficos), e 40 mM de 2-MEA (um pico que corresponde ao anticorpo biespecífico). O pico homogêneo do produto biespecífico indica que nenhum emparelhamento errado de cadeia leve ocorreu, que teria resultado em picos subdivididos. Os dados quantificados são apresentados na FIGURA 6B e mostram que a troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC resultou em quase 100 % de anticorpo biespecífico. Ao contrário, a troca do ramo Fab entre anticorpos IgG4 do tipo selvagem resultou em menos do que 50 % de produto biespecífico. Estes dados confirmam os resultados do ELISA da ligação biespecífica descrito no Exemplo 11 (FIGURA 5).

Exemplo 13: Estabilidade de anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

[00295] A estabilidade de anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA foi testada. Portanto, 2 µg de uma amostra biespecífica gerada de IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC com 7,0 mM de 2-MEA (como descrito no Exemplo 11, FIGURA 5) foram usados em uma reação de troca do ramo Fab induzida por GSH na presença de uma série de concentração (0, 2, 20, 100 µg) de IgG4 irrelevante (IgG4-MG contra receptor da acetilcolina), representando um excesso de 0, 1, 10, 50x de IgG4-MG comparada com a amostra de teste biespecífico de 2 µg. A troca do ramo Fab nesta reação resultaria na perda da ligação biespecífica EGFR/CD20. As condições para a reação de redução de GSH foram as mesmas como descritas no Exemplo 7 (24 h a 37°C em 0,5 ml de PBS/0,5 mM de GSH). Para interromper a reação de redução, 0,5 ml de PBSTB foi adicionado à mistura de reação. A ligação biespecífica foi medida em um ELISA como descrito no Exemplo 7. A ligação biespecífica depois da reação de redução de GSH é apresentada em relação à ligação biespecífica medida no material de partida (controle), que foi ajustado a 100 %.

[00296] A FIGURA 7A mostra que para a amostra biespecífica derivada de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, a ligação biespecífica EGFR/CD20 não é significantemente mudada depois da troca do ramo Fab induzida por GSH na presença de IgG4 irrelevante. Isto indica que o produto biespecífico é estável, isto é não participa na troca do ramo Fab induzida por GSH. Como um controle, a FIGURA 7B mostra que uma amostra derivada de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 mostra ligação biespecífica de EGFR/CD20 diminuída depois da troca do ramo Fab induzida por GSH na presença de IgG4 irrelevante, indicando que este produto não é estável. Estes dados mostram que o heterodímero que consiste de uma cadeia pesada de IgG1 de ser humano que contém a mutação tripla T350I-K370T-F405L no domínio CH3, e uma cadeia pesada de IgG4 de ser humano que contém a substituição S228P que resulta em uma articulação estabilizada (CPPC), é estável.

Exemplo 14: Análise *in vivo* das farmacocinéticas e estabilidade de anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

[00297] Os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA *in vitro* entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC foram injetados em camundongos SCID para analisar a sua estabilidade (troca do ramo Fab *in vivo*) e propriedades farmacocinéticas (taxa de depuração plasmática) em comparação com os anticorpos precursores IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC. Três grupos de camundongos (3 camundongos por grupo) foram injetados intravenosamente na veia da cauda com 200 µL de anticorpo purificado: (1) 100 µg de anticorpo biespecífico; (2) 100 µg de anticorpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante (natalizumab, anti-α4-integrina); (3) 50 µg de IgG1-2F8-ITL + 50 µg de IgG4-7D8-CPPC. As amostras de sangue (50 a 100 µl) foram coletadas pela punção das bochechas em intervalos de tempo predeterminados depois da administração de anticorpo (10 min, 3 h, 1, 2, 7, 14, 21 dias). O sangue foi coletado em frascos contendo

heparina e centrifugado por 10 min a 14.000 g. O plasma foi armazenado a -20°C antes de outra análise.

[00298] As concentrações totais de IgG nas amostras de plasma foram ensaiadas pelo ELISA. As condições de ensaio das etapas subsequentes foram as mesmas como para o ELISA descrito no Exemplo 7. Os compostos específicos usados para a medição de IgG total foram os que seguem: revestimento com 2 µg/ml de IgG anti-humano de camundongo (clone MH16-1; CLB; cat. no. M1268); diluições de amostras de soro (1:500 e 1:2.500 para os grupos 1 e 3) e (1:2.500 e 1:10.000 para o grupo 2); conjugado: IgG anti-ser humano de cabra conjugado a HRP (clone 11H; Jackson; cat. no. 109-035-098; 1:10.000). A presença de anticorpos biespecíficos nas amostras de plasma foi ensaiada e quantificada pela reatividade biespecífica de CD20 e EGFR em um ELISA como descrito no Exemplo 10.

[00299] A FIGURA 8A mostra as concentrações plasmáticas totais de anticorpo. A forma das curvas de depuração plasmática foi idêntica em todos os grupos, indicando que a depuração plasmática do anticorpo biespecífico foi a mesma para os anticorpos precursores IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC no intervalo de tempo analisado. A FIGURA 8B mostra as concentrações plasmáticas de anticorpos biespecíficos com o tempo. A adição de um excesso de 10 vezes de IgG4 irrelevante ao anticorpo biespecífico não afetou as concentrações de anticorpo biespecífico, indicando que nenhuma troca na ramificação Fab ocorreu *in vivo*. Depois da injeção dos anticorpos precursores (IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC), nenhum dos anticorpos biespecíficos foram detectáveis no plasma, confirmando que estes anticorpos não participam na troca do ramo Fab *in vivo*. Estes dados indicam que o produto de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA *in vitro* entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, foi estável *in vivo* (nenhuma troca na ramificação Fab) e mostrou propriedades farmacocinéticas comparáveis (taxa de depuração plasmática) como os anticorpos

monovalentes precursores.

Exemplo 15: Pureza dos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre dois anticorpos

[00300] Um lote de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC humano, foi purificado em uma coluna de dessalinização de PD-10 (cat. no. 17-0851-01; GE Healthcare). Em seguida, a pureza do produto biespecífico foi analisada pela eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HP-S) e espectrometria de massa. A funcionalidade do anticorpo biespecífico gerado foi confirmado pela ligação biespecífica em um ELISA (dados não mostrados).

[00301] A SDS-PAGE foi realizada sob condições redutoras e não redutoras em 4 a 12 % de geis NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Breda, Países Baixos) usando um método de Laemli modificado (Laemli 1970 Nature 227 (5259): 680-5), onde as amostras foram conduzidas no pH neutro. Os geis de SDS-PAGE foram tingidos com Coomassie e digitalmente imageados usando o geneGenius (Synoptics, Cambridge, RU). A FIGURA 9A mostra que a amostra de anticorpo depois da troca do ramo Fab consiste de IgG intacto, com um traço de meias moléculas (H1L1) detectáveis no gel não reduzido (FIGURA 9A-b).

[00302] O fracionamento HP-S foi realizado usando uma unidade de separação Waters Alliance 2695 (Waters, Etten-Leur, Países Baixos) conectada a uma coluna TSK HP-S ($G3000SW_{xl}$; Toso Biosciences, via Omnilabo, Breda, Países Baixos) e um detector de absorbância Waters 2487 dual λ (Waters). As amostras foram conduzidas a 1 ml/min. Os resultados foram processados usando a versão 2002 do software Empower e expressados por pico como porcentagem da altura do pico total. A FIGURA 9B mostra que >98 % da amostra consiste de IgG intacto, sem praticamente nenhum

agregado formado.

[00303] A Espectrometria de massa foi realizada como descrito no Exemplo 12. A FIGURA 9C mostra os perfis de espectrometria de massa do material de partida IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC. O produto na amostra de troca do ramo Fab tem 145.901 kDa, que perfeitamente se iguala com o produto biespecífico derivado de IgG1-2F8-ITL (146.259,5/2 = 73.130) + IgG4-7D8-CPPC (145.542,0/2 = 72.771). Além disso, o produto de anticorpo biespecífico mostrou um pico homogêneo, indicando que nenhum emparelhamento errado da cadeia leve ocorreu, que teria resultado em picos subdivididos. Estes dados mostram que a troca do ramo Fab resultou em 100 % de anticorpo biespecífico. Os picos pequenos detectados além do pico principal (K0) do IgG4-7D8-CPPC e amostra biespecífica podem ser atribuídos à presença de uma (K1) ou duas (K2) lisinas de terminal C.

[00304] Estes dados mostram que uma amostra de anticorpo biespecífico ~100 % funcional foi gerada pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC.

Exemplo 16: Elucidar a exigência das substituições T350I, K370T e F405L para o engrenamento da troca do ramo Fab de IgG1 humano.

[00305] Para identificar ainda mais os determinantes no domínio CH3 de IgG1 que são requeridos para que a IgG1 seja engrenada na troca do ramo Fab, IgG1 que contém a mutação tripla T350I-K370T-F405L (ITL) foi comparada com os mutantes duplos T350I-K370T (IT), T350I-F405L (IL) e K370T-F405L (TL). Também o mutante simples F405L (L) foi testado. 2-MEA foi usado como um redutor para induzir a troca do ramo Fab *in vitro* (50 µg de cada anticorpo em 100 µL de PBS/25 mM de 2-MEA por 90 min a 37°C). Para o anticorpo F405L mutante simples, anticorpo não purificado do sobrenadante de uma transfecção transitória foi usado depois da troca de

tampão para PBS usando dispositivos centrífugos Ultra da Amicon (30k, Millipore, cat. no. UFC803096). Para interromper a reação de redução, o agente redutor 2-MEA foi removido pela dessalinização das amostras usando colunas giratórias como descrito no Exemplo 11. A geração de anticorpos biespecíficos foi determinada pela ligação biespecífica medida em um ELISA como descrito no Exemplo 7.

[00306] As mutações triplas (ITL), duplas (IT, IL e TL) e mutação única (L) foram introduzidas em IgG1-2F8. Estes mutantes foram combinados com IgG4-7D8, que contém uma articulação CPSC (do tipo selvagem) ou uma articulação estabilizada (IgG4-7D8-CPPC), para a troca do ramo Fab usando 25 mM de 2-MEA por 90 min a 37°C. A FIGURA 10A-B mostra que os mutantes IgG1-2F8-IL e -TL mostraram a troca do ramo Fab no mesmo nível como o mutante triplo ITL, independente do IgG4-7D8 combinado (articulação CPSC ou CPPC). Ao contrário, nenhuma ligação biespecífica foi encontrada para a combinação com o mutante IgG1-2F8-IT. A FIGURA 10C mostra que também o mutante IgG1-2F8-F405L mostrou a troca do ramo Fab, independente do IgG4-7D8 combinado (articulação CPSC ou CPPC). Estes dados indicam que a mutação F405L é suficiente para engrenar IgG1 humana para a troca do ramo Fab sob as condições mencionadas acima.

Exemplo 17: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em temperaturas diferentes

[00307] A capacidade de 2-MEA para induzir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab entre dois anticorpos diferentes, foi testada em temperaturas diferentes. As reações de troca do ramo Fab foram iniciadas pela incubação de 160 µg de IgG1-2F8-ITL humano com 160 µg de IgG4-7D8-CPPC em 320 µl de PBS/25 mM de 2-MEA (concentração final de 0,5 mg/ml para cada anticorpo) a 0°C, 20°C (temperatura ambiente) ou 37°C. Destas reações, amostras de 20 µL foram tomadas em pontos de tempo diferentes (0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 e 240 min). 20

μL de PBS foram adicionados a cada amostra antes que o agente redutor 2-MEA fosse removido pela dessalinização das amostras usando uma placa de dessalinização giratória de 96 reservatórios Zeba (7k, cat# 89808 Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações de anticorpo total foram determinadas pela medição da absorbância no comprimento de onda de 280 nm usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Países Baixos). As séries de diluição das amostras de anticorpo (concentração de anticorpo total de 0 a 20 μg/ml em diluições de 25 vezes) foram usados em um ELISA para medir a ligação biespecífica como descrito no Exemplo 7.

[00308] A FIGURA 11 mostra que a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL de ser humano e IgG4-7D8-CPPC foi descoberta ser mais eficiente a 37°C, com ligação biespecífica máxima atingida depois de 45 min. Na temperatura ambiente, a geração de anticorpos biespecíficos foi mais lenta, atingindo ligação biespecífica máxima depois de 240 min. A 0°C, nenhuma geração de ligação biespecífica foi observada durante o curso de tempo analisado.

Exemplo 18: Análise de diferentes agentes redutores quanto a sua capacidade para induzir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab *in vitro*

[00309] Foi mostrado acima que 0,5 mM de GSH pode induzir a troca do ramo Fab *in vitro* entre IgG4 de ser humano e IgG1-CPSC-ITL, mas não entre IgG4 de ser humano e IgG1-ITL que contém uma articulação estável (FIGURA 3). Além disso, 2-MEA foi descoberta ser capaz de induzir a troca do ramo Fab entre anticorpos com regiões de articulação estabilizadas, tais como IgG1-ITL x IgG4-CPPC (FIGURA 5). Para testar se outras concentrações de GSH ou 2-MEA ou outros agentes redutores são capazes de induzir a troca do ramo Fab *in vitro* entre dois anticorpos diferentes, a série de

concentração de 2-MEA, GSH e DTT (ditiotreitol) foi testada. Portanto, as combinações de 10 µg de IgG1-2F8-ITL de ser humano e 10 µg de IgG4-7D8-CPPC em 20 µl de PBS (concentração final de 0,5 mg/ml para cada anticorpo) foram incubados a 37°C com a série de concentração dos agentes redutores diferentes (0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 12,5, 25,0 e 50,0 mM). Depois de 90 min, 20 µL de PBS foram adicionados a cada amostra e o agente redutor foi removido pela dessalinização das amostras usando a placa de dessalinização giratória como descrito no Exemplo 17. As concentrações de anticorpo total foram determinadas como descrito no Exemplo 17. A série de diluição das amostras de anticorpo (concentração de anticorpo total de 0 a 20 µg/ml em diluições de 3 vezes) foi usada em um ELISA para medir a ligação biespecífica como descrito no Exemplo 7.

[00310] A FIGURA 12 confirma que 2-MEA induz ligação biespecífica máxima em uma concentração de 25 mM de 2-MEA. DTT foi descoberto ser muito eficaz na geração de anticorpos biespecíficos com ligação biespecífica máxima atingida a 2,5 mM de DTT. As concentrações de GSH na faixa de 0 a 5 mM não foram capazes de induzir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab entre os anticorpos IgG1-ITL e IgG4-CPPC, ambos contendo regiões de articulação estabilizadas. As concentrações de GSH mais altas (12,5 a 50 mM) resultou na formação de agregados de anticorpo, como foi determinado pela SDS-PAGE não redutora (dados não mostrados). Portanto, estas amostras foram excluídas da análise. Estes dados mostram que a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab entre dois anticorpos diferentes pode ser induzida por agentes redutores diferentes.

Exemplo 19: Determinantes na posição IgG1 409 para o engrenamento na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-ITL

[00311] 2-MEA pode induzir a troca do ramo Fab entre IgG1-ITL e

IgG4-CPPC de ser humano, como descrito no Exemplo 11 (FIGURA 5). Os resíduos da interface CH3 de IgG1 e IgG4 de ser humano diferem apenas na posição 409: lisina (K) em IgG1 e arginina (R) em IgG4 (descrito no Exemplo 8, FIGURA 2). Portanto, foi testado se a substituição de lisina na posição 409 pela arginina ou qualquer outro aminoácido (K409X) possibilitaria IgG1 a engrenar na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA com IgG1-ITL. As combinações de 10 µg de IgG1-2F8-ITL de ser humano e 10 µg de IgG1-7D8-K409X em 20 µl de PBS/2-MEA 25 mM (concentração final de 0,5 mg/ml para cada anticorpo) foram incubados por 90 min a 37°C. Os anticorpos não purificados dos sobrenadantes de transfecções transitórias foram usados depois da troca de tampão para PBS usando dispositivos centrífugos Amicon Ultra (30k, Millipore, cat. no. UFC803096). Depois da reação de troca do ramo Fab, 20 µL de PBS foram adicionados a cada amostra e o agente redutor foi removido pela dessalinização das amostras usando a placa de dessalinização giratória como descrito no Exemplo 17. A série de diluição das amostras de anticorpo (concentração de anticorpo total de 0 a 20 µg/ml em diluições de 3 vezes) foram usados em um ELISA para medir a ligação biespecífica como descrito no Exemplo 7.

[00312] A FIGURA 13A mostra os resultados da ligação biespecífica na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG1-7D8-K409X. Na FIGURA 13B, a troca é apresentada como ligação biespecífica em relação a um lote purificado de anticorpo biespecífico derivado de uma troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC, que foi ajustado a 100 %. Estes dados foram também contados como (-) nenhuma troca na ramificação Fab, troca do ramo Fab (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta, como apresentado na Tabela 1. Nenhuma troca do ramo Fab (-) foi encontrada quando a posição 409 em IgG1-7D8 foi K (= IgG1 do tipo selvagem), L ou M. A troca do ramo Fab foi descoberta ser intermediária (+) quando a posição 409 em IgG1-7D8 foi F, I, N ou Y e alta

(++) quando a posição 409 em IgG1-7D8 foi A, D, E, G, H, Q, R, S, T, V ou W.

Tabela 1: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X. a geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X foi determinada por um ELISA intercalado. Troca do ramo Fab (-) nenhuma, (+/-) baixa, (+) intermediária, (++) alta.

	Troca do ramo Fab
IgG1-7D8-K409X	x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

Exemplo 20: A desglicosilação de anticorpo não influencia a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

[00313] Amostras de IgG4-7D8 e IgG4-7D8-CPPC foram desglicosiladas pela incubação de 200 µg de anticorpo durante a noite a 37°C com 0,005 U de N-Glicanase (cat. no. GKE-5006D; Prozyme) em 180 µL de PBS. Estas amostras foram usadas diretamente em uma reação de troca do ramo Fab. A troca do ramo Fab foi realizada pela incubação de 50 µg de cada anticorpo em 100 µl de PBS/25 mM de 2-MEA (concentração final de 0,5 mg/ml para cada anticorpo) por 90 min a 37°C. O agente redutor 2-MEA foi removido pela dessalinização das amostras usando colunas giratórias como descrito no Exemplo 11. A série de diluição das amostras de anticorpo (concentração de anticorpo total de 0 a 20 µg/ml em diluições de 3 vezes)

foram usados em um ELISA intercalado para medir a ligação biespecífica como descrita no Exemplo 7.

[00314] A análise de espectrometria de massa mostrou que a reação de desglicosilação resultou em 100 % de produto de anticorpo desglicosilado (dados não mostrados). A FIGURA 14 mostra que a troca do ramo Fab envolvendo anticorpos desglicosilados não difere da troca do ramo Fab com os anticorpos glicosilados correspondentes (IgG4-2F8 x IgG4-7D8-desglicosilado versus IgG4-2F8 x IgG4-7D8 e IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC-desglicosilado versus IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC). Estes dados indicam que a desglicosilação não afetou a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA.

Exemplo 21: Quantificação da interação CH3-CH3 não covalente

[00315] A concentração das interações na interface CH3 deve ser tal que é possível que ambas as cadeia pesadas nos anticorpos precursores dissociam na reação de troca do ramo Fab e que eles subsequentemente se associam na reação de heterodimerização. Portanto, a correlação entre a capacidade para participar na troca do ramo Fab e a concentração da interação CH3-CH3 não covalente (constante de dissociação, K_D) foi analisada. A troca do ramo Fab induzida por GSH foi realizada como descrito no Exemplo 9 (0,5 mM de GSH a 37°C) para as seguintes combinações de anticorpos humanos:

IgG1-2F8 x IgG1-7D8

IgG1-2F8-CPSC x IgG1-7D8-CPSC

IgG1-2F8-CPSC-T350I x IgG1-CPSC-7D8-T350I

IgG1-2F8-CPSC-K370T x IgG1-7D8-CPSC-K370T

IgG1-2F8-CPSC-ITL x IgG1-7D8-CPSC-ITL

IgG1-2F8-CPSC-K409R x IgG1-7D8-CPSC-K409R

IgG4-2F8 x IgG4-7D8

IgG4-2F8-R409K x IgG4-7D8-R409K

IgG4-2F8-R409A x IgG4-7D8-R409A

IgG4-2F8-R409L x IgG4-7D8-R409L

IgG4-2F8-R409M x IgG4-7D8-R409M

IgG4-2F8-R409T x IgG4-7D8-R409T

IgG4-2F8-R409W x IgG4-7D8-R409W

IgG4-2F8-F405A x IgG4-7D8-F405A

IgG4-2F8-F405L x IgG4-7D8-F405L

IgG4-2F8-Y349D x IgG4-7D8-Y349D

IgG4-2F8-L351K x IgG4-7D8-L351K

IgG4-2F8-E357T x IgG4-7D8-E357T

IgG4-2F8-S364D x IgG4-7D8-S364D

IgG4-2F8-K370Q x IgG4-7D8-K370Q

IgG4-2F8-K370E x IgG4-7D8-K370E

[00316] A geração de anticorpos biespecíficos foi medida pela determinação da ligação biespecífica em um ELISA intercalado como descrito no Exemplo 7. As FIGURAS 15A/B/C mostram os resultados da ligação biespecífica depois da reação de troca do ramo Fab.

[00317] Para medir o efeito das mutações CH3 mencionadas acima sobre a concentração da interação CH3-CH3, fragmentos compostos apenas do domínio CH3-CH2 foram fabricados. A falta de uma região de articulação nestes fragmentos impediu as ligações de dissulfeto intercadeia pesada covalentes. Os fragmentos foram analisados pela espectrometria de massa nativa. As amostras foram trocadas em tampão para 100 mM de acetato de amônio pH 7, usando 10 kDa de colunas de filtro giratórias MWCO. As alíquotas (~1 μL) das amostras diluídas em série (20 μM a 25 nM; equivalente de monômero) foram carregadas dentro de capilares de borossilicato revestidos com ouro para a análise em um espectrômetro de massa LCT (Waters). O sinal de monômero, M_s, foi definido como a área dos picos de monômero como uma fração da área de todos os picos no espectro

($M_s/(M_s+D_s)$ onde D_s = o sinal de dímero). A concentração de monômero no equilíbrio, $[M]_{eq}$, foi definido como $M_s.[M]_0$ onde $[M]_0$ é a concentração de proteína global em termos de monômero. A concentração de dímero no equilíbrio, $[D]_{eq}$, foi definida como $([M]_0-[M]_{eq})/2$. A K_D, foi depois extraída do gradiente de uma plotagem de $[D]_{eq}$ versus $[M]_{eq}^2$. A K_D das interações CH3-CH3 não covalentes é apresentada na Tabela 2.

[00318] A correlação entre a capacidade para engrenar na troca do ramo Fab e a força das interações CH3-CH3 não covalentes foi analisada. As FIGURAS 15D/E mostram a porcentagem de ligação biespecífica depois da troca do ramo Fab plotada contra a K_D medida do fragmento CH2-CH3 correspondente (FIGURA 15D para IgG1; FIGURA 15E para IgG4). Estes dados sugerem que sob as condições testadas existe uma faixa específica de valores de K_D aparentes da interação CH3-CH3 que permite a troca do ramo Fab eficiente.

Tabela 2: A K_D das interações CH3-CH3 não covalentes

Construção CH2-CH3	K_D (M)	vezes-diferença*
G1	$3,0 \times 10^{-9}$	1,0000
G1-T350I	$7,0 \times 10^{-9}$	0,4000
G1-K370T	$4,5 \times 10^{-8}$	0,0700
G1-ITL	$1,0 \times 10^{-6}$	0,0030
G1-K409R	$1,1 \times 10^{-7}$	0,0300
G4	$4,8 \times 10^{-8}$	1,0000
G4-R409K	$8,0 \times 10^{-9}$	6,0000
G4-R409A	$1,6 \times 10^{-7}$	0,3000
G4-R409L	$1,5 \times 10^{-8}$	3,2000
G4-R409M	$3,0 \times 10^{-9}$	16,0000
G4-R409T	$7,2 \times 10^{-7}$	0,0700
G4-R409W	$3,4 \times 10^{-5}$	0,0014
G4-F405A	$1,9 \times 10^{-5}$	0,0025
G4-F405L	$2,5 \times 10^{-5}$	0,0019
G4-L351K	$7,4 \times 10^{-7}$	0,0600
G4-E357T	$4,1 \times 10^{-5}$	0,0012
G4-S364D	$4,7 \times 10^{-8}$	1,0200
G4-K370Q	$1,1 \times 10^{-8}$	4,3000
G4-K370E	$2,0 \times 10^{-9}$	24,0000

* Comparada com os fragmentos CH2-CH3 correspondentes de IgG1 ou IgG4 do tipo selvagem

Exemplo 22: Análise de redutância diferente quanto a sua capacidade para induzir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab *in vitro* entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R

[00319] 2-MEA e DTT foram descobertos induzir a troca do ramo Fab *in vitro* entre IgG1-ITL e IgG4-CPPC de ser humano (FIGURA 12). Foi

testado se estas redutâncias também poderiam induzir a troca do ramo Fab *in vitro* entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R de ser humano. A série de concentração de 2-MEA, DTT, GSH e TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) foi testada. A troca do ramo Fab foi realizada como descrito no Exemplo 18. A série de concentração testada dos agentes redutores diferentes foi como segue: 0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 5,0, 25,0, 50,0 mM de 2-MEA, GSH, DTT ou TCEP.

[00320] A FIGURA 17 confirma que 2-MEA induz a troca do ramo Fab máxima em uma concentração de 25 mM de 2-MEA, que persistiu na concentração mais alta de 50,0 mM de 2-MEA. DTT foi descoberto ser muito eficaz na geração de anticorpos biespecíficos com a troca do ramo Fab máxima atingida a 0,5 mM de DDT, que também persistiu nas concentrações mais altas de DTT (1,0 a 50,0 mM). Também TCEP foi descoberto ser muito eficaz na geração de anticorpos biespecíficos com a troca do ramo Fab máxima atingida a 0,5 mM. Em uma concentração ≥ 25,0 mM, a troca do ramo Fab pela TCEP foi perturbada. As concentrações de GSH na faixa de 0,0 a 5,0 mM não foram capazes de induzir a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab. As concentrações de GSH mais altas (25,0 a 50,0 mM) resultaram na formação de agregados de anticorpo (dados não mostrados). Portanto, estas amostras foram excluídas da análise. Estes dados mostram que a geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab entre dois anticorpos diferentes pode ser induzida por agentes redutores diferentes.

Exemplo 23: Geração de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R

[00321] Para confirmar a formação de anticorpos biespecíficos pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R de ser humano, os pesos moleculares das amostras das reações de troca do ramo Fab com uma série de concentração de 2-MEA foram

determinados pelo ESI-MS. A série de concentração testada foi como segue: 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 25,0 e 40,0 mM de 2-MEA. A troca do ramo Fab (em PBS) e ELISA intercalado foram realizados como descrito no Exemplo 11. ESI-MS foi realizado como descrito no Exemplo 12.

[00322] A FIGURA 18A mostra que 2-MEA induziu a troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R em uma maneira dependente da dose, eficientemente levando à geração de anticorpos biespecíficos com um nível máximo de ligação biespecífica em uma concentração de 15,0 mM de 2-MEA. Os dados de ESI-MS quantificados são apresentados na FIGURA 18B e mostram que a troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R resultou em quase 100 % de anticorpo biespecífico, confirmando os resultados do ELISA de ligação biespecífica.

Exemplo 24: Pureza dos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R de ser humano

[00323] Um lote de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R de ser humano, foi purificado usando uma coluna de dessalinização PD-10 (cat. no. 17-0851-01; GE Healthcare). Em seguida, a pureza do produto biespecífico foi analisada pela espectrometria de massa como descrito no Exemplo 12.

[00324] A FIGURA 19 mostra os perfis de espectrometria de massa dos materiais de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R e o produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. O produto na amostra de troca do ramo Fab é de 146.160,7 kDa, que se iguala com o produto biespecífico derivado de IgG1-2F8-F405L (146.606,8/2=73.303,3) x IgG1-7D8-K409R (146.312,2/2=73.156,1) = 146.459,4 kDa. Além disso, o produto de anticorpo biespecífico mostrou um pico homogêneo, indicando que nenhuma cadeia leve mal emparelhada ocorreu, que teria resultado em picos subdivididos. Estes dados mostram que

a troca do ramo Fab resultou em aproximadamente 100 % de anticorpo biespecífico.

Exemplo 25: Análise *in vivo* da estabilidade e farmacocinéticas de anticorpos biespecíficos gerados a partir de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

[00325] Os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA *in vitro* entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R foram injetados em camundongos SCID para analisar a sua estabilidade (troca do ramo Fab *in vivo*) e propriedades farmacocinéticas como descrito no Exemplo 14. Dois grupos de camundongos (3 camundongos por grupo) foram analisados: (1) 100 µg de anticorpo biespecífico; (2) 100 µg de anticorpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante (IgG4-637, descrita na WO2007068255). As concentrações totais de IgG nas amostras de plasma foram ensaiadas pelo ELISA como descrito no Exemplo 14, com a exceção de que neste exemplo, IgG anti-humano de cabra conjugado com HRP (Jackson, cat. no. 109-035-098, 1/10.000) foi usado como um conjugado para a detecção. A presença de anticorpos biespecíficos nas amostras de plasma foi ensaiada e quantificada pela reatividade biespecífica de CD20 e EGFR em um ELISA intercalado como descrito no Exemplo 14.

[00326] A FIGURA 20A mostra concentrações plasmáticas de anticorpo total com o tempo. A forma das curvas de depuração plasmática foi idêntica em ambos os grupos. A FIGURA 20B mostra as concentrações plasmáticas de anticorpo biespecífico com o tempo. A adição de um excesso de 10 vezes de IgG4 irrelevante ao anticorpo biespecífico não afetou as concentrações de anticorpo biespecífico, indicando que nenhuma troca do ramo Fab ocorreu *in vivo*. Estes dados indicam que o produto de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA *in vitro* entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R, foi estável *in vivo* (nenhuma troca do ramo Fab).

Exemplo 26: Morte de célula mediada por CDC pelos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R de ser humano

[00327] O anticorpo CD20 IgG1-7D8 pode eficientemente matar as células que expressam CD20 pela citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Ao contrário, o anticorpo EGFR IgG1-2F8 não medeia CDC nas célula alvos que expressam EGFR. Foi testado se o IgG1-7D8-K409R mutante e os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R foram ainda capazes de induzir CDC nas células que expressam CD20. 10^5 células Daudi ou Raji foram pré-incubadas por 15 min com uma série de concentração de anticorpo em 80 µL de meio RPMI suplementado com 0,1 % de BSA em um agitador na temperatura ambiente. 20 µL de soro humano normal (NHS) foi adicionado como uma fonte de complemento (20 % de concentração final de NHS) e incubado por 45 min a 37°C. 30 µL de meio RPMI gelado suplementado com 0,1 % de BSA foi adicionado para interromper a reação de CDC. As células mortas e viáveis foram discriminadas pela adição de 10 µL de iodeto de propídio (PI) a 10 µg/ml (1 µg/ml de concentração final) e análise FACS.

[00328] A FIGURA 21 mostra que a morte de célula mediada por CDC de células Daudi (FIGURA 21A) e Raji (FIGURA 21B) que expressam CD20 pelo IgG1-7D8 não foi influenciada pela introdução da mutação K409R. Tanto as células Daudi quanto as Raji não expressam EGFR, resultando na ligação monovalente dos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Não obstante, o anticorpo biespecífico ainda induziu a morte de célula mediada por CDC das células que expressam CD20. Estes dados indicam que a capacidade de CDC de um anticorpo precursor foi retida no formato biespecífico.

Exemplo 27: Morte de célula mediada por ADCC pelos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R de ser humano

[00329] O anticorpo EGFR IgG1-2F8 pode matar células que expressam EGFR, tais como a A431, pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). As células A431 não expressam CD20 e portanto o anticorpo IgG1-7D8 de CD20 não induz ADCC nestas células. Foi testado se o IgG1-2F8-F405L mutante e os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R foram ainda capazes de induzir ADCC nas células A431. Para a isolação de célula efetora, as células mononuclear sanguíneas periféricas (PBMCs) foram isoladas do sangue integral de um doador saudável usando tubos Leucosep® (Greiner Bio-one, cat.# 227290) de acordo com as recomendações do fabricante. As células alvos foram rotuladas pela adição de 100 µCi de ^{51}Cr às 5 x 10^6 células A431 em 1 ml de meio RPMI suplementado com 0,1 % de BSA e incubados por 60 min em um banho de água com agitação a 37°C. As células rotuladas foram lavadas e recolocadas em suspensão em RPMI suplementado com 0,1 % de BSA. 5 x 10^4 célula alvos rotuladas em RPMI suplementado com 0,1 % de BSA foram pré-incubadas em 100 µL por 15 min com a série de concentrações de anticorpo (faixa de 0 a 10 µg/ml de concentração final no ensaio de ADCC em diluições de 3 vezes) na temperatura ambiente. O ensaio ADCC foi iniciado pela adição de 50 µL de células efetoras (5 x 10^6 células) em uma razão de E:T de 100:1. Depois de 4 horas a 37°C, a liberação de ^{51}Cr de experimentos em triplicata foi medida em um contador de cintilação como contagem por min (cpm). A porcentagem da toxicidade celular foi calculada usando a seguinte formula: porcentagem de lise específica = (cpm experimental - cpm basal)/(maximal cpm - cpm basal) X 100. A liberação de ^{51}Cr máxima foi determinada pela adição de 50 µL de Triton X-100 a 5 % a 50 µL de células alvos (5 x 10^4

células), e a liberação basal foi medida na ausência de anticorpo sensibilizante e células efetoras.

[00330] A FIGURA 22 mostra que o anticorpo IgG1-7D8 não induziu ADCC nas células A431 negativas em CD20. Tanto IgG1-2F8 quanto o IgG1-2F8-F405L mutante foram capazes de induzir ADCC nas células A431, indicando que a introdução da mutação F405L em IgG1-2F8 não afetou a sua função efetora de ADCC. Também o derivado de anticorpo biespecífico de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R induziu ADCC nas células A431 em uma maneira dependente da dose, indicando que a função efetora de ADCC foi retida no formato biespecífico.

Exemplo 28: Determinantes na posição 405 de IgG1 para engrenamento na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R

[00331] No exemplo 16 está descrito que a mutação F405L é suficiente para permitir que a IgG1 de ser humano engrene na troca do ramo Fab quando combinada com IgG4-7D8. Para testar ainda os determinantes na posição 405 de IgG1 quanto ao engrenamento na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R de ser humano, todos os mutantes de IgG1-2F8-F405X possíveis (com a exceção de C e P) foram combinados com IgG1-7D8-K409R. O procedimento foi realizado com anticorpos purificados como descrito no Exemplo 19.

[00332] A FIGURA 23 mostra os resultados da ligação biespecífica na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405X x IgG1-7D8-K409R. Estes dados também foram contados como (-) nenhuma troca na ramificação Fab, troca do ramo Fab (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta, como apresentada na Tabela 3. Nenhuma troca do ramo Fab (-) foi encontrada quando a posição 405 em IgG1-2F8 foi F (=IgG1 do tipo selvagem). A troca do ramo Fab foi descoberta ser baixa (+/-) quando a posição 405 em IgG1-2F8 foi G ou R. A troca do ramo Fab foi descoberta ser alta (++) quando a

posição 405 em IgG1-2F8 foi A, D, E, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W ou Y. Estes dados indicam que mutações particulares na posição 405 de IgG1 permite que IgG1 engrene na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA quando combinada com IgG1-K409R.

Tabela 3: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R.

A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA intercalado. Troca do ramo Fab (-) nenhuma, (+/-) baixa, (+) intermediária, (++) alta.

IgG1-2F8-F405X	Troca do ramo Fab x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

Exemplo 29: Determinantes na posição 407 de IgG1 para engrenamento na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R

[00333] No exemplo 28, está descrito que certas mutações únicas na posição F405 são suficientes para permitir que IgG1 de ser humano engrene na troca do ramo Fab quando combinado com IgG1-K409R. Para testar se outros determinantes implicados nas posições da interface Fc:Fc no domínio CH3 também mediariam o mecanismo da troca do ramo Fab, a mutagênese da posição 407 de IgG1 foi realizada e os mutantes foram testados quanto ao engrenamento na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação

com IgG1-K409R de ser humano. Todos os mutantes de IgG1-2F8-Y407X possíveis (com a exceção de C e P) foram combinados com IgG1-7D8-K409R. O procedimento foi realizado com anticorpos purificados como descrito no Exemplo 19.

[00334] A FIGURA 24 mostra os resultados da ligação biespecífica na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-Y407X x IgG1-7D8-K409R. Estes dados foram também contados como (-) nenhuma troca na ramificação Fab, troca do ramo Fab (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta, como apresentado na Tabela 4. Nenhuma troca do ramo Fab (-) foi encontrada quando a posição 407 em IgG1-2F8 foi Y (= IgG1 do tipo selvagem), E, K, Q, ou R. A troca do ramo Fab foi descoberta ser baixa (+/-) quando a posição 407 em IgG1-2F8 foi D, F, I, S ou T e intermediária (+) quando a posição 407 em IgG1-2F8 foi A, H, N ou V, e alta (++) quando a posição 407 em IgG1-2F8 foi G, L, M ou W. Estes dados indicam que mutações únicas particulares na posição 407 de IgG1 permite que IgG1 engrene na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA quando combinada com IgG1-K409R.

Tabela 4: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R

A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA intercalado. troca do ramo Fab (-) nenhuma, (+/-) baixa, (+) intermediária, (++) alta.

IgG1-2F8-Y407X	Troca do ramo Fab x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-

V	+
W	++
Y	-

Exemplo 30: Quantificação da interação de CH3-CH3 não covalente em heterodímeros IgG1

[00335] Está descrito no Exemplo 21 que existe uma faixa específica na força da interação dos homodímeros de CH3-CH3 que permite a troca do ramo Fab eficiente. A forma das interações na interface CH3 deve ser tal que seja possível que ambas as cadeias pesadas nos anticorpos precursores (homodímeros) dissociem-se na reação de troca do ramo Fab e que elas subsequentemente associem-se na reação de hetero-dimerização. Para gerar um heterodímero estável, a força da interação do heterodímero deve ser maior do que a força da interação do homodímero, tal que a mesma favoreça a heterodimerização em relação à homodimerização. Para confirmar isto, a força da interação CH3-CH3 nos heterodímeros foi medida e comparada com a força nos homodímeros. A K_D dos fragmentos de CH2-CH3 derivados dos homodímeros de IgG1-K409R, IgG1-F405L e IgG1-ITL foi medida como descrito no Exemplo 21. Para a determinação da K_D em heterodímeros, fragmentos do domínio CH2-CH3 (G1-F405L e G1-ITL) foram misturados com o fragmento de IgG1Δarticulação de IgG1-7D8-K409R, que contêm todos os domínios de anticorpo exceto a articulação. A falta de regiões de articulação em ambos os fragmentos impediram as ligações de dissulfeto intercadeia pesada covalentes. Os fragmentos foram misturados e analisados depois de 24 horas pela espectrometria de massa nativa como descrito no Exemplo 21. Os valores de K_D das interações CH3-CH3 não covalentes nos fragmentos CH2-CH3 indicados ou misturas de fragmentos CH2-CH3 com IgG1Δarticulação são apresentados na Tabela 5. Estes dados sugerem que sob as condições testadas, a força da interação de heterodímero é maior (K_D mais baixa) do que as interações de homodímero correspondentes.

Tabela 5

Construção CH2-CH3/ (IgG1Δarticulação)	Interação	K_D (M)
G1-F405L/G1-K409R	Heterodímero	$1,2 \times 10^{-8}$
G1-ITL/G1-K409R	Heterodímero	$1,7 \times 10^{-8}$

G1-K409R	Homodímero	$1,1 \times 10^{-7}$
G1-F405L	Homodímero	$8,5 \times 10^{-7}$
G1-ITL	Homodímero	$1,2 \times 10^{-6}$

Exemplo 31: Análise bioquímica de um anticorpo biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

[00336] Um lote de anticorpo biespecífico, gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R de ser humano, foi purificado em uma coluna de dessalinização PD-10 (cat. no. 17-0851-01; GE Healthcare). Em seguida, a pureza do produto biespecífico foi analisada pela eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HP-S), espectrometria de massa, HPLC cromatografia de troca de cátion (HPLC-CIEX), isoeletrofocalização capilar (cIEF).

[00337] A SDS-PAGE foi realizada sob condições não redutoras (FIGURA 25A) e redutoras (FIGURA 25B) como descrito no Exemplo 15. A FIGURA 25A mostra que a amostra de anticorpo depois da troca do ramo Fab induzida por 2-MEA consiste de IgG intacto, com um traço de meias moléculas (H1L1) detectáveis no gel não reduzido.

[00338] A HP-S foi realizada como descrito no Exemplo 15. A FIGURA 26(B) e FIGURA 26(A) mostram os perfis de HP-S dos materiais de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. A mistura (1:1) de ambos anticorpos e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R é mostrada na FIGURA 26C e FIGURA 26D, respectivamente. Além disso, a FIGURA 26D mostra que >99 % da amostra consiste de IgG intacta praticamente sem nenhum agregado formado.

[00339] A Espectrometria de massa (ESI-MS) foi realizada como descrita no Exemplo 12. A FIGURA 27(B) e FIGURA 27(A) mostram os perfis da espectrometria de massa dos materiais de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. A mistura (1:1) de ambos anticorpos e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA

entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R é mostrada na FIGURA 27C e FIGURA 27D, respectivamente. O produto na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA da amostra é de 146.159,7 kDa, que perfeitamente se iguala com o produto biespecífico derivado de IgG1-2F8-F405L (146.289,0/2 = 73.145) x IgG1-7D8-K409R (146.028,0/2 = 73,014). Além disso, o produto de anticorpo biespecífico mostrou um pico homogêneo, indicando que nenhum mau emparelhamento da cadeia leve ocorreu, que teria resultado em picos subdivididos. Estes dados mostram que a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA resultou em IgG biespecífico. Os picos pequenos indicados por (*) resultaram da desglicosilação incompleta antes da análise. Estes dados mostram que uma amostra de anticorpo biespecífico foi gerada pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

[00340] A isoeletrofocalização capilar (cIEF) foi realizada usando um Analisador iCE280 (Convergent Biosciences). A FIGURA 28A e a FIGURA 28B mostram perfis de cIEF dos materiais de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. A mistura (1:1) de ambos anticorpos e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R são mostrados na FIGURA 28C e FIGURA 28D, respectivamente. Todas as amostras foram dessalinizadas antes do uso. As concentrações finais na mistura de ensaio foram de 0,3 mg/ml de IgG (0,35 % de Metil Celulose; 2 % de Anfólitos Carregadores 3-10; 6 % de Anfólitos Carregadores 8-10,5; 0,5 % de marcador pI 7,65 e 0,5 % de marcador pI 10,10). A focalização foi realizada por 7 min a 3000 V e a imagem de absorção capilar inteira foi capturada por uma câmara de dispositivo ligada à carga. Depois da calibração dos perfis de pico, os dados foram analisados pelo software EZChrom. Os marcadores de pI são indicados por (*). Estes dados mostram que uma amostra de anticorpo biespecífico foi gerada pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

[00341] Uma outra técnica para estudar as isoformas carregadas de

anticorpos monoclonais é a Troca de Cátion pela Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC-CIEX). A FIGURA 29A e FIGURA 29B mostram perfis de HPLC-CIEX dos materiais de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. A mistura (1:1) de ambos anticorpos e do produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R é mostrada na FIGURA 29C e FIGURA 29D, respectivamente. As amostras foram diluídas a 1 mg/ml na fase móvel A (10 mM de $NaPO_4$, pH 7,0) para injeção na HPLC. As moléculas de IgG diferentemente carregadas foram separadas pelo uso de uma coluna analítica ProPac® WCX-10, 4 mm x 250 mm, com uma taxa de fluxo de 1 ml/min. A elução foi realizada com um gradiente da Fase móvel A para a Fase móvel B (10 mM de $NaPO_4$, pH 7,0, NaCl 0,25 M) e a detecção ocorreu a 280 nm. Estes dados mostram que uma amostra de anticorpo biespecífico foi gerada pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Também mostram que a troca de cátion é uma ferramenta poderosa para separar homodímeros residuais do heterodímero. Uma outra aplicação da cromatografia de troca de cátion é portanto o polimento de um heterodímero biespecífico, isto é purificar quaisquer homodímeros residuais depois da troca.

Exemplo 32: Expressão recombinante de heterodímeros por coexpressão simultânea de ambos os homodímeros

[00342] Para ilustrar que a formação de heterodímero também ocorre quando os dois homodímeros são coexpressados recombinantemente, células HEK-293F foram cotransfectadas com os quatro vetores de expressão (ver o exemplo 1) que codificam a cadeia pesada e leve de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405 em uma razão de 1:1:1:1. Os anticorpos foram transitoriamente produzidos sob condições isentas de soro como descrito no Exemplo 4. Em seguida, IgG foi purificada pela cromatografia de proteína A como descrito no Exemplo 5. A IgG purificada foi desglicosilada e

subsequentemente analisada por espectrometria de massa com ionização por eletropulverização como descrito no Exemplo 12.

[00343] A massa teórica da cadeia pesada e leve de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405 são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6: Massa teórica da cadeia pesada e leve de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405

Homodímero	Cadeia L (Da)	Cadeia H (Da)
IgG1-2F8-F405	23252,8	49894,6
IgG1-7D8-K409R	23438,1	49579,0

[00344] Na base destas massas, as seguintes moléculas de IgG poderiam teoricamente ser detectadas (Tabela 7). As massas medidas (FIGURA 30) são indicadas na coluna final.

Tabela 7: Detecção teórica da cadeia pesada e leve de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F40

IgG1-2F8-F405		IgG1-7D8-K409R		Massa teórica (Da)	Massa medida (Da)
Cadeia H	Cadeia L	Cadeia H	Cadeia L		
2	2			146287	146284
		2	2	146026	146026
2			2	146657	146664
	2	2		145656	145660
2	1		1	146472	146477
	1	2	1	145841	145846
1	1	1	1	146157	146159
1	2	1		145971	145972
1		1	2	146342	146345

[00345] Os dois picos mais abundantes de 146345 e 146159 Da reapresentaram heterodímeros com uma única cadeia (de IgG1-7D8-K409R) ou ambas as cadeias leves incorporadas, respectivamente. Homodímeros tanto da cadeia pesada de IgG1-7D8-K409R quanto de IgG1-2F8-F405 foram detectados, mas apenas em quantidades menores. Estes dados mostram que a heterodimerização também ocorre quando os dois homodímeros são coexpressados.

Exemplo 33: Monitoramento da cinética de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA e quantificação de homodímeros residuais depois da troca pelo uso de HPLC-CIEX

[00346] A geração de anticorpos biespecíficos por troca do ramo Fab induzida por 2-MEA é descrita no Exemplo 11. Neste exemplo a troca reação

foi monitorada conduzindo-se Troca de Cátion com Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC-CIEX; como descrito no Exemplo 31) em vários pontos no tempo durante a reação de troca.

[00347] Homodímeros IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R foram misturados na razão molar 1:1 em uma concentração de 1 mg/ml cada. Depois da adição de 25 mM de 2-MEA, a amostra foi colocada no autoamostrador da HPLC, pré-aquecido a 25°C. A FIGURA 31A às 31H mostra oito injeções consecutivas em diferentes intervalos de tempo obtidos por HPLC-CIEX variando de t = 0 min a t = 450 min, respectivamente, depois da adição de 2-MEA. Os dados mostram que IgG biespecífica foi formada de preferência rapidamente e a maioria do homodímero foi trocada depois de 135 min. Os picos heterodiméricos heterogêneos que aparecem depois de 45 min resolveram em picos mais homogêneos depois de aproximadamente 180 min, sugerindo que a troca ocorre em diferentes fases. Além disso, a FIGURA 32A mostra que aproximadamente 3 % dos homodímeros residuais foram detectados com o método CIEX (indicado por setas). Como mostrado este método é adequado para quantificar o teor de homodímero remanescente (a elução dos homodímeros é mostrada na FIGURA 32B) quando a reação de troca foi quase completa).

Exemplo 34: Geração de anticorpos biespecíficos por troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em concentrações de anticorpo altas em várias concentrações de 2-MEA, temperaturas e tempos de incubação

[00348] A troca do ramo Fab induzida por 2-MEA foi realizada em concentrações de IgG altas. A influência da concentração de 2-MEA, temperatura de incubação e tempo sobre a quantidade de troca foi estudada.

[00349] O processo de troca foi realizado usando a combinação de IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L. Ambos os materiais foram purificados com cromatografia por afinidade usando proteína A. Depois da concentração do material até > 20 mg/ml, uma etapa de troca de ânion sucessiva foi

realizada (em modo de fluxo) usando HiPrep Q FF 16/10 (GE Health Care, #28-9365-43). O material purificado final foi trocado por tampão para PBS.

[00350] A troca biespecífica foi estudada em concentrações de IgG finais de 20 mg/ml (cada homodímero em uma concentração final de 10 mg/ml) e 10 mg/ml (cada homodímero em uma concentração final de 5 mg/ml) em PBS. Misturas separadas foram preparadas para ambas as concentrações de IgG incluindo 2-MEA em concentrações finais de 10, 25, 50 e 100 mM. As misturas foram divididas em alíquotas de 100 µL em tubos eppendorf e armazenadas a 15, 25 e 37°C. Tubos separados foram usados para diferentes tempos de incubação de 90 min, 5 horas e 24 horas em cada temperatura.

[00351] A mistura também foi preparada sem 2-MEA para ambas as concentrações de IgG e armazenada a 4°C como um controle não tratado. Depois dos tempos de incubação apropriados, as amostras de 90 min e 5 horas foram coletadas para dessalinização para remover o 2-MEA (as amostras de 90 min foram inicialmente colocadas em gelo para parar a reação de troca). As amostras foram dessalinizadas usando uma placa de dessalinização de 96 reservatórios Zeba (7k, cat# 89808, Thermo Fisher Scientific). As amostras de 24 horas foram dessalinizadas separadamente depois da incubação de 24 horas.

[00352] Diluições seriais das amostras de anticorpo (concentração total de anticorpo de 10 a 0,123 µg/ml em diluições de 3 vezes para as amostras de 90 min e 5 horas; 10 a 0,041 µg/ml em diluições de 3 vezes para as amostras de 24 horas) foram usadas em um ELISA sanduíche para medir a ligação biespecífica como descrito no Exemplo 7. Para cada placa, um controle foi incluído de um lote purificado de anticorpo biespecífico derivado de uma troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC (como descrito no Exemplo 15). A FIGURA 34(A) a (F) mostra os resultados da ligação biespecífica como medido nas placas de ELISA

individuais. Os valores de OD405 de topo (como determinado para as concentrações de 10 μg/ml no ELISA) foram usados para calcular a ligação biespecífica em comparação ao controle, que foi arbitrariamente ajustado em 100 %. Isto resultou na porcentagem de troca do ramo Fab controlada (% de cFAE) comparado ao controle como é mostrado na FIGURA 34(A) a (D) para cada concentração de 2-MEA.

[00353] Os dados mostram que o nível máximo de ligação biespecífica (89 a 109 % com respeito ao controle) foi atingido em uma concentração de 100 mM de 2-MEA para ambas as concentrações de IgG em todas as condições de temperatura-tempo. Em 50 mM de 2-MEA, a ligação máxima (88 a 107 %) foi obtida a 25°C e 37°C e também a 15°C depois da incubação de 24 horas. Para as concentrações mais baixas de 25 mM e 10 mM de 2-MEA, a troca foi mais eficiente em temperaturas mais altas e aumentou com o tempo de incubação prolongado, levando à troca máxima a 37°C na incubação de 24 horas em 25 mM de 2-MEA. Nenhuma das condições testadas em 10 mM de 2-MEA gerou 100 % de produto biespecífico. O processo de troca foi levemente mais rápido em concentrações de IgG de 10 mg/ml comparado a 20 mg/ml de IgG total.

[00354] Para confirmar que os anticorpos biespecíficos foram formados e para estudar os produtos biespecíficos em mais detalhe, amostras foram analisadas com análise de Troca de Cátion (HPLC-CIEX). A análise de HPLC-CIEX foi realizada como descrito no Exemplo 31 para as amostras com concentrações de IgG de 20 mg/ml depois de 5 horas e incubação de 24 horas e todas as concentrações de 2-MEA.

[00355] Os cromatogramas de CIEX na FIGURA 35(A) a (D) mostram que o rendimento mais alto do produto biespecífico foi obtido em 50 e 100 mM de 2-MEA confirmando os resultados do ELISA biespecífico. Entretanto, quantidades menores de homodímero residual ainda foram detectadas em 50 e 100 mM de 2-MEA (2 a 3,5 % de cada homodímero para as amostras

incubadas a 25°C e 37°C). A troca em temperatura mais alta, tempo de incubação mais longo (24 horas) e concentração de 2-MEA crescente resultam no aparecimento de picos adicionais em 22 a 24 min no perfil de CIEX.

[00356] Quantidades mínimas de picos adicionais foram obtidas quando a troca foi concluída dentro de 5 horas. Para identificar a natureza destes picos, análise de SDS-PAGE e análise de HP-S foram realizadas. HP-S mostrou que a quantidade de agregados foi abaixo de 1 % para todas as condições, sugerindo que a picos adicionais não representam agregados. Entretanto, SDS-PAGE não reduzida indicou que os picos extras podem representar o heterodímero que carece de uma ou duas cadeias leves. Quantidades menores de semimoléculas foram detectadas como reservatório.

[00357] O experimento mostra que a reação de troca ocorre em concentrações de homodímero altas, o que torna o processo atrativo para escala comercial, e que o rendimento do anticorpo biespecífico depende da concentração de 2-MEA, temperatura e tempo de incubação.

Exemplo 35: Determinantes na posição 368 de IgG1 para o comprometimento com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R

[00358] Os exemplos 28 e 29 mostram que certas mutações únicas na posição F405 e Y407 são suficientes para permitir que IgG1 humana se comprometa com troca do ramo Fab quando combinada com IgG1-K409R. Como ilustrado neste exemplo outros determinantes implicados nas posições de interface Fc:Fc no domínio CH3 podem também mediar o mecanismo de troca do ramo Fab. Para este efeito a mutagênese da posição 368 de IgG1 foi realizada e os mutantes foram testados quanto ao comprometimento com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R humana. Todos os mutantes de IgG1-2F8-

L368X possíveis (com a exceção de C e P) foram combinados com IgG1-7D8-K409R. O procedimento foi realizado com anticorpos purificados como descrito no Exemplo 19.

[00359] A FIGURA 36 mostra os resultados da ligação biespecífica na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-L368X x IgG1-7D8-K409R. Estes dados também foram registrados como (-) nenhuma troca na ramificação Fab, troca do ramo Fab (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta, como apresentado na Tabela 8. Nenhuma troca do ramo Fab (-) foi encontrada quando a posição 368 em IgG1-2F8 foi L (= IgG1 do tipo selvagem), F ou M. A troca do ramo Fab foi descoberta ser baixa (+/-) quando a posição 368 em IgG1-2F8 foi Y. A troca do ramo Fab foi descoberta ser intermediária (+) quando a posição 368 em IgG1-2F8 foi K e alta (++) quando a posição 368 em IgG1-2F8 foi A, D, E, G, H, I, N, Q, R, S, T, V, ou W. Estes dados indicam que mutações particulares na posição 368 de IgG1 permitem que a IgG1 se comprometa com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA quando combinada com IgG1-K409R.

Tabela 8: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-L368X e IgG1-7D8-K409R

A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-L368X e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA sanduíche. Troca do ramo Fab (-) ausente, (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta.

	troca do ramo Fab troca do ramo Fab
IgG1-2F8-L368X	x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++

T	++
V	++
W	++

Exemplo 36: Determinantes na posição 370 de IgG1 para o comprometimento com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R

[00360] Os exemplos 28, 29 e 35 mostram que certas mutações únicas em posições F405, Y407 ou L368 são suficientes para permitir que IgG1 humana se comprometa com a troca do ramo Fab quando combinada com IgG1-K409R. Como ilustrado neste exemplo outros determinantes implicados nas posições de interface Fc:Fc no domínio CH3 também podem mediar o mecanismo de troca do ramo Fab. Para este efeito a mutagênese da posição 370 de IgG1 foi realizada e os mutantes foram testados quanto ao comprometimento com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R humana. Todos os mutantes de IgG1-2F8-K370X possíveis (com a exceção de C e P) foram combinados com IgG1-7D8-K409R. O procedimento foi realizado com anticorpos purificados como descrito no Exemplo 19.

[00361] A FIGURA 37 mostra os resultados da ligação biespecífica na troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-K370X x IgG1-7D8-K409R. Estes dados também foram registrados como (-) nenhuma troca na ramificação Fab, troca do ramo Fab (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta, como apresentado na Tabela 9. Nenhuma troca do ramo Fab (-) foi encontrada quando a posição 370 em IgG1-2F8 foi K (= IgG1 do tipo selvagem), A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V ou Y. Apenas a substituição de K370 com W resultou em troca do ramo Fab intermediária (+). Estes dados indicam que apenas uma mutação na posição 370 de IgG1 (K370W) permite que IgG1 se comprometa com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA quando combinada com IgG1-K409R.

Tabela 9: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-K370X e IgG1-7D8-K409R

A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-K370X e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA sanduíche. Troca do ramo Fab (-) ausente, (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta.

	troca do ramo Fab
IgG1-2F8-K370X	x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

Exemplo 37: Determinantes na posição 399 de IgG1 para o comprometimento com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R

[00362] Os exemplos 28, 29, 35 e 36 mostram que certas mutações únicas nas posições F405, Y407, L368 ou K370 são suficientes para permitir que IgG1 humana se comprometa com a troca do ramo Fab quando combinada com IgG1-K409R. Como ilustrado neste exemplo outros determinantes implicados nas posições de interface Fc:Fc no domínio CH3 também podem mediar o mecanismo de troca do ramo Fab. Para este efeito a mutagênese da posição 399 de IgG1 foi realizada e os mutantes foram testados quanto ao comprometimento com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA em combinação com IgG1-K409R humana. Todos os mutantes de IgG1-2F8-D399X possíveis (com a exceção de C e P) foram combinados com IgG1-7D8-K409R. O procedimento foi realizado com anticorpos purificados como descrito no Exemplo 19.

[00363] A FIGURA 38 mostra os resultados da ligação biespecífica na

troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-D399X x IgG1-7D8-K409R. Estes dados também foram registrados como troca do ramo Fab (-) ausente, (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta, como apresentado na Tabela 10. Nenhuma troca do ramo Fab (-) foi encontrada quando a posição 399 em IgG1-2F8 foi D (= IgG1 do tipo selvagem), E e Q. A troca do ramo Fab foi descoberta ser baixa (+/-) quando a posição 399 em IgG1-2F8 foi V, intermediária (+) quando a posição 399 em IgG1-2F8 foi G, I, L, M, N, S, T ou W. A troca do ramo Fab foi descoberta ser alta (++) quando a posição 399 em IgG1-2F8 foi A, F, H, K, R ou Y. Estes dados indicam que mutações particulares na posição 399 de IgG1 permitem que a IgG1 se comprometa com a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA quando combinada com IgG1-K409R.

Tabela 10: Troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-D399X e IgG1-7D8-K409R

A geração de anticorpos biespecíficos depois da troca do ramo Fab *in vitro* induzida por 2-MEA entre mutantes de IgG1-2F8-D399X e IgG1-7D8-K409R foi determinada por um ELISA sanduíche. Troca do ramo Fab (-) ausente, (+/-) baixa, (+) intermediária ou (++) alta.

IgG1-2F8-D399X	troca do ramo Fab x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

Exemplo 38: Determinação da faixa de condição em que a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA ocorre subidealmente para

discriminar entre mutantes de IgG1 altamente eficientes

[00364] O processo de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA ocorre eficientemente a 37°C quando 25 mM de 2-MEA são usados. Sob estas condições, a maioria de mutantes de IgG1 permissivos (IgG1 com certas mutações únicas nas posições 368, 370, 399, 405 e 407 e/ou 409 como descrito nos Exemplos 19, 28, 29, e 35-37) mostra níveis altos de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA (80 % a 100 %). Para identificar condições experimentais que permitiriam a discriminação entre os mutantes de IgG1 com a eficiência mais alta, o ramo Fab induzido por 2-MEA para quatro combinações de mutante diferentes (IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G, IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H e IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R) foi estudado com o tempo a 15°C e 20°C, respectivamente. A parte de mudanças na temperatura, período de tempo e diluição do anticorpo (20, 2, 0,2 e 0,02 µg/ml) o procedimento foi realizado como descrito no Exemplo 19.

[00365] A 20°C a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA das quatro combinações de mutante ocorreu em diferentes taxas comparado à troca máxima (controle positivo). Depois da incubação de 105 min IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H atingiram o nível máximo de troca, ao passo que IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G e IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R atingiram um máximo de 90 %, 85 % e 85 %, respectivamente, depois de 200 min.

[00366] A incubação das diferentes combinações de mutante de IgG1 a 15°C mostrou as diferenças mais proeminentes nas taxas de troca (mostradas na FIGURA 39). Depois das incubações de 60 e 105 min, a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA, as diferenças entre as quatro combinações de mutante foram mais extremas. A troca do ramo Fab depois da incubação de 200 min mostrou eficiências de 100 % (IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H), 85 % (IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-

K409G) ou 65 % (IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A) comparado ao controle positivo.

Exemplo 39: Análise das eficiências da troca do ramo Fab induzida por 2-MEA de mutantes em condições subideais

[00367] O processo de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA ocorre eficientemente a 37°C quando 25 mM de 2-MEA são usados. Sob estas condições, a maioria de mutantes de IgG1 permissivos (IgG1 com certas mutações únicas nas posições 368, 370, 399, 405 e 407 e/ou 409 como descrito nos Exemplos 19, 28, 29, e 35-37) mostra níveis altos de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA (80 a 100 %). No exemplo 38 é descrito que as diferenças nas eficiências da troca do ramo Fab induzida por 2-MEA são mais pronunciadas depois da incubação nas assim chamadas condições subideais, isto é, a 15°C por 60 até 105 min. Em total, 24 mutantes de IgG1-2F8 no L368, D399, F405 e Y407 (ver a Tabela 11) que mostram > 90 % de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA com IgG1-7D8-K409R (exemplo 28, 29, e 35 a 37) foram selecionados e submetidos à análise de troca do ramo Fab com IgG1-7D8-K409A, G, H ou R (com base nos resultados relatados no Exemplo 19). Para categorizar estas combinações de mutante em suas eficiências para gerar anticorpos biespecíficos, a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA foi realizada a 15°C por 90 min (condições subideais). Dois mutantes de IgG1-2F8 Y407Q e D399Q) que mostraram troca do ramo Fab induzida por 2-MEA fraca depois da incubação com IgG1-7D-K409R (exemplo 29 e 37) foram tomados junto com controles negativos adicionais e usados para estudar se incubação com um outro aminoácido na posição K409 (G, H, ou W) leva a um resultado diferente. A parte de uma mudança na temperatura e mudanças na diluição do anticorpo (20, 2, 0,2 e 0,02 μg/ml), o procedimento foi realizado como descrito no Exemplo 19.

[00368] A incubação de todos as combinações de mutantes de IgG1 diferentes (como torna-se claro a partir da Tabela 11) a 15°C por 90 min

mostrou uma faixa de eficiências de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA diferentes. O resultado da ligação biespecífica em uma concentração de anticorpo de 20 µg/ml, é mostrado na Tabela 11. os resultados foram categorizados em 4 classes; eficiência de ligação biespecífica ausente (-), baixa (+/-) intermediária (+) e alta (++) como é especificado na legenda abaixo para a Tabela 11. A partir destes resultados torna-se claro que sob condições subideais algumas combinações de mutações de aminoácido em moléculas de IgG1 serão favoráveis para a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA.

Tabela 11: Ligação biespecífica (% em relação ao controle positivo) entre mutantes de IgG1 permissivos (20 µg/ml) a 15°C por 90 min

troca do ramo Fab	IgG1-7D8-K409A	IgG1-7D8-K409G	IgG1-7D8-K409R	IgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-L368A	33	33	25	37
IgG1-2F8-L368D	49	50	41	54
IgG1-2F8-L368E	32	38	37	42
IgG1-2F8-L368G	46	53	44	53
IgG1-2F8-L368H	26	25	21	29
IgG1-2F8-L368N	47	52	43	54
IgG1-2F8-L368R	55	64	52	91
IgG1-2F8-L368S	39	45	37	53
IgG1-2F8-L368T	42	51	39	56
IgG1-2F8-L368V	42	49	33	51
IgG1-2F8-L368W	56	56	41	60
IgG1-2F8-D399F	13	15	14	15
IgG1-2F8-D399H	12	14	10	19
IgG1-2F8-D399K	40	43	34	46
IgG1-2F8-D399R	47	45	38	52
IgG1-2F8-D399Q	0	0	0	0
IgG1-2F8-F405I	32	49	39	60
IgG1-2F8-F405K	29	48	47	40
IgG1-2F8-F405L	31	44	39	46
IgG1-2F8-F405S	34	51	45	39
IgG1-2F8-F405T	35	47	42	46
IgG1-2F8-F405V	36	46	37	43
IgG1-2F8-F405W	17	20	16	18
IgG1-2F8-Y407L	44	41	49	49
IgG1-2F8-Y407W	48	53	47	62
IgG1-2F8-Y407Q	4	9	1	44

Legenda para a Tabela 11
Nenhuma ligação biespecífica (-) (0 a 3 %)
Ligação biespecífica baixa (+/-) (4 a 39 %)
Ligação biespecífica intermediária (+) (40 a 69 %)
Ligação biespecífica alta (++) (70 a 100 %)

[00369] Das moléculas de IgG1-2F8 mutadas testadas (Tabela 11), seis foram selecionadas para uma segunda análise para confirmar os resultados obtidos antes (Tabela 11). Vários mutantes foram selecionados quanto à sua eficiência de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA alta (IgG1-2F8-L368R)

e intermediária (IgG1-2F8-L368W, IgG1-2F8-F405I, IgG1-2F8-F405L e IgG1-2F8-Y407W). Também IgG1-2F8-Y407Q foi analisada por um segunda vez visto que ela mostrou uma reação de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA positiva inesperada com IgG1-7D8-K409H. Em geral, estes resultados, apresentados na FIGURA 40, confirmaram a análise primária (Tabela 11) e mostram que as reações de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA de moléculas de IgG1-2F8 mutadas com IgG1-7D8-K409H mostrou a eficiência mais alta. Além disso, reações de troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre moléculas de IgG1-2F8 mutadas com IgG1-7D8-K409R que são relatadas nos Exemplos 28, 29, e 35 a 37 como negativas são ainda de interesse como potencialmente promovendo a troca do ramo Fab induzida por 2-MEA de IgG1.

Exemplo 40: Usando o formato biespecífico para remover atividade agonística indesejada de anticorpos de c-Met antagonísticos convertendo-os em um formado biespecífico, monovalente

[00370] Vários anticorpos bivalentes desenvolvidos para terapia de anticorpo monoclonal mostram atividade agonística indesejável na ligação ao seu alvo. Este também é o caso para a maioria de anticorpos com base em IgG1 que alvejam a tirosina cinase do receptor c-Met. Estes anticorpos agonísticos induzem a dimerização do receptor seguido por ativação de várias vias de sinalização a jusante. Como um resultado, crescimento e diferenciação de células (tumor) são induzidos. O uso de formatos de anticorpo monovalente pode impedir a indução de dimerização do receptor. A combinação de um ramo Fab de anticorpo anti-c-Met com um ramo Fab de um anticorpo irrelevante resulta em um anticorpo biespecífico que é funcionalmente monovalente e portanto completamente antagonístico. Aqui nós combinamos um anticorpo agonístico parcial (IgG1-069) ou um completo (IgG1-058), com IgG1-b12 (primeiro descrito em Burton DR, *et al*, “Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human

monoclonal antibody", Science. 11 de Nov de 1994; 266(5187):1024-1027) em anticorpos biespecíficos. IgG1-b12 foi considerada como um anticorpo que não de ligação irrelevante visto que ele é elevado contra uma proteína viral (HIV-gp120). Os anticorpos anti-c-Met usados neste exemplo são anticorpo humanos completamente monoclonais gerados em camundongos transgênicos. IgG1-058 e IgG1-069 ligam-se a epítopos diferentes em c-Met.

[00371] Os dois anticorpos anti-c-Met usados são anticorpos de IgG1,κ sendo modificados em suas regiões Fc como ainda divulgado. Eles têm as seguintes sequências variáveis de cadeia pesada e cadeia leve.

058:

VH 058	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLE WVATISDDGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTA MYYCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSS
VL 058	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQI TFGQGTRLEIK

069:

VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLE WMGWISAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSS
VL 069	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLL IYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPIT FGQGTRLEIK

Fosforilação de Receptor

[00372] Os anticorpos c-Met biespecíficos monovalentes foram gerados por uma reação de troca do ramo Fab com IgG1-058-F405L ou IgG1-069-F405L e IgG1-b12-K409R como descrito no Exemplo 23 usando 25 mM de 2-MEA. O efeito do anticorpo biespecífico na fosforilação c-Met foi avaliada. Na dimerização de dois receptores de c-Met adjacentes pelo ligando natural HGF ou pelos anticorpos bivalentes agonísticos, três resíduos de tirosina (posição 1230, 1234 e 1235) no domínio intracelular de c-Met são fosforilados cruzados. Isto leva à fosforilação de vários outros aminoácidos no domínio intracelular de c-Met e ativação de várias cascatas de sinalização. A dimerização e ativação de c-Met podem ser monitoradas pelo uso de anticorpos específicos para o receptor fosforilado nestas posições, que funciona como uma leitura para o agonismo potencial de

anticorpos anti-c-Met.

[00373] As células A549, CCL-185 obtidas da ATCC, foram cultivadas em soro contendo meio DMEM até que 70 % de confluência fossem atingidos. As células foram tripsinizadas, lavadas e plaqueadas em uma placa de cultura de 6 reservatórios a 1*10e6 células/reservatório em soro contendo meio de cultura. Depois da incubação durante a noite as células foram tratadas com HGF (R&D systems; cat. 294-HG) (50 ng/ml) ou o painel de anticorpos (30 µg/ml) e incubados por 15 minutos a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisado com tampão de lise (Cell Signaling; cat. 9803) suplementado com um coquetel inibidor de protease (Roche; cat. 11836170001). As amostras de lisado de célula foram armazenadas a -80°C. A ativação de receptor foi determinada pela detecção da fosforilação de c-Met em Western blot usando anticorpos específicos de fosfo c-Met. As proteínas presentes no lisado de célula foram separadas em um gel de SDS-PAGE de 4 a 12 % e transferidos para membrana de nitrocelulose que foi subsequentemente tingida com um anticorpo específico para c-Met fosforilado (Y1234/1235) (Cell Signaling, cat: 3129). Como um controle para o carregamento em gel os níveis totais de β-actina e c-Met foram determinados usando anti c-Met (Cell Signaling, Cat. No. 3127) e anticorpos anti β-actina (Cell Signaling, Cat. No. 4967). Os resultados das Western blots são mostrados na FIGURA 41.

[00374] Os controles do meio de cultura de tecido e células tratadas com o formato monovalente Unibody® (Genmab, WO2007059782 e WO2010063785) de anticorpo 5D5 (Genentech; WO 96/38557) não mostram nenhuma fosforilação do receptor de c-Met. O formato de Unibody monovalente como aqui usado é um IgG4, em que a região de articulação foi apagada e em que a região CH3 foi mutada nas posições 405 e 407. Ao contrário, a análise de Western blot das células tratadas com o HGF de controle positivo ou anticorpo agonístico IgG1-058 mostrou uma faixa clara

na altura esperada do c-Met fosforilado. O anticorpo agonístico parcial IgG1-069 mostrou menos fosforilação de receptor, porém detectável indicando que alguma ligação cruzada do receptor ocorre. Entretanto, tanto IgG1 058/b12 biespecífico quanto 069/b12 biespecífico não induziu a fosforilação de c-Met de nenhum modo, mostrando que a atividade agonística associada com os anticorpos precursores foi completamente ausente (FIGURA 41).

Efeito dos anticorpos c-Met sobre a proliferação de NCI-H441 *in vitro*

[00375] A atividade agonística proliferativa potencial de anticorpos c-Met foi testada *in vitro* na linhagem de célula de adenocarcinoma de pulmão NCI-H441 (ATCC, HTB-174®). Esta linhagem de célula expressa altos níveis de c-Met, mas não produz o seu ligando HGF. As células NCI-H441 foram semeadas em uma placa de cultura de tecido de 96 reservatórios (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemanha) (5.000 células/reservatório) em RPMI (Lonza) sem soro. O anticorpo anti c-Met foi diluída a 66,7 nM em meio RPMI sem soro e adicionado às células. Depois de sete dias de incubação a 37°C/5 % de CO_2, a quantidade de células viáveis foi quantificada com Azul de Alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acordo com a instrução do fabricante. A fluorescência foi monitorada usando a leitora EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlândia) com ajustes de Azul de Alamar padrão.

[00376] Em contradição ao IgG1-069, nenhuma proliferação foi induzida na incubação de células NCI-H441 com o IgG1-069/b12 biespecífico, como é mostrado na FIGURA 42. Também o controle Unibody-069 não induziu a proliferação, que foi comparável ao não tratado ou tratado com IgG1-b12.

Exemplo 32: Morte de célula mediada por CDC pelos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L ou IgG1-7D8-F405L e IgG1-7D8-K409R de ser

humano

[00377] O anticorpo de CD20 IgG1-7D8 pode eficientemente matar as células que expressam CD20 pela citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Ao contrário, o anticorpo de EGFR IgG1-2F8 não medeia CDC nas células alvos que expressam EGFR. Tanto IgG1-7D8-K409R quanto os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R são capazes de induzir as células que expressam CDC em CD20 (como é descrito no Exemplo 26). Foi testado se os anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L e IgG1-7D8-K409R também pode induzir CDC em células que expressam CD20. 10^5 células Daudi ou Raji foram pré-incubadas por 15 min com uma série de concentração de anticorpo em 100 µL de meio RPMI suplementado com 0,1 % de BSA em um agitador na temperatura ambiente. 25 µL de soro humano normal (NHS) foi adicionado como uma fonte de complemento (20 % de concentração final de NHS) e incubados por 45 min a 37°C. Depois da incubação, a placa foi colocada sobre gelo para interromper a reação de CDC. As células mortas e viáveis foram discriminadas pela adição de 10 µL de iodeto de propídio a 10 µg/ml (PI) (0,6 µg/ml de concentração final) e análise de FACS.

[00378] A FIGURA 43 mostra que IgG1-7D8 e o produto biespecífico gerado pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L e IgG1-7D8-K409R têm a mesma potência para induzir a morte de célula mediada por CDC de Daudi (FIGURA 43A) e Raji (FIGURA 43B) que expressam CD20. Tanto a célula Daudi quanto a célula Raji não expressam EGFR, resultando na ligação monovalente dos anticorpos biespecíficos gerados pela troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Este produto biespecífico também induziu a morte de célula mediada por CDC, embora levemente menos eficiente. Estes dados indicam que a capacidade de CDC de um anticorpo precursor foi retido no

formato biespecífico. A indução da morte de célula mediada por CDC pelo produto biespecífico bivalente (IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R) foi levemente mais eficiente comparado com o produto biespecífico monovalente (IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R). O anticorpo 11B8 que alveja CD20 não é capaz de induzir a morte de célula mediada por CDC e funciona como um controle negativo.

Exemplo 33: Anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 testados em um ensaio de morte de ETA' direcionado a capa *in vitro*

[00379] O exemplo mostra que os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 podem liberar um agente citotóxico dentro das células de tumor depois da internalização em um ensaio genérico de morte com base em célula *in vitro* usando exotoxina A de pseudomonas direcionado a capa (anti-capa-ETA'). Este ensaio faz uso de um anticorpo de domínio anti-capa de alta afinidade conjugado a uma forma truncada da exotoxina A de pseudomonas. As proteínas de fusão similares de proteínas de ligação de anticorpo (motivo de ligação de IgG da proteína A ou proteína G Estreptocócicas) e toxina da difteria ou exotoxina A de Pseudomonas foram anteriormente (Mazor Y. *et al*., J. Immunol. Methods 2007; 321: 41-59); Kuo SR. *et al*., 2009 Bioconjugate Chem. 2009; 20: 1975-1982). Estas moléculas ao contrário da anti-capa-ETA' ligam a parte Fc de anticorpos completos. Na internalização e classificação endocítica o anticorpo do domínio anti-capa-ETA' sofre proteólise e a redução da ligação de dissulfeto, separando o domínio catalítico da ligação. O domínio catalítico é depois transportado do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático via um motivo de retenção de KDEL, e subsequentemente translocalizada para o citossol onde a mesma inibe a síntese da proteína e induz a apoptose (Kreitman RJ. *et al*., BioDrugs 2009; 23: 1-13).

[00380] Os anticorpos anti-HER2 usados neste exemplo e os exemplos 43 a 45 que seguem são anticorpo monoclonais totalmente humanos gerados

em camundongos transgênicos. Eles se ligam a epítopos diferentes em HER2.

[00381] Eles são todos anticorpos IgG1.κ que são modificados em suas regiões Fc como ainda divulgados. Eles têm as seguintes sequências variáveis de cadeia pesada e cadeia leve.

005:

VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPG DSDTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWTSLKASDTAIYYCARQRGDYYYFYG MDVWGQGTTVTVSS
VL 005	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LTFGGGTKVEIK

025:

VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHS GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFD YWAQGTLVTVSS
VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLRS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK

153:

VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHWVRQAPGKGLEWVTVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGITGTTGVF DYWGQGTLVTVSS
VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQS GVPSRFSGSGYGTDFSLTISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPITFGQGTRLEIK

169:

VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLS AYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPD YFDYWGQGTLVTVSS
VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAsnRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK

[00382] Os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 foram pré-incubados com o anti-capa-ETA' antes da incubação com células A431. As células A431 expressam ~15.000 anticorpos HER2 por célula (determinada via análise Qifi) e não são sensíveis ao tratamento com anticorpos HER2 'nus'.

[00383] Primeiro, a concentração ideal de anti-capa-ETA' foi determinada para cada linhagem de célula, isto é a dose maximamente tolerada que não leva à indução da morte de célula não específica. As células A431 (2500 células/reservatório) foram semeadas em meio de cultura de célula normal em uma placa de cultura de tecido de 96 reservatórios (Greiner bio-one) e deixadas aderir por pelo menos 4 horas. Estas células foram incubadas com uma série de diluição de anti-capa-ETA', de 100, 10, 1, 0,1,

0,01, 0,001 e 0 µg/ml em meio de cultura de célula normal. Depois de 3 dias, a quantidade de células viáveis foi quantificada com Azul de Alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acordo com a instrução do fabricante. A fluorescência foi monitorada usando a leitora EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlândia) com ajustes de Azul de Alamar padrão. A concentração mais alta de anti-capa-ETA' que não matou as células por si só (1 µg/ml para as células A431) foi usada para os seguintes experimentos.

[00384] Em seguida, o efeito de anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 e anticorpos monoespecíficos HER2 pré-incubados com anti-capa-ETA' foi testado quanto a sua capacidade para induzir a morte celular. As células A431 foram semeadas como descrito acima. Uma série de diluição dos anticorpos específicos de HER2 (anticorpos monoespecíficos e biespecíficos) foi fabricada e pré-incubada por 30 min com a concentração predeterminada de anti-capa-ETA' antes de adicioná-las às células. Depois de 3 dias de incubação a 37°C, a quantidade de células viáveis foi quantificada como descrito acima. O sinal de Azul de Alamar de células tratadas com anti-capa-ETA' pré-incubada com os anticorpos foi plotada comparada com as células tratadas sem tratamento com anticorpo. Os valores EC_{50} e a morte de célula máxima foram calculadas usando o software GraphPad Prism 5. Estaurosporina (23,4 µg/ml) foi usada como controle positivo para a morte celular. Um anticorpo de controle de isótipo (IgG1/capa; IgG1-3G8-QITL) foi usado como controle negativo.

[00385] A FIGURA 44 mostra que todos os anticorpos biespecíficos HER2 pré-incubados com anti-capa-ETA' foram capazes de matar células A431 em uma maneira dependente da dose. Estes resultados demonstram que a maioria dos anticorpos biespecíficos de HER2 testados foram mais eficazes do que o anticorpo monoespecífico presente na combinação neste ensaio anti-capa-ETA'. Além disso, a eficácia de anticorpo biespecífico 005X169,

025X169 e 153X169 mostrou que a eficácia de um anticorpo monoespecífico que carece da atividade nesta morte direcionada por capa-ETA' *in vitro*, o anticorpo específico de HER2 169, pode ser aumentada através da combinação biespecífica com um outro anticorpo específico de HER2.

Exemplo 34: Inframodulação do receptor HER2 pela incubação com anticorpos biespecíficos que alvejam epítopos HER2 diferentes

[00386] Os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 podem ligar dois epítopos diferentes em dois receptores HER2 espacialmente diferentes. Isto pode permitir que outros anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 se liguem aos epítopos remanescentes nestes receptores. Isto resultaria na reticulação de receptor multivalente (comparada com a dimerização induzida pelos anticorpos monovalentes) e consequentemente realçar a inframodulação de receptor. Para investigar se os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 induzem a inframodulação realçada de HER2, as células AU565 foram incubadas com anticorpos e anticorpos biespecíficos por três dias. Os níveis totais de HER2 e os níveis de HER2 ligados ao anticorpo foram determinados.

[00387] As células AU565 foram semeadas em uma placa de cultura de tecido de 24 reservatórios (100.000 células / reservatório) em meio de cultura de célula normal e cultivada por três dias a 37°C na presença de 10 μg/ml de anticorpo HER2 ou anticorpos biespecíficos HER2 x HER2. Depois da lavagem com PBS, as células foram lisadas pela incubação das mesmas por 30 min na temperatura ambiente com 25 μL de tampão de lise Surefire (Perkin Elmer, Turku, Finlândia). Os níveis de proteína total foram quantificados usando o reagente de ensaio de proteína de ácido bicinchonínico (BCA) (Pierce) seguindo o protocolo do fabricante. Os níveis de proteína HER2 nos lisados foram analisados usando um ELISA intercalado específico de HER2. O anticorpo de domínio intracelular de HER2 anti-ser humano de

coelho (Cell Signaling) foi usado para capturar HER2 e anticorpo policlonal de HER2 anti-ser humano de cabra biotinilado (R&D systems, Minneapolis, EUA), seguido pela estreptavidina-poli-HRP, foram usados para detectar a ligação de HER2. A reação foi visualizada usando o ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (um tablete de ABTS diluído em 50 ml de tampão de ABTS [Roche Diagnostics, Almere, Países Baixos]) e interrompido com ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Baixos). A fluorescência a 405 nm foi medida em uma leitora de placa microtituladora (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e a quantidade de HER2 foi expressada como uma porcentagem em relação às células não tratadas.

[00388] Os resultados são mostrados na FIGURA 45 que demonstra que todos os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 testados induziram ≥ 40 % de inframodulação de HER2. De maneira interessante, todos os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 demonstraram inframodulação HER2 aumentada comparada com ambos de suas contrapartes monoespecíficas.

Exemplo 35: Colocalização de anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 com marcador lisossômico LAMP1 analisado pela microscopia confocal.

[00389] O ensaio de inframodulação de HER2 como descrito no Exemplo 43 indicou que os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 foram capazes de aumentar a degradação lisossômica de HER2. Para confirmar estas descobertas, a tecnologia de microscopia confocal foi aplicada. As células AU565 foram cultivadas em lamínulas de vidro (espessura 1,5 mícron, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemanha) em meio de cultura de tecido padrão por 3 dias a 37°C. As células foram pré-incubadas por 1 hora com leupeptina (Sigma) para bloquear a atividade lisossômica depois que 10 μg/ml de anticorpos monoespecíficos HER2 ou anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 foram adicionados. As células foram incubadas por um adicional de 3 ou 18 horas a 37°C. Depois disso eles foram lavados com PBS

e incubados por 30 min. na temperatura ambiente com 4 % de formaldeído (Klinipath). As lâminas foram lavadas com tampão de bloqueio (PBS suplementados com 0,1 % de saponina [Roche] e 2 % de BSA [Roche]) e incubados por 20 min com tampão de bloqueio que contém 20 mM de NH_4Cl para extinguir o formaldeído. As lâminas foram lavadas mais uma vez com tampão de bloqueio e incubados por 45 min na temperatura ambiente com CD107a anti-humano de camundongo (LAMP1) (BD Pharmingen) para tingir lisossomas. A seguir da lavagem com tampão de bloqueio as lâminas foram incubadas 30 min na temperatura ambiente com um coquetel de anticorpos secundários; IgG-Cy5 anticamundongo de cabra (Jackson) e IgG-FITC anti-ser humano de cabra (Jackson). As lâminas foram lavadas mais uma vez com tampão de bloqueio e montadas durante a noite em lâminas de microscópio usando 20 µL de meio de montagem (6 gramas de Glicerol [Sigma] e 2,4 gramas de Mowiol 4-88 [Omnilabo] foram dissolvidos em 6 ml de água destilada à qual 12 ml de Tris 0,2 M [Sigma] pH 8,5 foi adicionado seguido pela incubação por 10 min de 50 a 60°C. O meio de montagem foi aliquotado e armazenado a -20°C.). As lâminas foram convertidas em imagem com um microscópio confocal Leica SPE-II (Leica Microsystems) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo 63x 1,32-0,6 e o software LAS-AF. Para permitir a quantificação de intensidades de pixel de sobreposição, a saturação de pixels deve ser evitada. Portanto a intensidade de laser FITC foi diminuída para 10 %, o ganho inteligente foi ajustado a 830 V e compensação inteligente foi ajustado a -9,48 %. Pelo uso destes ajustes, os anticorpos biespecíficos foram claramente visualizado sem saturação de pixel, mas os anticorpos monoespecíficos foram algumas vezes difícil de detectar. Para comparar a colocalização lisossômica entre anticorpos monoespecíficos e biespecíficos, estes ajustes foram mantidos os mesmos para todas as lâminas confocais analisadas.

[00390] Imagens de 12-bit foram analisadas quanto à colocalização

usando o software MetaMorph® (versão Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale Califórnia, EUA). As imagens FITC e Cy5 foram importadas como pilhas e o fundo foi subtraído. Ajuste de limiar idênticos foram usados (ajuste manual) para todas as imagens FITC e todas as imagens Cy5. A colocalização foi representada como a intensidade de pixel de FITC na região de sobreposição (ROI), onde o ROI é composto de todas as regiões positivas em Cy5. Para comparar lâminas diferentes tingidas com vários anticorpos HER2 ou anticorpos biespecíficos HER2 x HER2, as imagens foram normalizadas usando a intensidade de pixel de Cy5. IgG-Cy5 anticamundongo de cabra foi usado para tingir o marcador de lisossoma LAMP1 (CD107a). A intensidade de pixel de LAMP1 não deve diferir entre vários anticorpos HER2 ou os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 testados (uma célula teve uma intensidade de pixel de Cy5 de aproximadamente 200.000).

Valores normalizados para a colocalização de FITC e Cy5 = [(TPI-FITC x porcentagem da colocalização de FITC-Cy5)/100] x [200.000/TPI-Cy5]

[00391] Nesta fórmula, filamentos TPI para Intensidade de Pixel Total.

[00392] Apresenta a porcentagem de células viáveis, como medida pela intensidade de pixel de FITC que se sobrepõem com Cy5 para vários anticorpos HER2 monoespecíficos e anticorpos biespecíficos HER2 x HER2. Para cada anticorpo ou molécula biespecífica representada, três imagens diferentes foram analisadas de uma lâmina que contém ~ 1, 3 ou >5 células. A variação significante foi observada entre as imagens diferentes dentro de cada lâmina. Entretanto, foi evidente que todos os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 demonstram colocalização aumentada com o marcador de lisossoma LAMP1, quando comparado com suas contrapartes monoespecíficas. Estes resultados indicam que uma vez internalizados, os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 são eficientemente classificados para compartimentos

lisossômicos, tornando-os adequados para um método conjugado a medicamento de anticorpo biespecífico.

Exemplo 45: Inibição da proliferação de células AU565 na incubação com anticorpos monoespecíficos HER2 ou biespecíficos HER2 X HER2

[00393] Anticorpos biespecíficos HER2 foram testados quanto à sua capacidade para inibir a proliferação de células AU565 *in vitro*. Devido aos níveis de expressão de HER2 altos em células AU565 (~1.000.000 cópias por célula como determinado com Qifi-kit), HER2 é constitutivamente ativo nestas células e assim não dependente da heterodimerização induzida por ligando. Em uma placa de cultura de tecido de 96 reservatórios (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemanha), 9.000 células AU565 foram semeadas por reservatório na presença de 10 µg/ml de anticorpo HER2 ou anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 em meio de cultura de célula isento de soro. Como um controle, células foram semeadas em meio isento de soro sem anticorpo ou anticorpos biespecíficos. Depois de três dias, a quantidade de células viáveis foi quantificada com Azul de Alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência foi monitorada usando o leitor EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlândia) com ajustes com Azul de Alamar padrão. O sinal de Azul de Alamar de células tratadas com anticorpo foi plotado como uma porcentagem em relação às células não tratadas.

[00394] A FIGURA 47 descreve a intensidade fluorescente de Azul de Alamar de células AU565 depois da incubação com anticorpos HER2 e anticorpos biespecíficos HER2XHER2. Herceptin® (trastuzumab) foi incluído como controle positivo e demonstrou inibição da proliferação como descrito por Juntilla TT. *et al*., Cancer Cell 2009; 15: 429-440. Todos os anticorpos biespecíficos HER2 x HER2 foram capazes de inibir a proliferação de células AU565. Anticorpos biespecíficos: IgG1-005-ITL x IgG1-169-

K409R e IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R foram mais eficazes comparado às suas contrapartes de anticorpo monoespecífico neste ensaio.

Exemplo 46: Análise *in vitro* e *in vivo* da ligação de FcRn por anticorpos de IgG1 biespecíficos e anticorpos biespecíficos de IgG1 deletados na articulação que contém um ou dois sítios de ligação de FcRn na região Fc.

[00395] O presente exemplo ilustra a geração de moléculas biespecíficas assimétricas, isto é moléculas com diferentes características em cada ramo Fab de acordo com a invenção.

[00396] O receptor Fc neonatal (FcRn) é responsável pela semivida plasmática longa de IgG protegendo-se a IgG da degradação. Depois da internalização do anticorpo, FcRn liga-se às regiões Fc do anticorpo em endossomas, onde a interação é estável no ambiente suavemente ácido (pH 6,0). Na reciclagem para a membrana plasmática, onde o ambiente é neutro (pH 7,4), a interação é perdida e o anticorpo é liberado de volta na circulação. A região Fc de um anticorpo contém 2 sítios de ligação de FcRn, um em cada cadeia pesada nas interfaces CH2-CH3. Uma mutação de H435A na região Fc do anticorpo anula a ligação a FcRn (Shields, R.L., *et al*, J Biol Chem, 2001, Firan, M., *et al*, Int Immunol, 2001) e também a região de articulação é considerada influenciar a ligação de FcRn (Kim, J.K., *et al*., Mol Immunol., 1995). Além disso, um papel para a ligação de anticorpo bivalente sobre monovalente a FcRn foi sugerido na reciclagem eficiente (Kim, J.K., *et al*., Scand J Immunol., 1994).

[00397] Neste exemplo a influência da valência de ligação de FcRn é avaliada por moléculas de IgG1 biespecíficas assimétricas, que contêm um único sítio de ligação de FcRn. A contribuição adicional da região de articulação é avaliada por molécula biespecíficas de IgG1 assimétricas apagadas na articulação (Uni-G1).

[00398] A ligação de FcRn de moléculas de IgG1 biespecíficas ou IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1) que contém nenhum, 1 ou 2 sítios de

ligação de FcRn foi medida por ELISA de FcRn humano e de camundongo. As moléculas monoespecíficas de anticorpos IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R e IgG1-7D8-K409R-H435A foram produzidas como descrito no exemplo 2, 3, 4 e 5. Moléculas monoespecíficas de moléculas de IgG1 apagadas na articulação Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-K409R e Uni-G1-7D8-K409R-H435A foram produzidas como descrito no exemplo 11. Moléculas de IgG1 biespecíficas foram geradas por troca do ramo Fab induzida por 2-MEA entre moléculas de IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409R ou IgG1-7D8-K409R-H435A. Moléculas de IgG1 apagadas na articulação biespecíficas foram produzidas por incubação de Uni-G1-2F8-ITL com Uni-G1-7D8-K409R ou Uni-G1-7D8-K409R-H435A. Uma série de diluição de 3 vezes de moléculas de IgG1 monoespecíficas e biespecíficas e moléculas de IgG1 apagadas na articulação foi adicionada a FcRn humano ou de camundongo biotinilado capturado em uma placa elisa revestida com estreptavidina seguido por incubação no pH 6,0 e 7,4 por 1 hora. Moléculas de anticorpo ligado e IgG1 apagadas na articulação foram visualizadas usando conjugado de $(Fab')_2$ anti-humano de cabra rotulado com peroxidase de rábano silvestre e ABTS como substrato. Os resultados foram medidos como densidade óptica em um comprimento de onda de 405 nm usando o leitor EL808-Elisa.

[00399] A FIGURA 48 mostra os resultados da ligação de anticorpos de IgG1 monovalentes ou bivalentes e moléculas de IgG1 apagadas na articulação a FcRn humano (A) e FcRn de camundongo (B) no pH 6,0 e pH 7,4. Como esperado, todos os anticorpos testados, tanto moléculas de IgG1 (biespecíficas) quanto moléculas de IgG1 apagadas na articulação, não ligam-se eficientemente a FcRn (tanto humano quanto de camundongo) no pH 7,4. Em condição levemente ácida (pH 6,0) IgG1-2F8-ITL monoespecífica e IgG1 biespecífica gerada de IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409R mostram eficiências de ligação bivalente para FcRn, ainda que para FcRn de

camundongo 3 vezes mais alto comparado ao humano, o que imita o controle positivo (IgG1-2F8) para a ligação de FcRn. Isto indica que a mutação de ITL e o K409R não interrompem a ligação ao FcRn.

[00400] Um efeito claro de 2 vs 1 vs 0 sítios de interação de FcRn pode ser observado quando a ligação das moléculas de IgG1 a FcRn humano e de camundongo é comparada ao pH 6,0 (FIGURA XXA e B, pH 6, painel esquerdo). IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R (2 sítios de ligação de FcRn) ligam-se comparável ao controle (IgG1-2F8). As moléculas com 0 sítios de ligação de FcRn, IgG1-7D8-K409R-H435A mostram nenhuma ligação de nenhum modo. As moléculas com 1 sítio de ligação de FcRn, IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R-H435A, mostram ligação intermediária quando comparado às moléculas com 2 sítios de ligação de FcRn.

[00401] A FIGURA 48(A), pH 6,0, painel direito mostra a ligação a FcRn humano de moléculas de IgG1 apagadas na articulação (Uni-G1). Todas as moléculas apagadas na articulação são prejudicadas em sua interação a FcRn humano quando comparado às moléculas de IgG1 de controle (IgG1-2F8) indicando que a articulação é de fato de influência na interação com FcRn quando avaliada em um ELISA de ligação de FcRn. Nenhum efeito claro de 2 vs 1 vs 0 sítios de interação de FcRn pode ser observado quando a ligação a FcRn humano no pH 6,0 é comparada a estas moléculas apagadas na articulação.

[00402] Entretanto, visto que a ligação de IgG humana a FcRn de camundongo é mais forte, um efeito claro de 2 vs 1 vs 0 sítios de interação de FcRn pode ser observado quando a ligação destas moléculas de IgG apagadas na articulação a FcRn de camundongo no pH 6,0 é comparada (FIGURA 48(B), pH 6,0, painel direito). A ligação de Uni-G1-7D8-K409R-H435A/Uni-G1-2F8-ITL (1 sítio de ligação de FcRn) é intermediária quando comparado à ligação de Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-409R e Uni-G1-2F8-ITL/Uni-G1-

7D8-K409R (2 sítios de ligação de FcRn) e Uni-G1-2F8-ITL-H435A (0 sítios de ligação de FcRn, nenhuma ligação).

Exemplo 47: Anticorpos biespecíficos Her2 x CD3 testados em um ensaio de citotoxicidade *in vitro*

[00403] CD3 é um correceptor no complexo do receptor de célula T expressado em células T maduras. A combinação de um ramo Fab de anticorpo específico de CD3 com um ramo Fab de anticorpo específico de antígeno de tumor em um anticorpo biespecífico resultaria no alvejamento específico de células T a células de tumor, levando à lise de célula de tumor mediada por célula T. Do mesmo modo, células T positivas de CD3 poderiam ser alvejadas a outras células desestabilizadas no corpo, a células infectadas ou diretamente aos patógenos.

[00404] Anticorpos biespecíficos Her2 x CD3 foram gerados. Sequências de região variável de cadeia pesada e leve para o ramo Fab específico de Her2 foram como indicados para o anticorpo 153 e 169 no Exemplo 42. As sequências de região variável de cadeia pesada e leve seguintes para o ramo Fab específico de CD3 foram usadas:

YTH12.5 (Sequência como descrito por Routledge *et al*., Eur J Immunol. 1991, 21(11): 2717-25.)

VH YTH12.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTISTSGG RTYYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGFDYWG QGTLVTVSS
VL YTH12.5	DIQLTQPNSVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKRP DGVPDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGGTKLTVL

huCLB-T3/4 (Sequência como descrito por Parren *et al*., Res Immunol. 1991, 142(9): 749-63. Substituições de aminoácido menores foram introduzidas para tornar a sequência parecida à linha germinativa humana mais próxima.)

VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVATISRYS RYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLYGSSPDYWG QGTLVTVSS
VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPLTFGSGTKLEMR

[00405] Todos os anticorpos foram expressados como IgG1,κ sendo

modificados em suas regiões Fc como descrito como segue: IgG1-Her2-153-K409R e IgG1-Her2-153-N297Q-K409R, IgG1-Her2-169-K409R, IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L e IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L e IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L.

[00406] Anticorpos biespecíficos destes anticorpos específicos Her2 e CD3 foram gerados como descrito no Exemplo 11 e testados em um ensaio de citotoxicidade *in vitro* usando células AU565.

[00407] Células AU565 foram cultivadas à confluência próxima. Células foram lavadas duas vezes com PBS, e tripsinizadas por 5 minutos a 37 ºC. 12 ml de meio de cultura foram adicionados para inativar a tripsina e células foram giradas por 5 min, 800 rpm. As células foram recolocadas em suspensão em 10 ml de meio de cultura e uma única suspensão de célula foi fabricada passando-se as células através de uma peneira de célula. 100 µL de uma suspensão de 5 x 10^5 células/ml foram adicionados a cada um reservatório de uma placa de cultura de 96 reservatórios, e as células foram incubadas pelo menos 3 h a 37 ºC, 5 % de CO2 para permitir a aderência à placa.

[00408] Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas do sangue de voluntários saudáveis usando tubos de 30 ml Leucosep, de acordo com o protocolo do fabricante (Greiner Bio-one). Células T foram isoladas de preparações de PBMC por seleção negativa usando o kit Untouched Human T-cells Dynabead (Dynal). Células isoladas foram recolocadas em suspensão em meio de cultura a uma concentração final de 7 x 10^6 células/ml.

[00409] O meio de cultura foi removido das células AU565 aderidas, e substituído com diluição de 2x de anticorpo concentrado de 50 µl/reservatório e 7 x 10^6 T células/ml a 50 µl/reservatório (razão efetor:alvo = 7:1). As placas foram incubadas por 3 dias a 37 ºC, 5 % de CO_2. Os sobrenadantes foram removidos e as placas foram lavadas duas vezes com PBS. A cada

reservatório 150 μL de meio de cultura e 15 μL de azul de Alamar foram adicionados. As placas foram incubadas por 4 horas a 37 ºC, 5 % de CO_2, e a absorbância foi medida (Envision, Perkin Elmer).

[00410] A FIGURA 49 mostra que ao passo que anticorpos de controle (IgG1-Herceptin monoespecífico de Her2, IgG1-YTH12.5 monoespecífico de CD3 e IgG1-huCLB-T3/4 monoespecífico, IgG1-b12 de monoespecífico de antígeno irrelevante, e anticorpos biespecíficos CD3 x b12) não induziram citotoxicidade mediada por célula T, anticorpos Her2 x CD3 biespecíficos (Duo) huCLB/Her2-153, huCLB/Her2-169, YTH12.5/Her2-153 e YTH12.5/Her2-169 induziram citotoxicidade mediada por célula T dependente de dose de células AU565. Os anticorpos biespecíficos que contém Her2-169 foram mais potentes do que aqueles que contêm Her2-153.

[00411] Mutantes de IgG1-hu-CLB-T3/4, IgG1-YTH12.5 e Her2-153 foram fabricados que contém uma mutação de N297Q para remover um sítio de glicosilação; a glicosilação neste sítio é crítica para interações de receptor IgG-Fcgama (Bolt S *et al*., Eur J Immunol 1993, 23: 403-411). A FIGURA 49 mostra que a mutação de N297Q e portanto a ausência de glicosilação de Fc de anticorpos biespecíficos de Her2 x CD3 YTH12.5/Her2-153 e huCLB/Her2-153 não afetaram o potencial para induzir citotoxicidade mediada por célula T dependente de dose de células AU565.

REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* para gerar um anticorpo IgG heterodimérico, caracterizado pelo fato de que dito método compreende as seguintes etapas:

a) fornecer um primeiro anticorpo IgG homodimérico que compreende uma região Fc compreendendo uma primeira região CH3, em que a referida primeira região CH3 tem o aminoácido Arg na posição 409,

b) fornecer um segundo anticorpo IgG homodimérico que compreende uma região Fc compreendendo uma segunda região CH3, em que a referida segunda região CH3 tem uma substituição de aminoácido selecionada a partir do seguinte grupo consistindo em:

(i) um Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Ala, Phe, Arg, Tyr, His ou Lys na posição 399, ou

(iii) um Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser ou Trp na posição 405, ou

(iv) um Gly, Leu, Met ou Trp na posição 407;

em que a numeração é de acordo com o índice EU e em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubar o dito primeiro anticorpo IgG junto com o dito segund anticorpo IgG sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, e

d) obter o dito anticorpo heterodimérico.

2. Método *in vitro* de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e/ou segundo anticorpo

homodimérico é um anticorpo de comprimento total.

3. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os ditos primeiro e segundo anticorpos homodiméricos ligam epítopos diferentes.

4. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a região Fc do primeiro anticorpo IgG homodimérico é de um isótipo selecionado do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e em que a região Fc do segundo anticorpo IgG homodimérico é de um isótipo selecionado do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, por exemplo,

em que as regiões Fc tanto do dito primeiro quanto do dito segundo anticorpo IgG homodimérico são do isótipo IgG1, ou

em que uma das regiões Fc dos ditos anticorpos IgG homodiméricos é do isótipo IgG1 e a outra do isótipo IgG4.

5. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a força aumentada da interação heterodimérica quando comparada a cada uma das interações homodiméricas é devido às modificações CH3 outras que não a introdução de ligações covalentes, resíduos de cisteína ou resíduos carregados.

6. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a interação heterodimérica entre os ditos primeiro e segundo anticorpos IgG no anticorpo IgG heterodimérico resultante é

a) tal que nenhuma troca na ramificação Fab pode ocorrer em 0,5 mM de GSH sob as condições descritas no Exemplo 13, e/ou

b) tal que nenhuma troca na ramificação Fab ocorre *in vivo* em camundongos sob as condições descritas no Exemplo 14.

7. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a interação heterodimérica

entre os ditos primeiro e segundo anticorpos IgG no anticorpo IgG heterodimérico resultante é mais do que duas vezes mais forte, tal como mais do que três vezes mais forte, por exemplo mais do que cinco vezes mais forte do que a mais forte das duas interações homodiméricas, por exemplo quando determinada como descrito no Exemplo 30.

8. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são tais que

a) as constantes de dissociação da interação heterodimérica entre os ditos primeiro e segundo anticorpos IgG no anticorpo IgG heterodimérico resultante está abaixo de 0,05 micromolar quando ensaiadas como descrito no Exemplo 30; e/ou

b) as constantes de dissociação de ambas as interações homodiméricas estão acima de 0,01 micromolar, tal como acima de 0,05 micromolar, preferivelmente entre 0,01 e 10 micromolares, tal como entre 0,05 e 10 micromolares, mais preferivelmente entre 0,01 e 5, tal como entre 0,05 e 5 micromolares, ainda mais preferivelmente entre 0,01 e 1 micromolar, tal como entre 0,05 e 1 micromolar, entre 0,01 e 0,5 ou entre 0,01 e 0,1 micromolar quando ensaiadas como descrito no Exemplo 21.

9. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 contêm substituições de aminoácido em posições não idênticas.

10. Método *in vitro* de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os substituintes de aminoácido são aminoácidos naturais ou aminoácidos não naturais.

11. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro anticorpo IgG homodimérico não tem mais do que uma substituição de aminoácido na

região CH3, e o segundo anticorpo IgG homodimérico não tem mais do que uma substituição de aminoácido na região CH3 em relação às regiões CH3 do tipo selvagem.

12. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de que

o dito primeiro anticorpo IgG homodimérico compreende Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

13. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que

a) o dito primeiro anticorpo IgG homodimérico compreende um Arg na posição 409 e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405, ou

b) o dito primeiro anticorpo IgG homodimérico compreende um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405, ou

c) o dito primeiro anticorpo IgG homodimérico tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico tem um Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409, ou

d) o dito primeiro anticorpo IgG homodimérico tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico tem um Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

14. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que as ditas primeira e segunda regiões CH3, exceto para as mutações especificadas, compreendem a

sequência apresentada na SEQ ID NO: 1.

15. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que

a) nem o dito primeiro nem o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreendem uma sequência Cys-Pro-Ser-Cys na região de articulação; ou

b) tanto o dito primeiro quanto o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreendem uma sequência Cys-Pro-Pro-Cys na região de articulação.

16. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico, exceto para qualquer uma das mutações especificadas, são anticorpos humanos.

17. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e o dito segundo anticorpos IgG homodiméricos são anticorpos de cadeia pesada.

18. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, caracterizado pelo fato de que tanto o dito primeiro quanto o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreendem adicionalmente uma cadeia leve; opcionalmente em que as ditas cadeias leves são diferentes.

19. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e/ou o dito segundo anticorpo IgG homodimérico compreendem uma mutação que remove o sítio aceitador para a glicosilação ligada à Asn.

20. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e o dito segundo anticorpo IgG homodimérico fornecidos nas etapas a) e b) são purificados.

21. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e/ou o dito segundo anticorpo IgG homodimérico são conjugados a um medicamento, um pró-medicamento ou uma toxina ou contêm um grupo aceitador para os mesmos.

22. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizado pelo fato de que

a) os anticorpos IgG homodiméricos são ambos anticorpos, e em que o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo ligam-se aos epítopos diferentes na mesma célula de tumor; ou

b) os anticorpos IgG homodiméricos são ambos anticorpos, e em que o primeiro anticorpo se liga a um epítopo em uma célula de tumor, e o outro anticorpo é um anticorpo irrelevante ou inativo sem nenhuma atividade de ligação in vivo relevante para a aplicação pretendida.

23. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que as condições redutoras na etapa c) compreendem a adição de um agente redutor, por exemplo um agente redutor selecionado do grupo que consiste de: 2-mercaptoetilamina, ditiotreitol e tris(2-carboxietil)fosfina ou seus derivados químicos.

24. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que a etapa c)

a) é realizada sob condições redutoras com um potencial redox entre -150 e -600 mV, tal como entre -250 e -400 mV; e/ou

b) compreende incubação por pelo menos 90 min em uma temperatura de pelo menos 20°C na presença de pelo menos 25 mM de 2-mercaptoetilamina ou na presença de pelo menos 0,5 mM de ditiotreitol.

25. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que a etapa d) compreende a remoção de um agente redutor, por exemplo pela dessalinização.

26. Método para a seleção de um anticorpo IgG biespecífico tendo uma propriedade desejada, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende as etapas de:

a) fornecer um primeiro conjunto de anticorpos IgG homodiméricos que compreende anticorpos com regiões variáveis diferentes, em que os ditos anticorpos do dito primeiro conjunto compreendem as primeiras regiões de CH3 idênticas, em que a referida primeira região CH3 tem o aminoácido Arg na posição 409,

b) fornecer um segundo anticorpo IgG homodimérico compreendendo uma região Fc compreendendo uma segunda região CH3, em que a referida segunda região CH3 tem uma substituição de aminoácido selecionada a partir do seguinte grupo consistindo em:

(i) um Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Ala, Phe, Arg, Tyr, His ou Lys na posição 399, ou

(iii) um Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser ou Trp na posição 405, ou

(iv) um Gly, Leu, Met ou Trp na posição 407;

em que a numeração é de acordo com o índice EU e em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3,

c) incubar as combinações de anticorpos IgG do dito primeiro conjunto e do dito segundo conjunto sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região de articulação sofram isomerização de ligação de dissulfeto, gerando assim um conjunto de anticorpos IgG biespecíficos,

d) opcionalmente restaurar as condições para não redutoras,

e) ensaiar o conjunto de anticorpos IgG biespecíficos resultantes quanto a uma dada propriedade desejada, e

f) selecionar um anticorpo biespecífico tendo a propriedade desejada.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que

a) os anticorpos IgG homodiméricos do segundo conjunto têm regiões variáveis diferentes; ou

b) os anticorpos IgG homodiméricos do segundo conjunto têm regiões variáveis idênticas, mas têm aminoácido ou variações estruturais diferentes fora da região de ligação de antígeno.

28. Método para produzir um anticorpo IgG heterodimérico, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende as seguintes etapas:

a) fornecer uma primeira construção de ácido nucleico que codifica um primeiro polipeptídeo que compreende uma primeira região Fc de um anticorpo IgG, a dita primeira região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

b) fornecer uma segunda construção de ácido nucleico que codifica um segundo polipeptídeo que compreende uma segunda região Fc de um anticorpo IgG, a dita segunda região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3, e

em que a numeração é de acordo com o índice EU e em que a dita primeira região Fc tem um aminoácido Arg na posição 409 e a dita segunda região Fc tem uma substituição de aminoácido selecionada a partir do seguinte grupo consistindo em:

(i) um Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Ala, Phe, Arg, Tyr, His ou Lys na posição 399, ou

(iii) um Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser ou Trp na posição 405, ou

(iv) um Gly, Leu, Met ou Trp na posição 407;

c) coexpressar as ditas primeira e segunda construções de ácidos nucleicos em uma célula hospedeira, e

d) obter o dito anticorpo IgG a partir da cultura de célula.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que

a dita primeira região CH3 tem um aminoácido Arg na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem um aminoácido Leu na posição 405.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 29, caracterizado pelo fato de que a etapa c) compreende adicionalmente coexpressar uma ou mais construções de ácidos nucleicos que codificam uma cadeia leve na dita célula hospedeira.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 30, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente as características como definido em qualquer uma ou mais das reivindicações de 2 a 22.

32. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a construção de ácidos nucleicos especificada como definido em qualquer uma das reivindicações de 28 a 31.

33. Anticorpo IgG heterodimérico, caracterizada pelo fato de que é obtida ou obtenível pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 31.

34. Anticorpo IgG heterodimérico, caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende uma primeira

região Fc compreendendo uma primeira região CH3, e um segundo polipeptídeo que compreende uma segunda região Fc compreendendo uma segunda região CH3, em que as sequências das ditas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as ditas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das ditas primeira e segunda regiões CH3, e

em que a dita primeira região CH3 tem um aminoácido Arg na posição 409 e a dita segunda região CH3 tem uma substituição de aminoácido selecionada a partir do seguinte grupo consistindo em:

(i) um Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Ala, Phe, Arg, Tyr, His ou Lys na posição 399, ou

(iii) um Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser ou Trp na posição 405, ou

(iv) um Gly, Leu, Met ou Trp na posição 407 e em que a numeração é de acordo com o índice EU.

35. Anticorpo IgG heterodimérico de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que

a dita primeira região CH3 tem um aminoácido Arg na posição 409 e uma Phe na posição 405, e a dita segunda região CH3 tem uma Leu na posição 405 e uma Lys na posição 409.

36. Anticorpo IgG heterodimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente as características como definido em qualquer uma ou mais das reivindicações de 2 a 23.

37. Anticorpo IgG heterodimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 36 caracterizada pelo fato de que é para o uso como um medicamento.

38. Anticorpo IgG heterodimérico de acordo com a

reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que é para o uso no tratamento de câncer.

39. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo IgG heterodimérico como definido em qualquer uma das reivindicações de 34 a 36 e um carregador farmaceuticamente aceitável.

40. Uso de um anticorpo IgG heterodimérico como definido em qualquer uma das reivindicações de 34 a 36, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para inibir o crescimento e/ou proliferação e/ou para a morte de células de tumor.

Figura 1

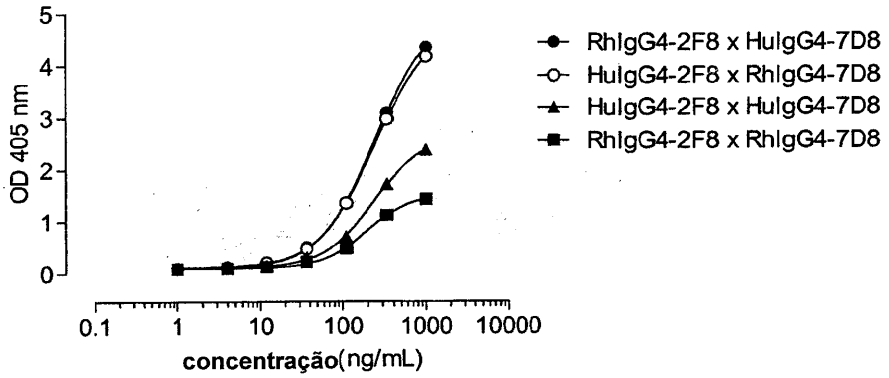

OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
0.1
1
10
100
1000
10000
concentração(ng/mL)
RhIgG4-2F8 x HuIgG4-7D8
HuIgG4-2F8 x RhIgG4-7D8
HuIgG4-2F8 x HuIgG4-7D8
RhIgG4-2F8 x RhIgG4-7D8

Figura 2

Espécie (nome comum)	isótipo	posição do aminoácido*																				
		núcleo-articulação					interface CH3-CH3															
		226	227	228	229	230	347	349	350	351	366	368	370	392	394	395	397	398	399	405	407	409
Homo sapiens	IgG1	C	P	P	C	P	Q	Y	T	L	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F	Y	K
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	M	-	-	-	-	-
	IgG4	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
macaco Rhesus	IgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG4 (In)**	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	L	-	-
	IgG4 (Ch)***	-	-	A	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	L	-	-

*numeração EU - **In, Indiano - ***Ch, Chinês

Figura 3

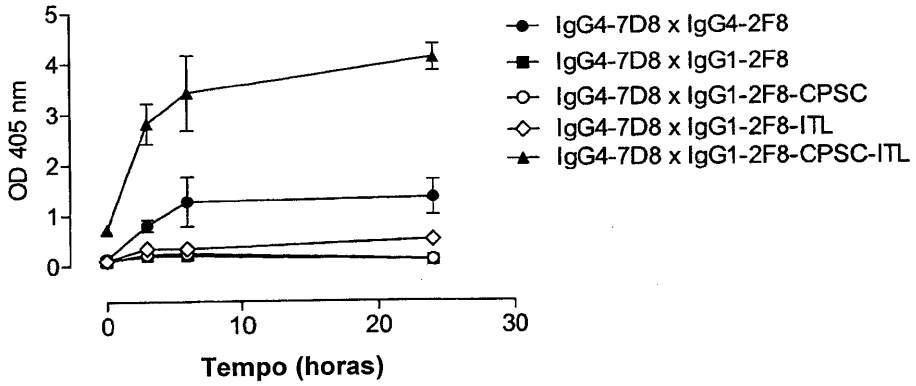

OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
0
10
20
30
Tempo (horas)
IgG4-7D8 x IgG4-2F8
IgG4-7D8 x IgG1-2F8
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-CPSC
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-ITL
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-CPSC-ITL

Figura 4

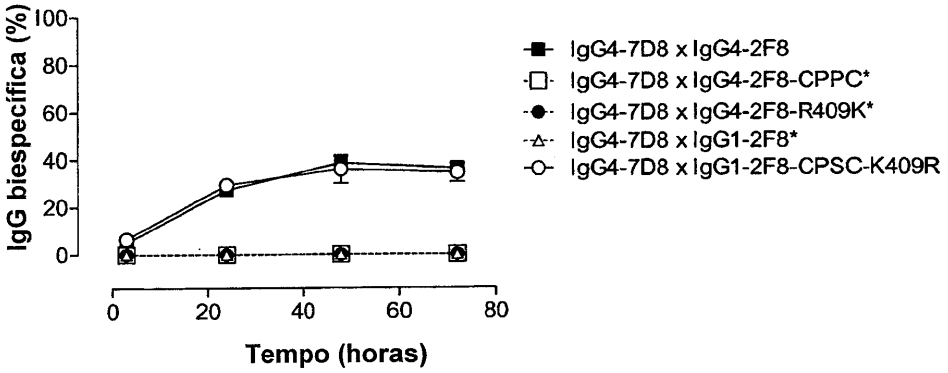

IgG biespecífica (%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
Tempo (horas)
IgG4-7D8 x IgG4-2F8
IgG4-7D8 x IgG4-2F8-CPPC*
IgG4-7D8 x IgG4-2F8-R409K*
IgG4-7D8 x IgG1-2F8*
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-CPSC-K409R

Figura 5

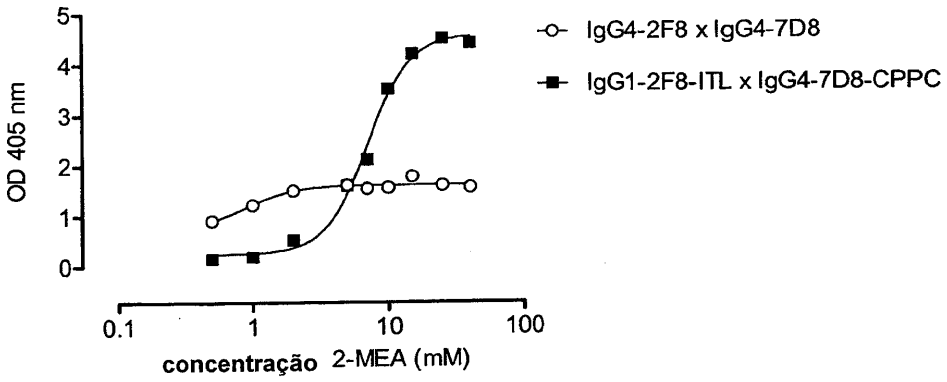
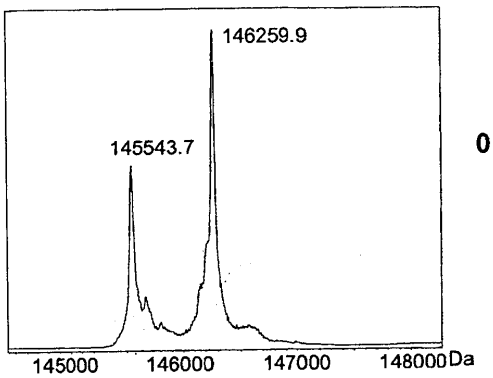

OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
0.1
1
10
100
concentração 2-MEA (mM)
IgG4-2F8 x IgG4-7D8
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC

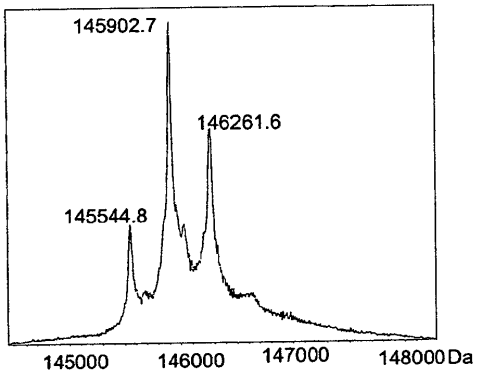
Figura 6

A

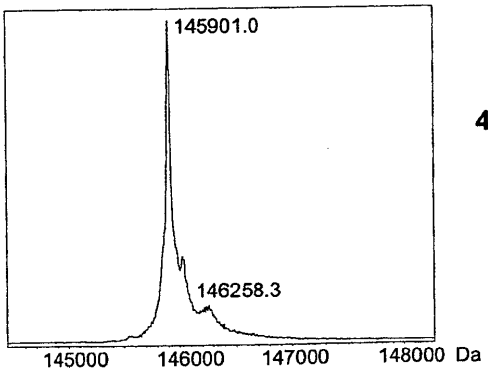
IgG1-2F8-ITL X IgG4-7D8-CPPC



0 mM 2-MEA



7 mM 2-MEA



40 mM 2-MEA

Figura 6 cont.

B

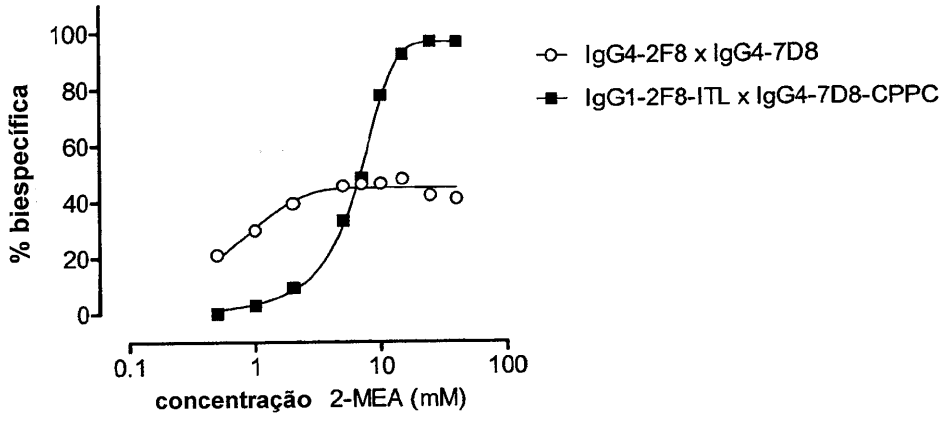
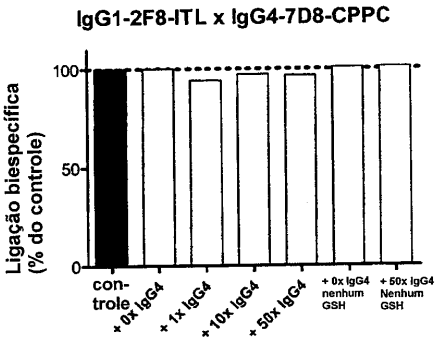


Figura 7

A


IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC
Ligação biespecífica (% do controle)
100
50
0
con-trole
+ 0x IgG4
+ 1x IgG4
+ 10x IgG4
+ 50x IgG4
+ 0x IgG4 nenhum GSH
+ 50x IgG4 Nenhum GSH

B

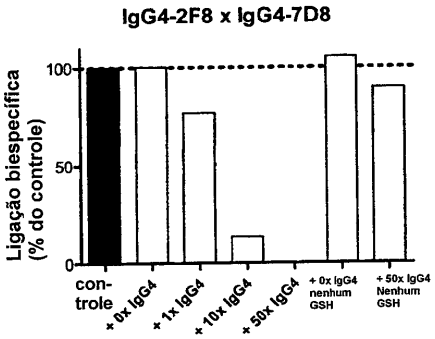
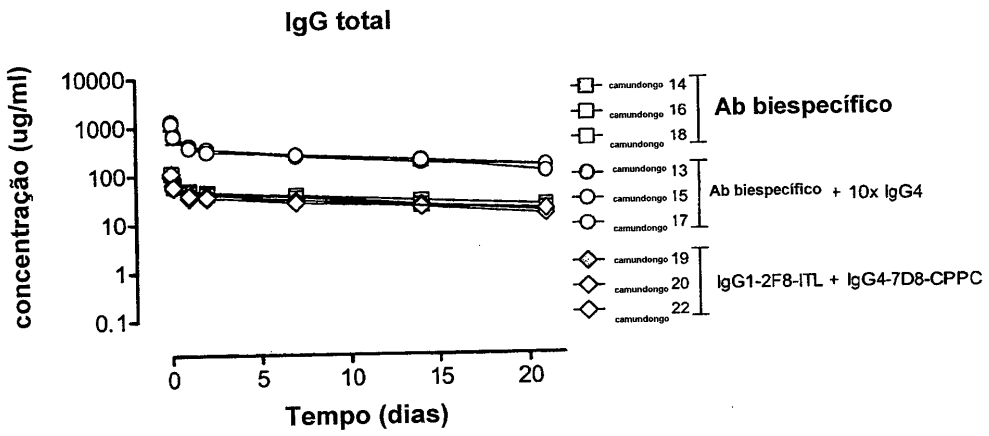

IgG4-2F8 x IgG4-7D8
Ligação biespecífica (% do controle)
100
50
0
con-trole
+ 0x IgG4
+ 1x IgG4
+ 10x IgG4
+ 50x IgG4
+ 0x IgG4 nenhum GSH
+ 50x IgG4 Nenhum GSH

Figura 8

A


IgG total
concentração (ug/ml)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
Tempo (dias)
camundongo 14
camundongo 16
camundongo 18
Ab biespecífico
camundongo 13
camundongo 15
camundongo 17
Ab biespecífico + 10x IgG4
camundongo 19
camundongo 20
camundongo 22
IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC

B

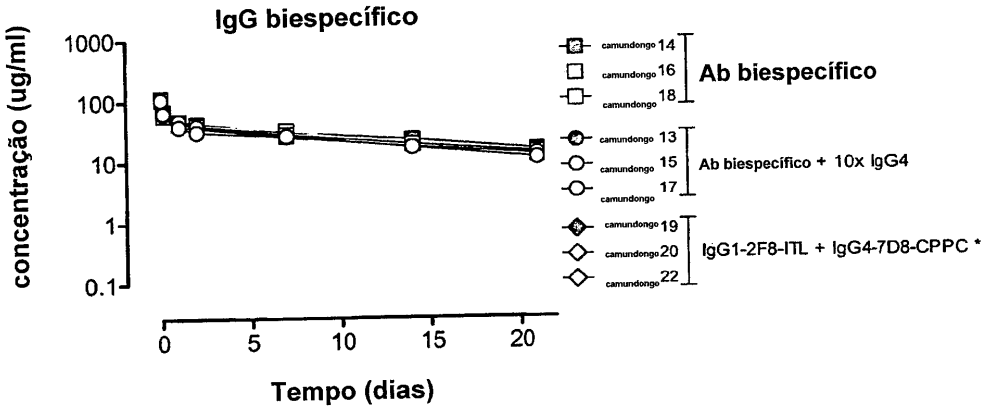

IgG biespecífico
concentração (ug/ml)
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
Tempo (dias)
camundongo 14
camundongo 16
camundongo 18
Ab biespecífico
camundongo 13
camundongo 15
camundongo 17
Ab biespecífico + 10x IgG4
camundongo 19
camundongo 20
camundongo 22
IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC *

Figura 9A

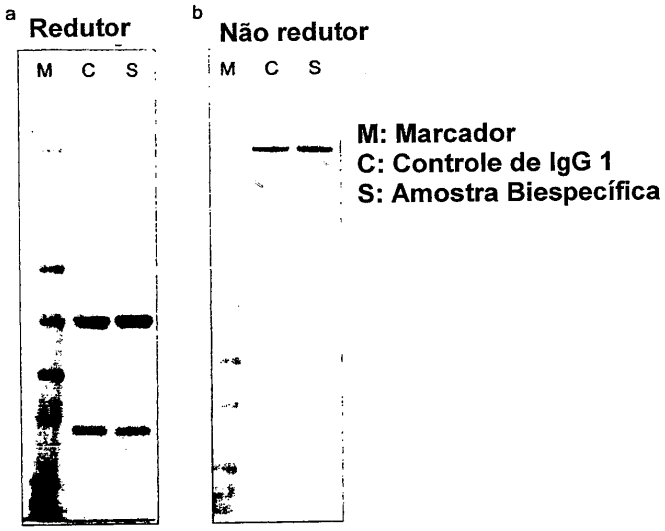
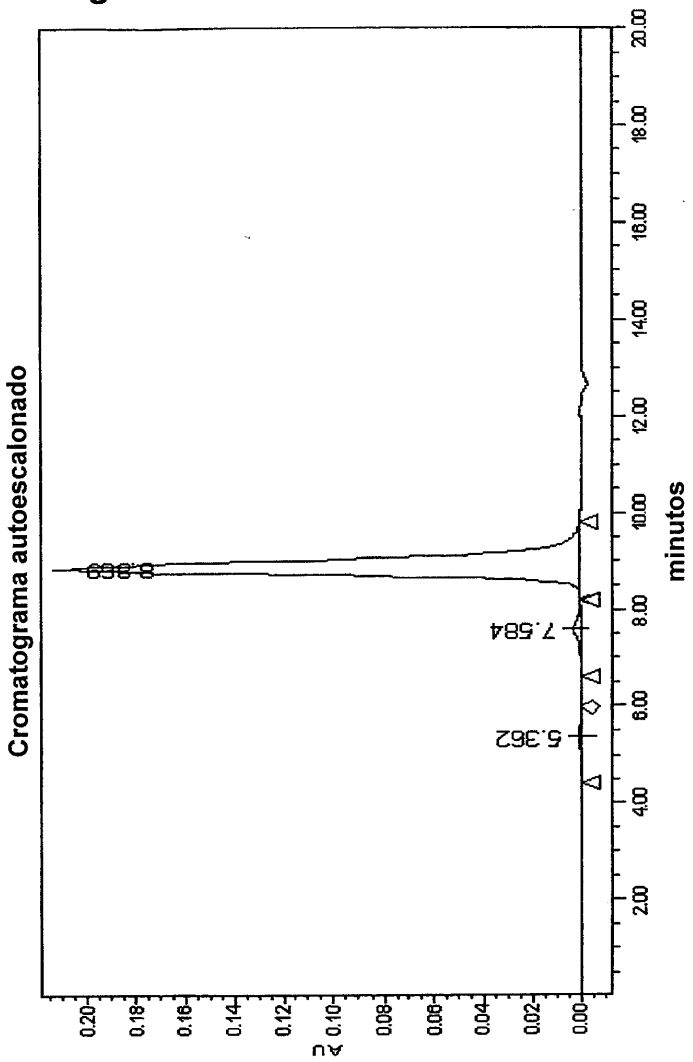

a
Redutor
M C S
b
Não redutor
M C S
M: Marcador
C: Controle de IgG 1
S: Amostra Biespecífica

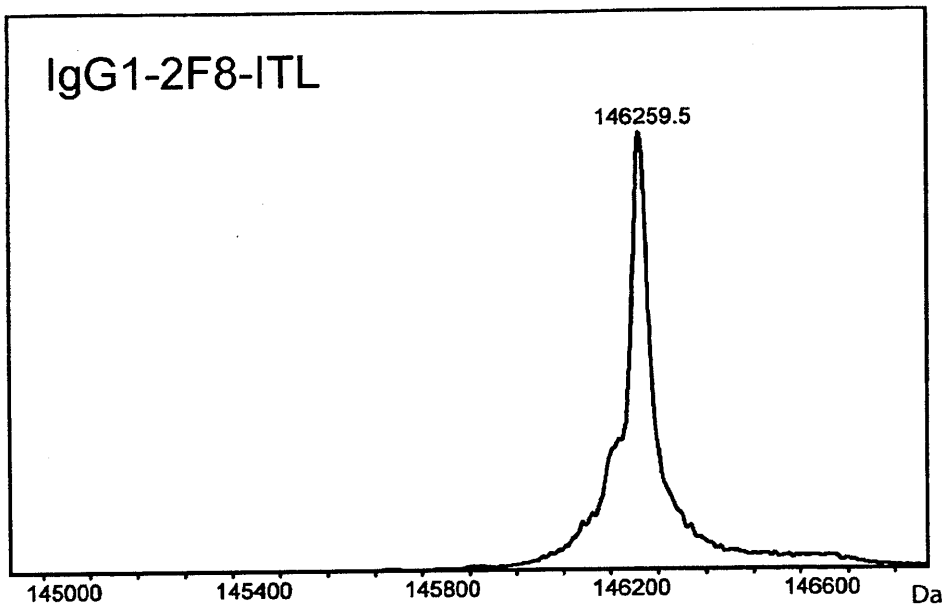
Figura 9B



resultados de pico:

	RT (min)	área	altura	% de altura
1	5.362	18309	448	0.21
2	7.584	82197	2876	1.36
3	8.869	4431069	207416	98.42

Figura 9C


IgG1-2F8-ITL
146259.5
145000
145400
145800
146200
146600
Da

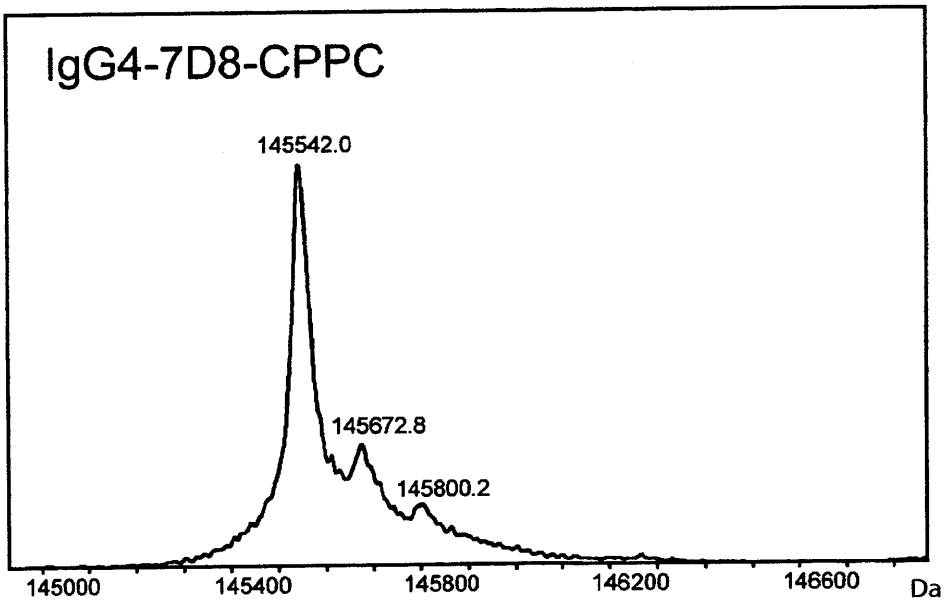
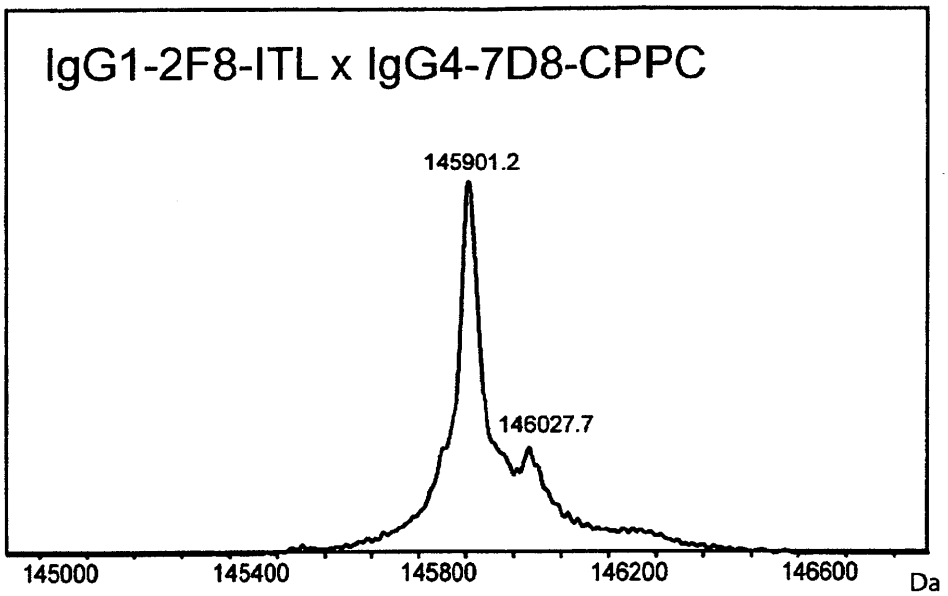

IgG4-7D8-CPPC
145542.0
145672.8
145800.2
145000
145400
145800
146200
146600
Da

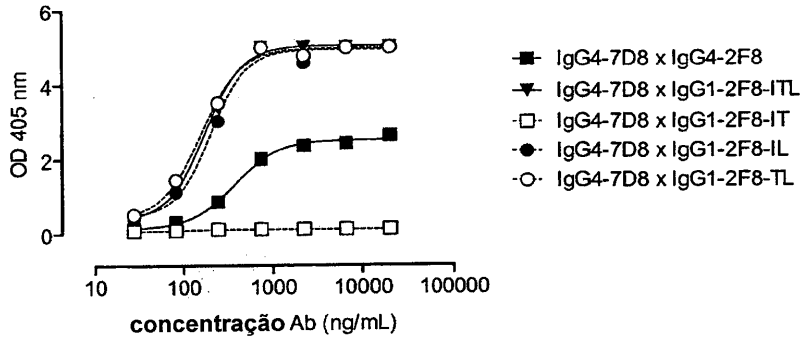
Figura 9 cont.



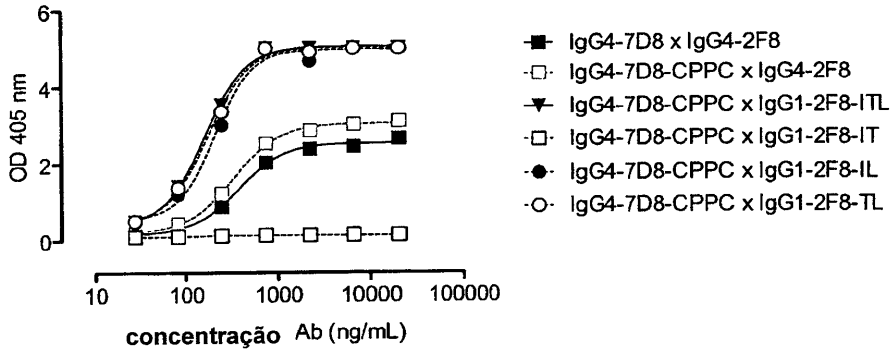
	medido	medido	medido
IgG1-2F8-ITL	146259.5		
IgG4-7D8-CPPC	145542.0	145672.8	145800.2
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-	145901.2	146027.7	

Figura 10

(A)



(B)



(C)

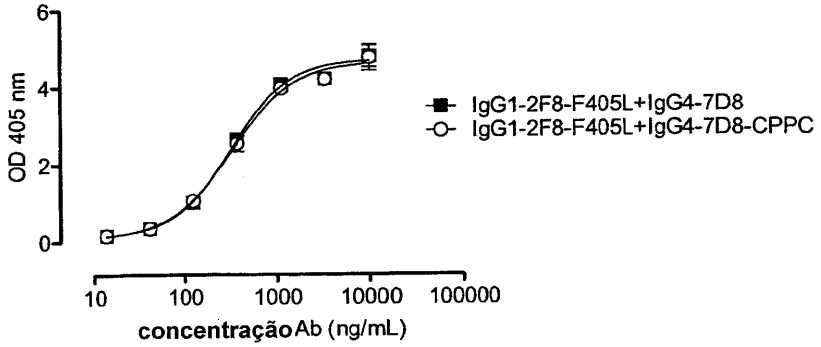


Figura 11

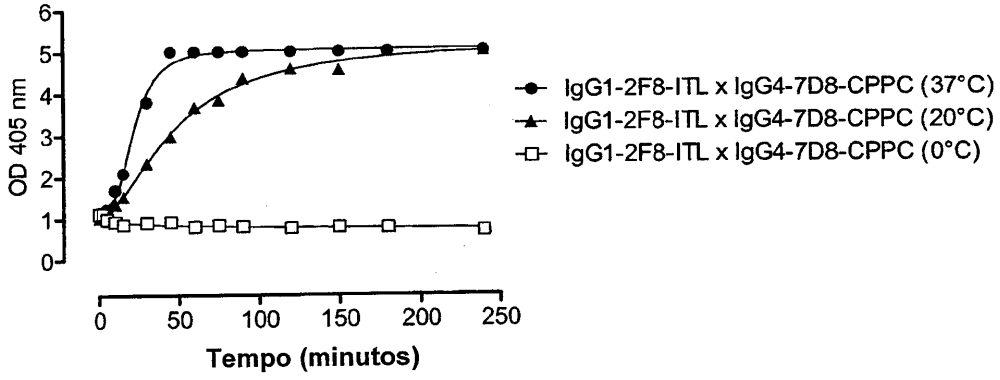

OD 405 nm
0
1
2
3
4
5
6
0
50
100
150
200
250
Tempo (minutos)
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (37°C)
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (20°C)
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (0°C)

Figura 12

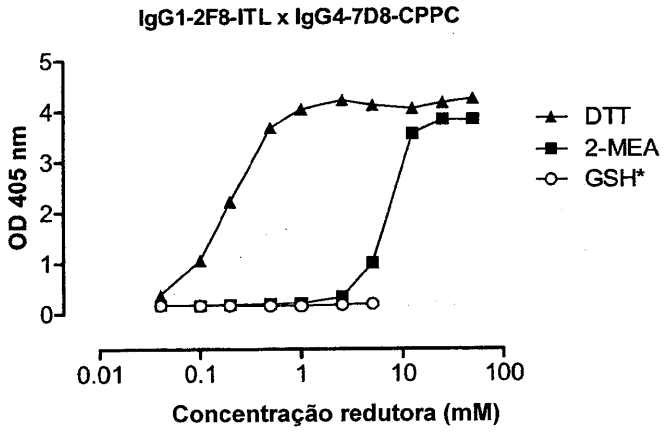
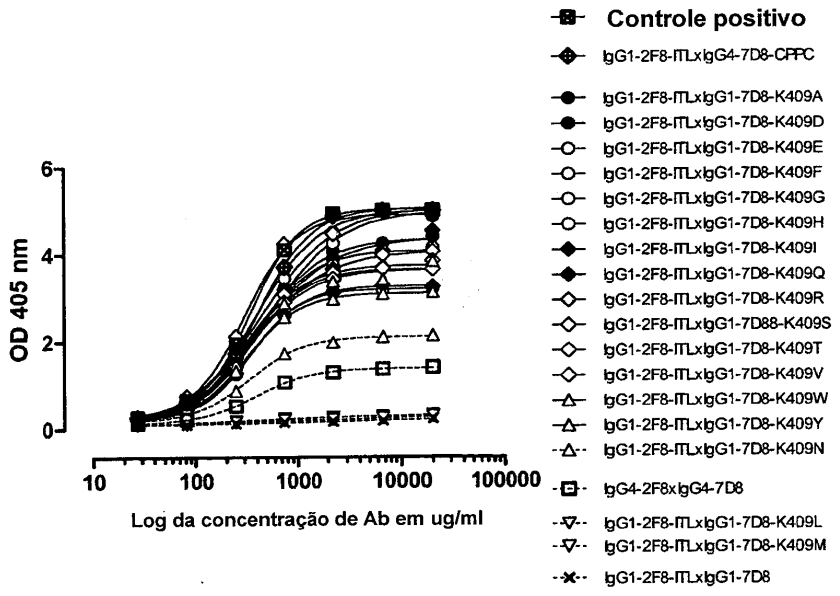

IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC
OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentração redutora (mM)
DTT
2-MEA
GSH*

Figura 13

A


Controle positivo
IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409A
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409D
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409E
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409F
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409G
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409I
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Q
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D88-K409S
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409T
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409V
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409W
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Y
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409N
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409L
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409M
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8
OD 405 nm
0
2
4
6
10
100
1000
10000
100000
Log da concentração de Ab em ug/ml

B

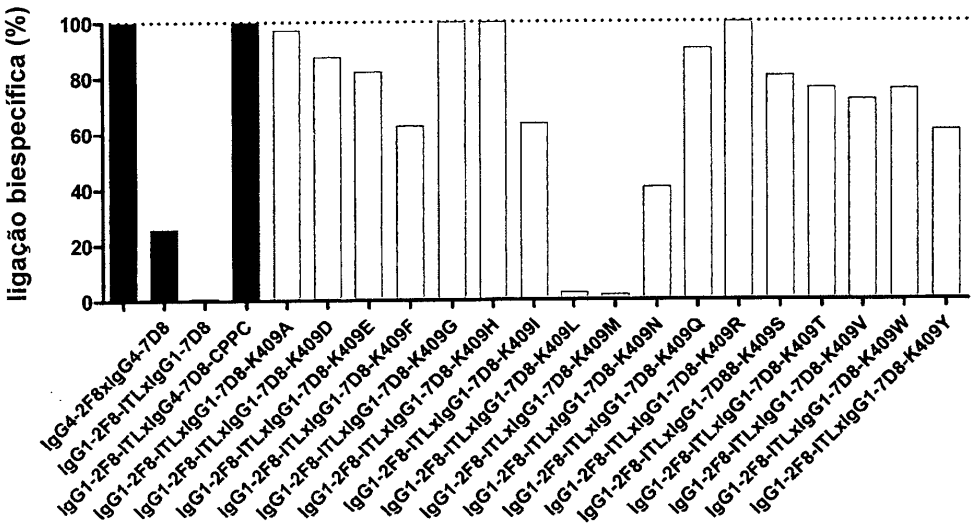

ligação biespecífica (%)
0
20
40
60
80
100
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8
IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409A
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409D
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409E
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409F
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409G
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409I
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409L
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409M
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409N
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Q
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D88-K409S
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409T
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409V
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409W
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Y

Figura 14

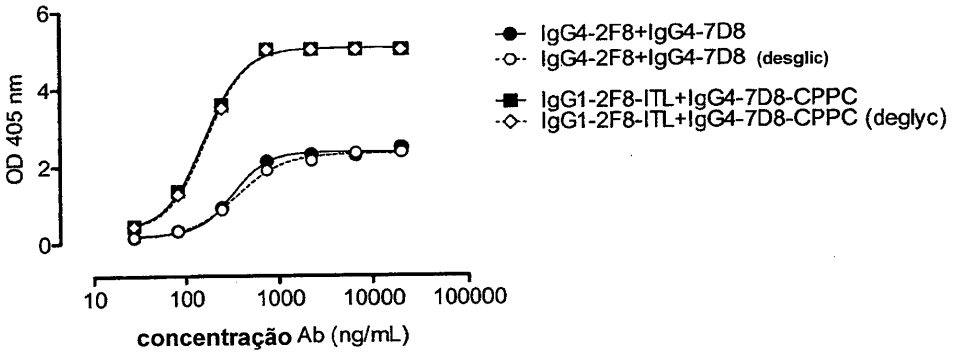

6
4
2
0
OD 405 nm
10
100
1000
10000
100000
concentração Ab (ng/mL)
IgG4-2F8+IgG4-7D8
IgG4-2F8+IgG4-7D8 (desglic)
IgG1-2F8-ITL+IgG4-7D8-CPPC
IgG1-2F8-ITL+IgG4-7D8-CPPC (deglyc)

Figura 15

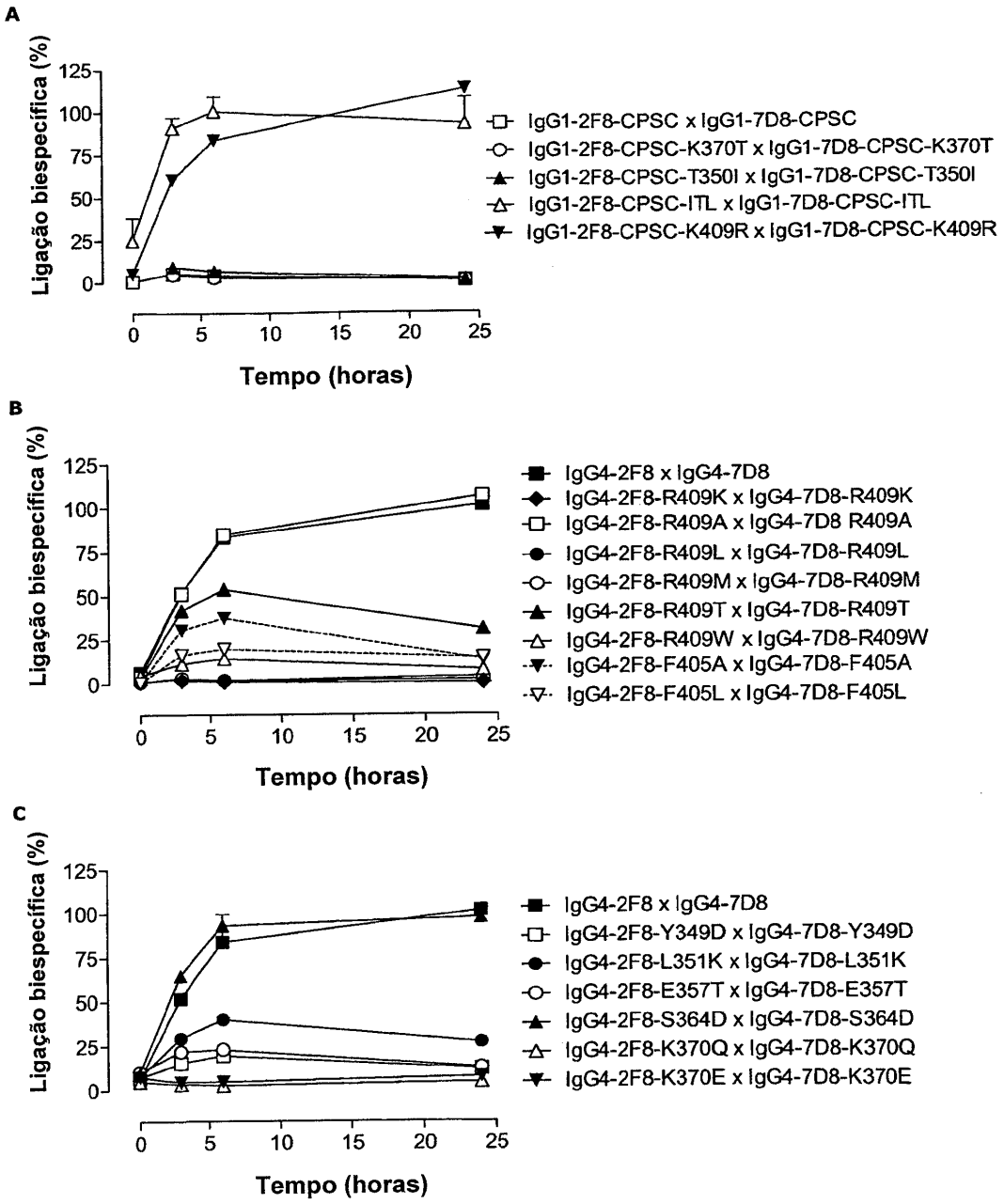
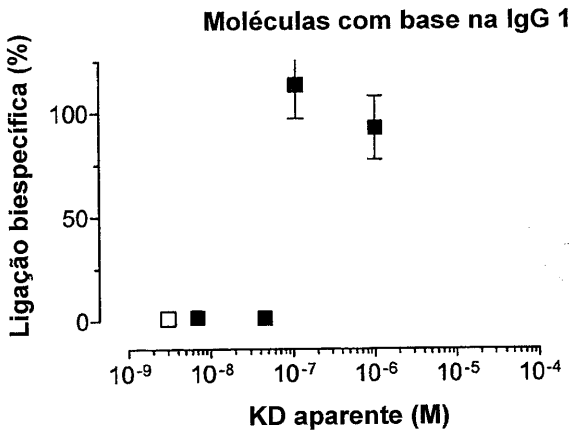

A
Ligação biespecífica (%)
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
Tempo (horas)
IgG1-2F8-CPSC x IgG1-7D8-CPSC
IgG1-2F8-CPSC-K370T x IgG1-7D8-CPSC-K370T
IgG1-2F8-CPSC-T350I x IgG1-7D8-CPSC-T350I
IgG1-2F8-CPSC-ITL x IgG1-7D8-CPSC-ITL
IgG1-2F8-CPSC-K409R x IgG1-7D8-CPSC-K409R
B
Ligação biespecífica (%)
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
Tempo (horas)
IgG4-2F8 x IgG4-7D8
IgG4-2F8-R409K x IgG4-7D8-R409K
IgG4-2F8-R409A x IgG4-7D8 R409A
IgG4-2F8-R409L x IgG4-7D8-R409L
IgG4-2F8-R409M x IgG4-7D8-R409M
IgG4-2F8-R409T x IgG4-7D8-R409T
IgG4-2F8-R409W x IgG4-7D8-R409W
IgG4-2F8-F405A x IgG4-7D8-F405A
IgG4-2F8-F405L x IgG4-7D8-F405L
C
Ligação biespecífica (%)
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
Tempo (horas)
IgG4-2F8 x IgG4-7D8
IgG4-2F8-Y349D x IgG4-7D8-Y349D
IgG4-2F8-L351K x IgG4-7D8-L351K
IgG4-2F8-E357T x IgG4-7D8-E357T
IgG4-2F8-S364D x IgG4-7D8-S364D
IgG4-2F8-K370Q x IgG4-7D8-K370Q
IgG4-2F8-K370E x IgG4-7D8-K370E

Figura 15 cont.

D



E

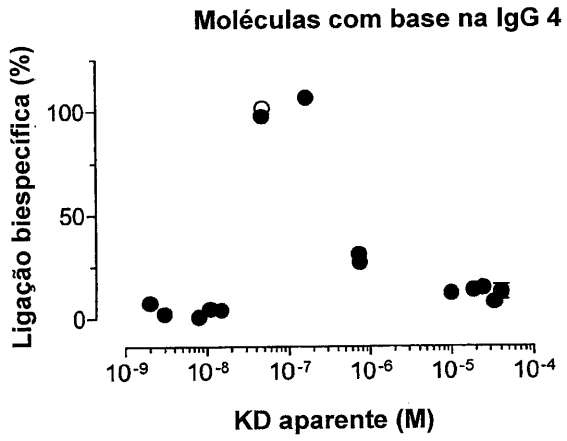


Figura 16

```
                                                                                                               1
EU                1                   2                   3                      4                5           6                   7                   8                   9                   0
        12345678901234567890123456789012345  678901234567890123  4567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890          12
2F8-G1  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH--WVRQAPGKGLEWVAVIWD--DGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDY
2F8-G4  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH--WVRQAPGKGLEWVAVIWD--DGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDY
KABAT                                                                                                                    1
                  1                   2                   3                   4                   5                   6                   7                   8                   9                   0
        12345678901234567890123456789012345556789012345678901222234567890123456789012345678901222234567890123456789000000000012
                                           AB                  ABC                                          ABC                ABCDEFGH

EU      1       1                   1                   1                   1                   1                   1                   1                   1                   1                   2
        0       1                   2                   3                   4                   5                   6                   7                   8                   9                   0
        345678901234567  890123456789012345  567890123456789012345 678     90123456 7890123456 78901234567890123456 6 7890
2F8-G1  WGQGTLVTVSS-----ASTKGPSVFPLAPSSKS--TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV-SW----NSGALTSG-VHTFPAVLQS-SGLYSLSSVVTVPSSSLGT--Q-TYIC
2F8-G4  WGQGTLVTVSS-----ASTKGPSVFPLAPCSRS--TSESTAALGCLVKDYFPEPVTV-SW----NSGALTSG-VHTFPAVLQS-SGLYSLSSVVTVPSSSLGT--K-TYTC
KABAT   1       1                   1                   1                   1                   1                   1                   1                   1                   1                   2
        0       1                   2                   3                   4                   5                   6                   7                   8                   9                   0
        3456789012333333456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678
                  ABCDE

EU      2           2                    2                                                                                                  2                              2         2
        0           1                    2                                                                                                  3                              4         5
        12345678901 234       567890 1  2345678                                                                                     90         12   345678   901234567890
2F8-G1  NVNHKPSNTKV-DKR-----VEPKSC-D--KTHTCPP-----------------------------------------------------CP---------AP---ELLGGP--SVFLFPPKPKDT
2F8-G3  NVNHKPSNTKV-DKR-----VELKTP-LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP---------AP---ELLGGP--SVFLFPPKPKDT
2F8-G4  NVDHKPSNTKV-DKR-----VESKYG------PPCPS-----------------------------------------------------CP---------AP---EFLGGP--SVFLFPPKPKDT
KABAT   22          2                    2          2                                                                                                        2         2
        01          2                    3          4                                                                                                        5         6
        901234567899012333345678901234567890111111111111111111111111111111111111111111111111112333333333345555678901112345678901 23
                    A       ABC                        ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZABCDEFGHIJKLMNOPQRS   ABCDEFGHI   ABC        AB
                                                                                 ABCDEFGHIJKLMNOPQRS

EU      2         2         2         2        2         3
        5         6         7         8        9         0
        12345678901234567890123456789  01  234567890123456 7  890
2F8-G1  LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV--DG--VEVHNAKTKPREEQYN--STY
2F8-G4  LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV--DG--VEVHNAKTKPREEQFN--STY
KABAT   2     2         2         2         3         3
        6     7         8         9         0         1
        456789012345678901234567890123456789012345678901234567 89

EU      3         3         3         3          3         3           3         3          3          3         4
        0         1         2         3          4         5           6         7          8          9         0
        123456789012345678901234567890 12 3456 78901 2345678901234567  890123456789012345 6789 01234 56  78901234567890
2F8-G1  RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI-EKTI-SKAKG-QPREPQVYTLPPSRDE--LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV--EWESN-GQ--PENNYKTTPPVLDS
2F8-G4  RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI-EKTI-SKAKG-QPREPQVYTLPPSQEE--MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV--EWESN-GQ--PENNYKTTPPVLDS
KABAT   3         3         3         3         3         3         3         3         4         4         4
        2         3         4         5         6         7         8         9         0         1         2
        01234567890123456789012345678901123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678
                                         A

EU      4         4
        0         1         2         3         4
        1   234567890123456789012345678901234567 8901234567
2F8-G1  -D--GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2F8-G4  -D--GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
KABAT   4         4         4         4         4
        3         4         5         6         7
        90123456789012345678901234567890123456789012345678
```

Figura 17

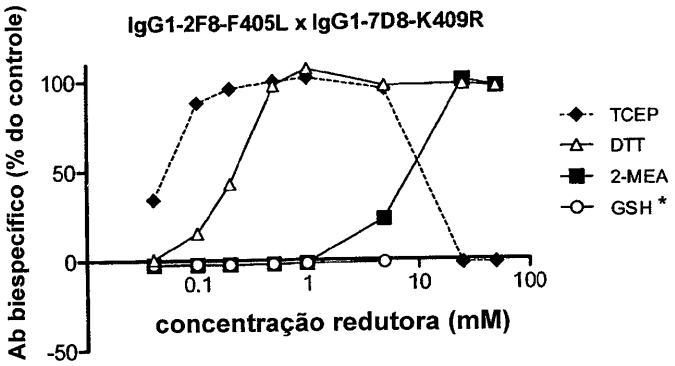
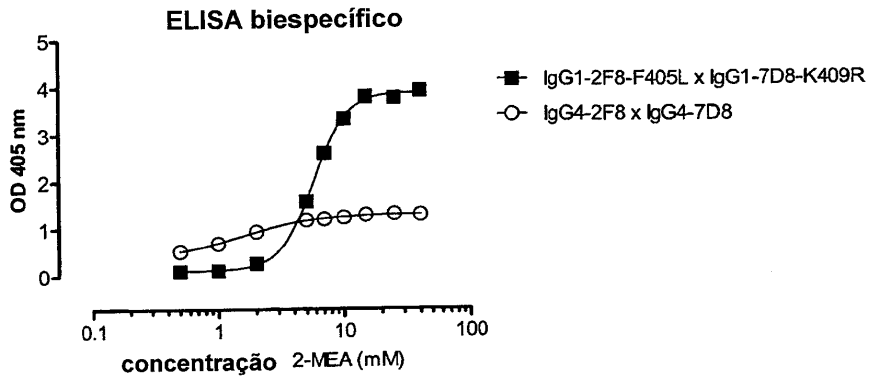

IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R
Ab biespecífico (% do controle)
100
50
0
-50
0.1
1
10
100
concentração redutora (mM)
TCEP
DTT
2-MEA
GSH *

Figura 18

A


ELISA biespecífico
OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
0.1
1
10
100
concentração 2-MEA (mM)
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8 x IgG4-7D8

B

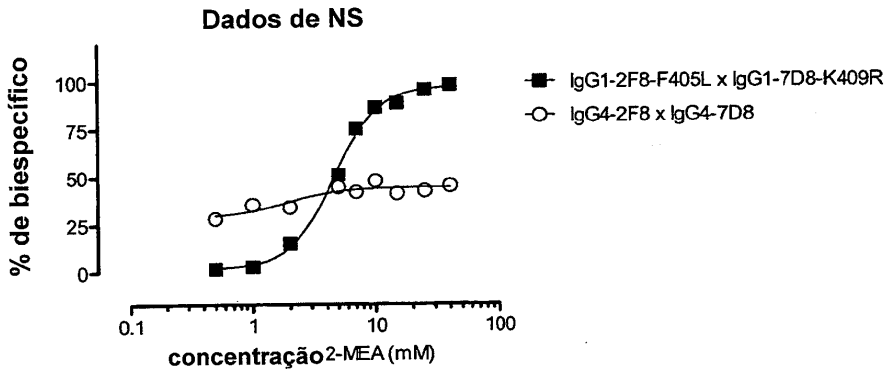
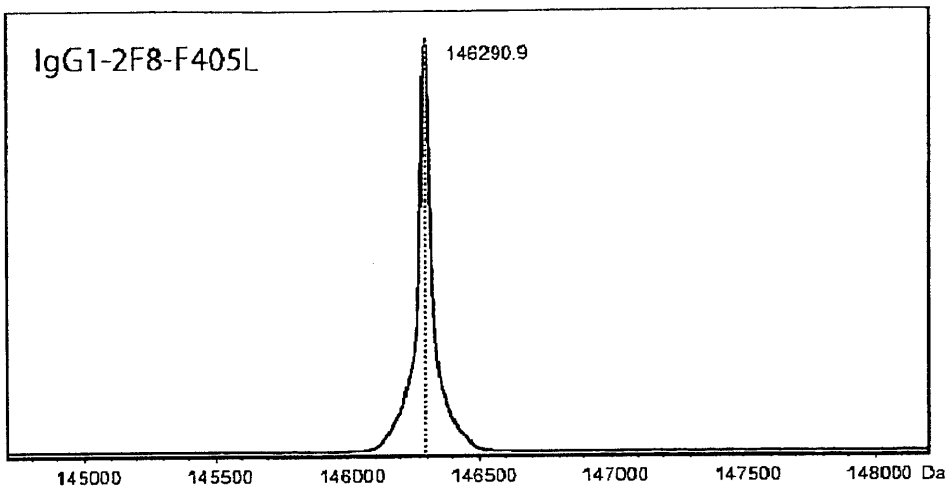

Dados de NS
% de biespecífico
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
concentração 2-MEA (mM)
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8 x IgG4-7D8

Figura 19


IgG1-2F8-F405L
146290.9
145000
145500
146000
146500
147000
147500
148000 Da

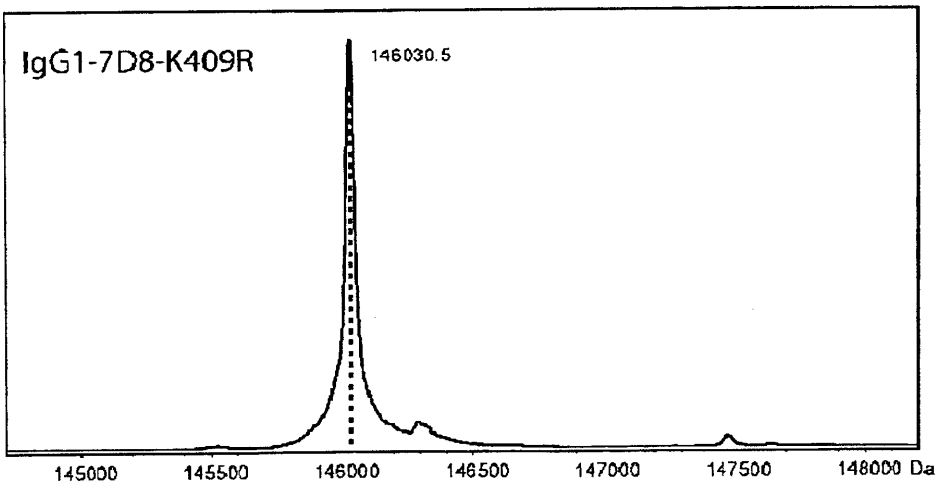
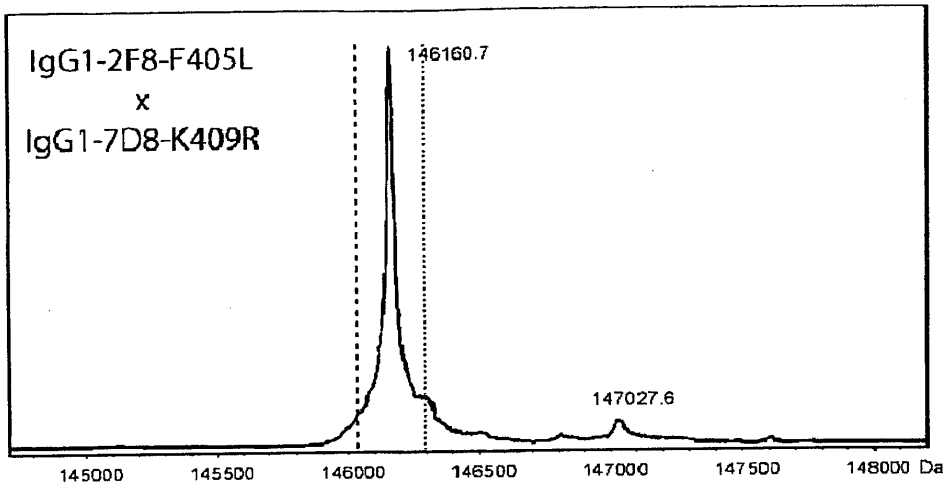

IgG1-7D8-K409R
146030.5
145000
145500
146000
146500
147000
147500
148000 Da

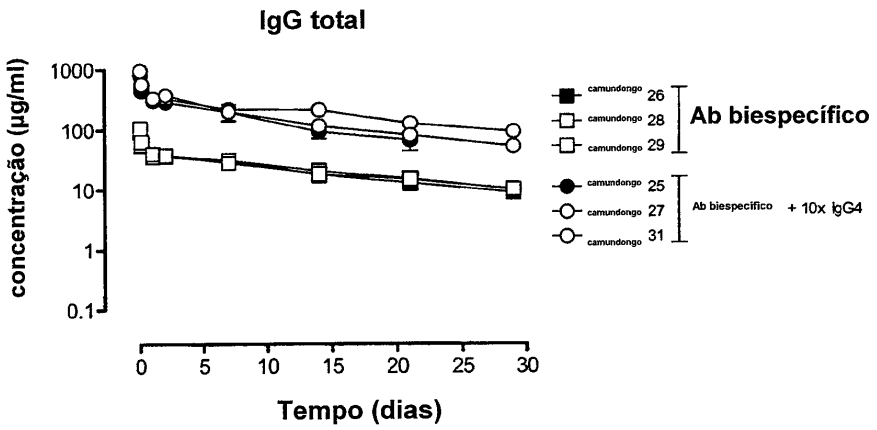
Figura 19 cont.



	PM medido
IgG1-2F8-F405L	**146,290.9**
IgG1-7D8-K409R	**146,030.5**
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R	**146,160.7**

Figura 20

A


IgG total
concentração (µg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
25
30
Tempo (dias)
camundongo 26
camundongo 28
camundongo 29
Ab biespecífico
camundongo 25
camundongo 27
camundongo 31
Ab biespecífico + 10x IgG4

B

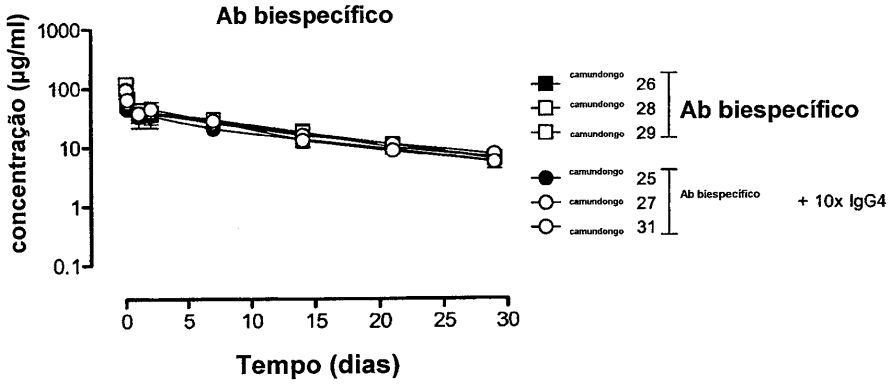

Ab biespecífico
concentração (µg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
25
30
Tempo (dias)
camundongo 26
camundongo 28
camundongo 29
Ab biespecífico
camundongo 25
camundongo 27
camundongo 31
Ab biespecífico + 10x IgG4

Figura 21

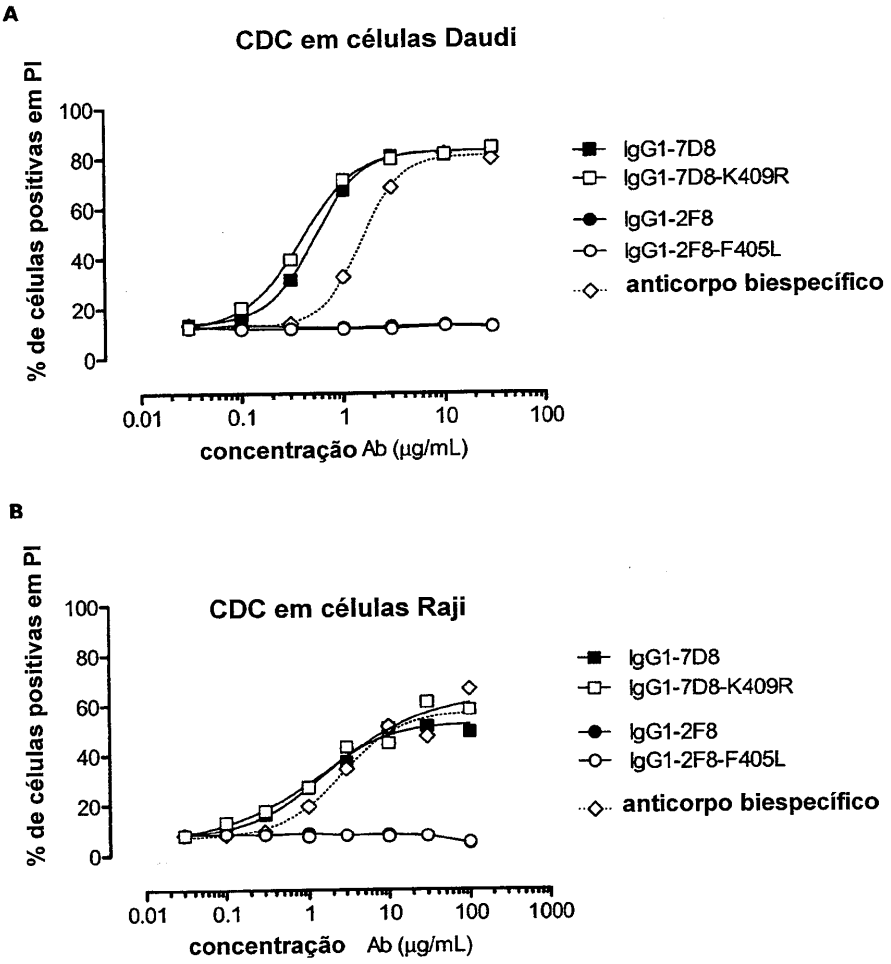

A
CDC em células Daudi
% de células positivas em PI
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
concentração Ab (µg/mL)
IgG1-7D8
IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8
IgG1-2F8-F405L
anticorpo biespecífico
B
CDC em células Raji
% de células positivas em PI
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
concentração Ab (µg/mL)
IgG1-7D8
IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8
IgG1-2F8-F405L
anticorpo biespecífico

Figura 22

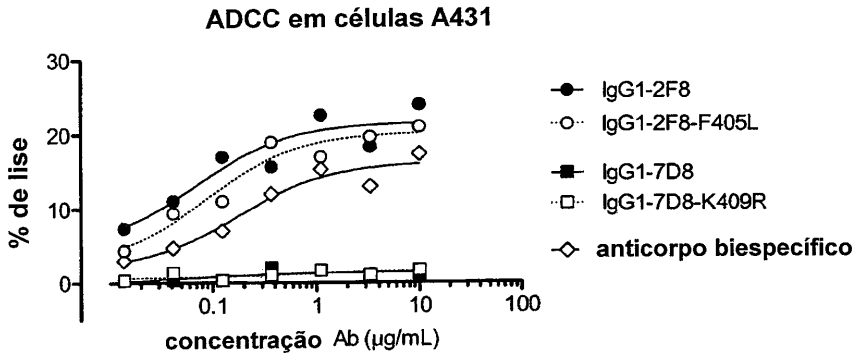
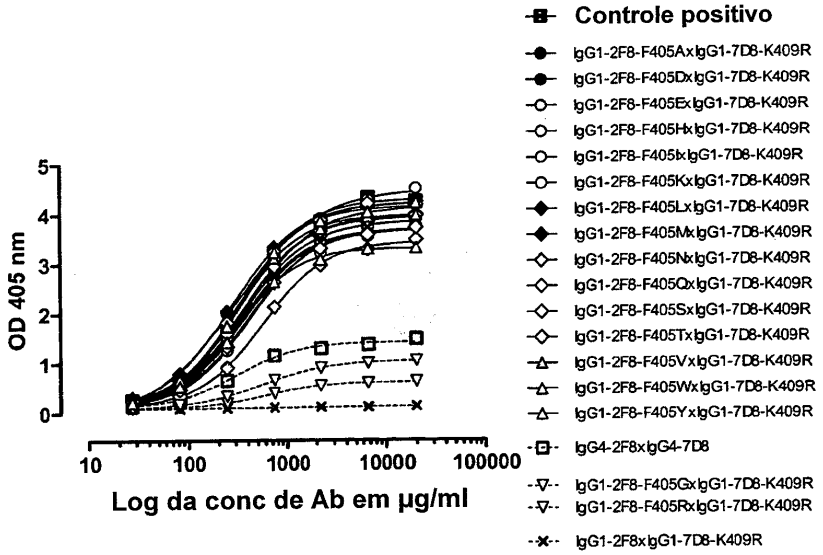
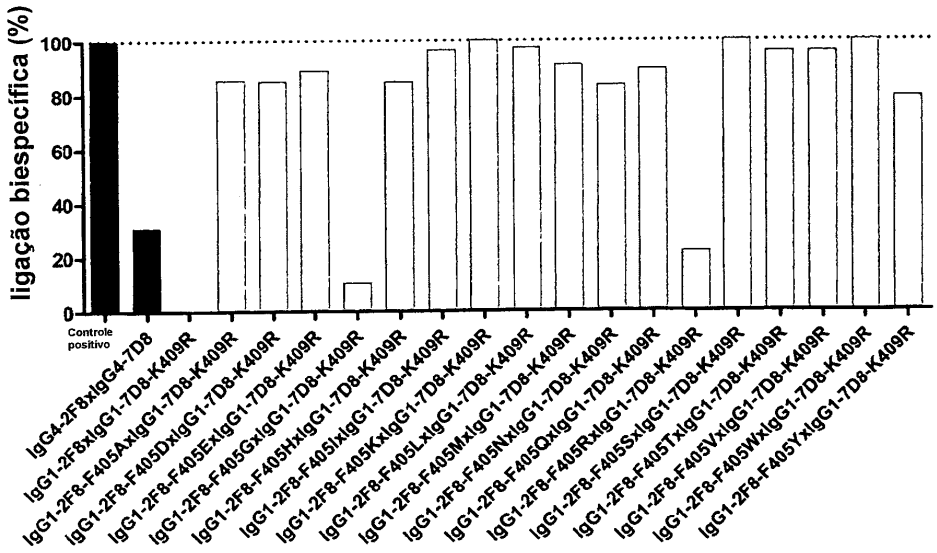

ADCC em células A431
% de lise
30
20
10
0
0.1
1
10
100
concentração Ab (µg/mL)
IgG1-2F8
IgG1-2F8-F405L
IgG1-7D8
IgG1-7D8-K409R
anticorpo biespecífico

Figura 23

A



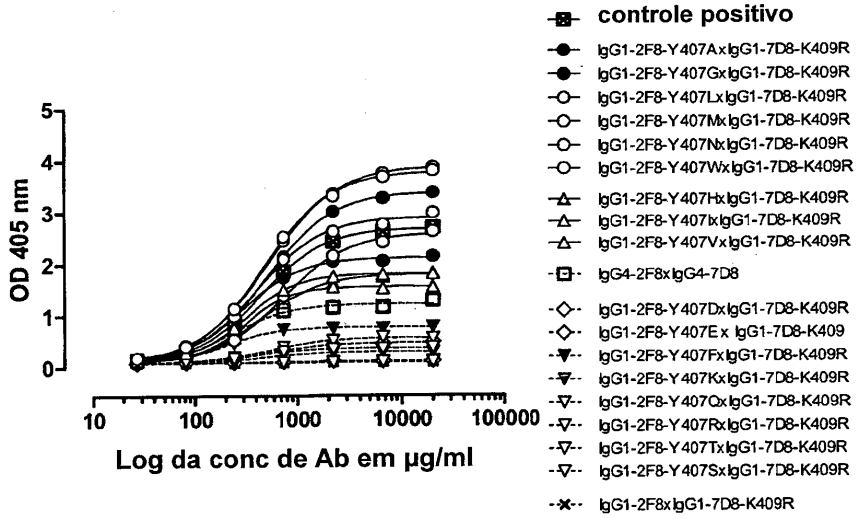
B



B

Figura 24

A


controle positivo
IgG1-2F8-Y407AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407VxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-Y407DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407Ex IgG1-7D8-K409
IgG1-2F8-Y407FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
OD 405 nm
0
1
2
3
4
5
10
100
1000
10000
100000
Log da conc de Ab em µg/ml

B

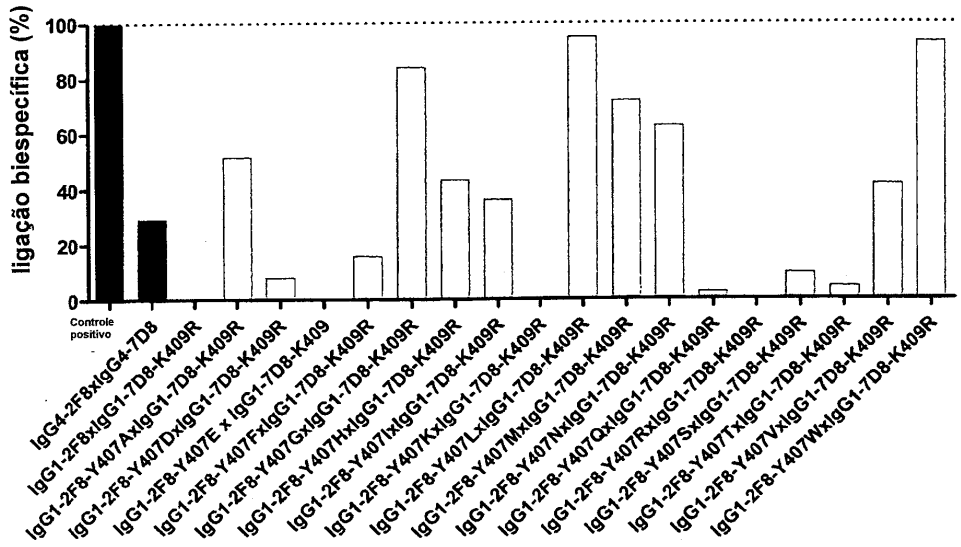

ligação biespecífica (%)
0
20
40
60
80
100
Controle positivo
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407E x IgG1-7D8-K409
IgG1-2F8-Y407FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407WxIgG1-7D8-K409R

Figura 25

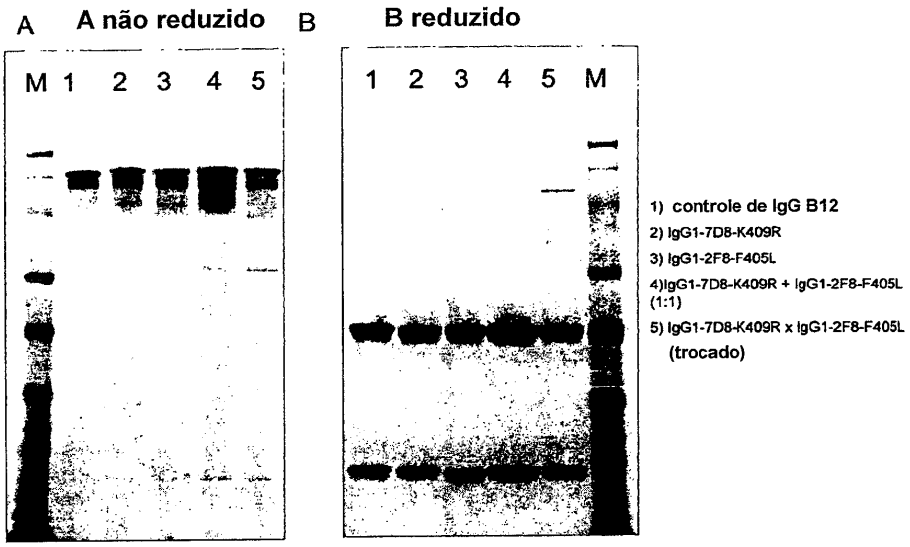

A
A não reduzido
B
B reduzido
M 1 2 3 4 5
1 2 3 4 5 M
1) controle de IgG B12
2) IgG1-7D8-K409R
3) IgG1-2F8-F405L
4)IgG1-7D8-K409R + IgG1-2F8-F405L (1:1)
5) IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L (trocado)

Figura 26

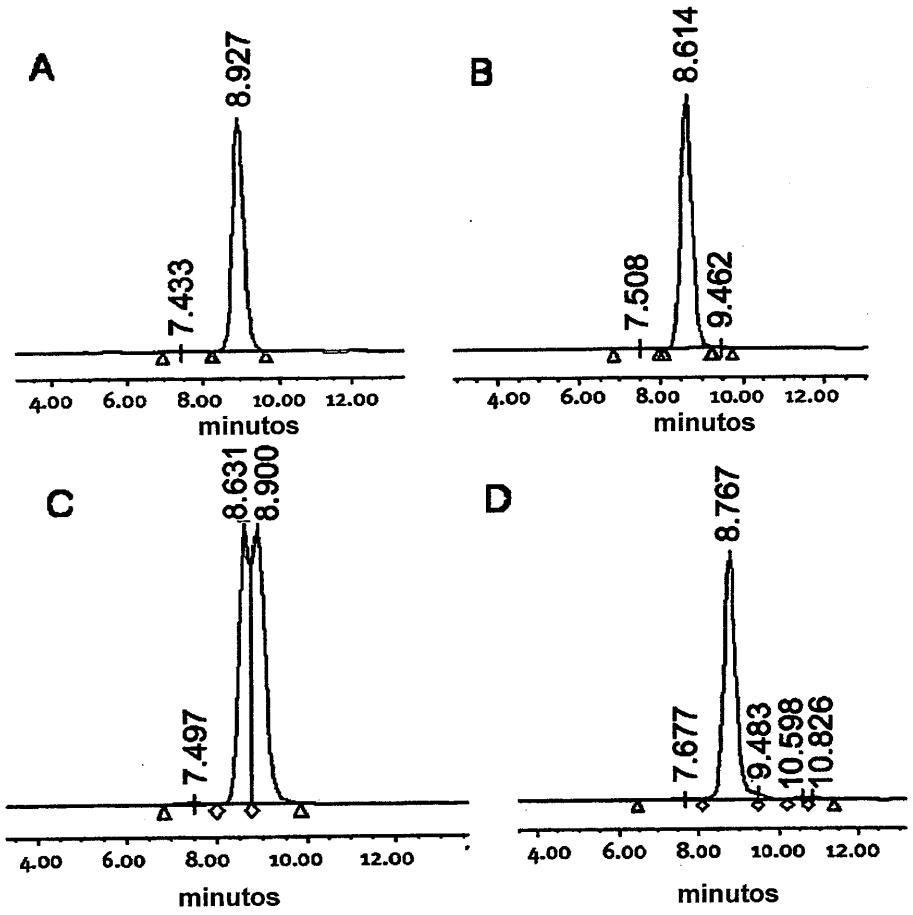

A
8.927
7.433
4.00 6.00 8.00 10.00 12.00
minutos
B
8.614
7.508
9.462
4.00 6.00 8.00 10.00 12.00
minutos
C
8.631
8.900
7.497
4.00 6.00 8.00 10.00 12.00
minutos
D
8.767
7.677
9.483
10.598
10.826
4.00 6.00 8.00 10.00 12.00
minutos

Figura 27

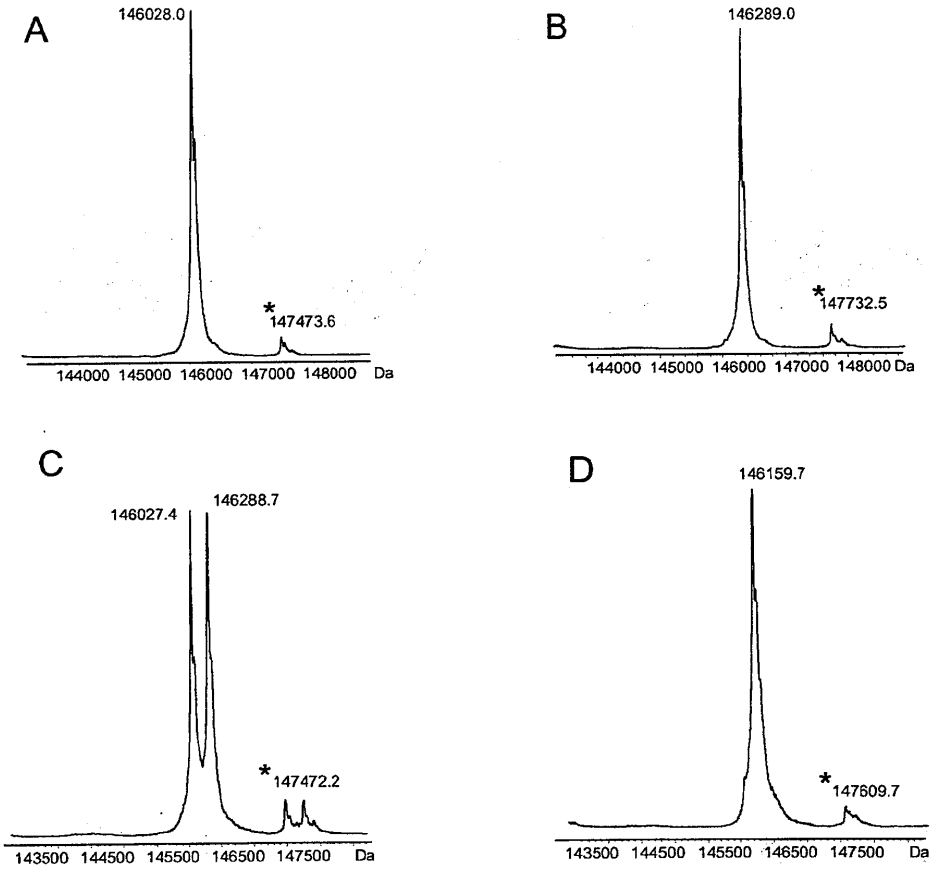

A
146028.0
*147473.6
144000 145000 146000 147000 148000 Da
B
146289.0
*147732.5
144000 145000 146000 147000 148000 Da
C
146027.4
146288.7
*147472.2
143500 144500 145500 146500 147500 Da
D
146159.7
*147609.7
143500 144500 145500 146500 147500 Da

Figura 28

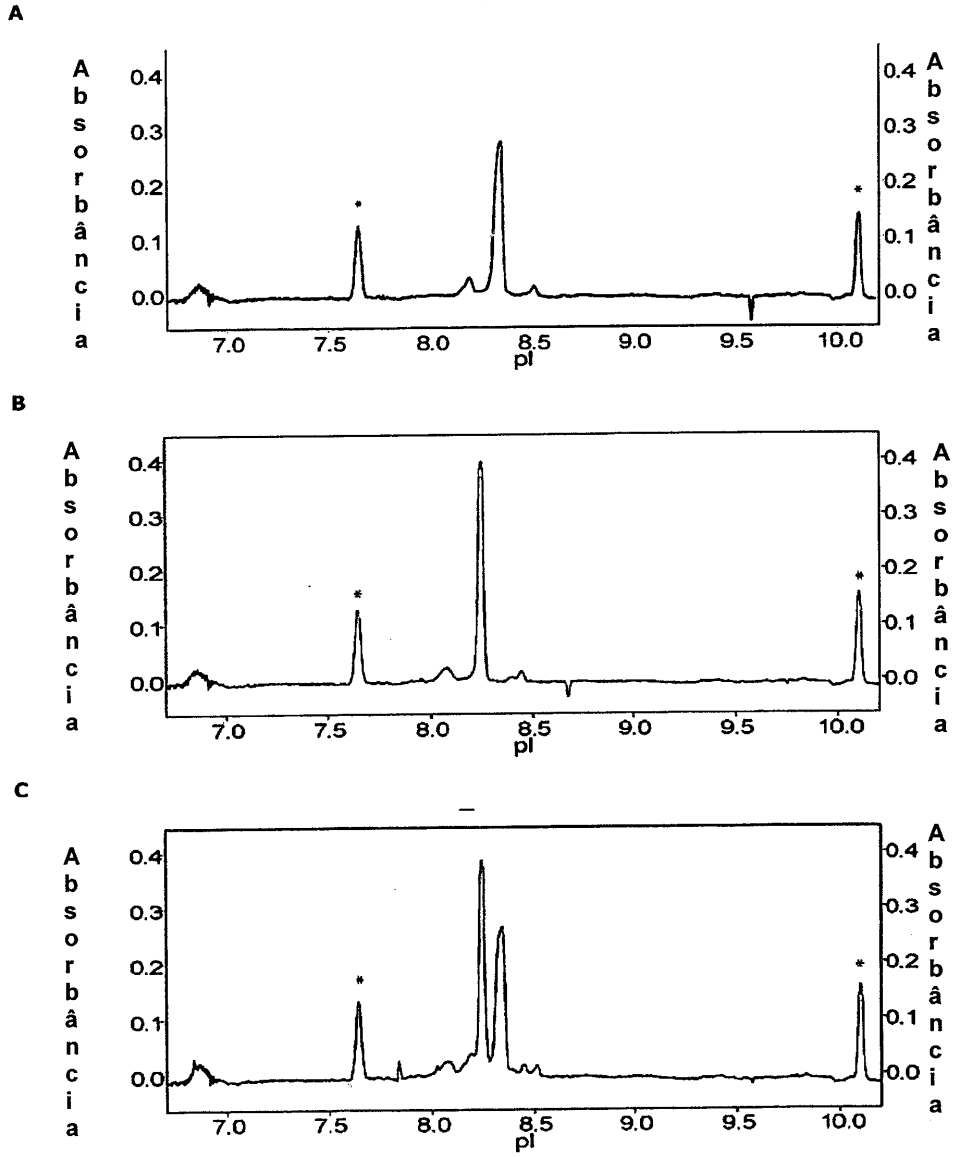


Figura 28 cont.

D

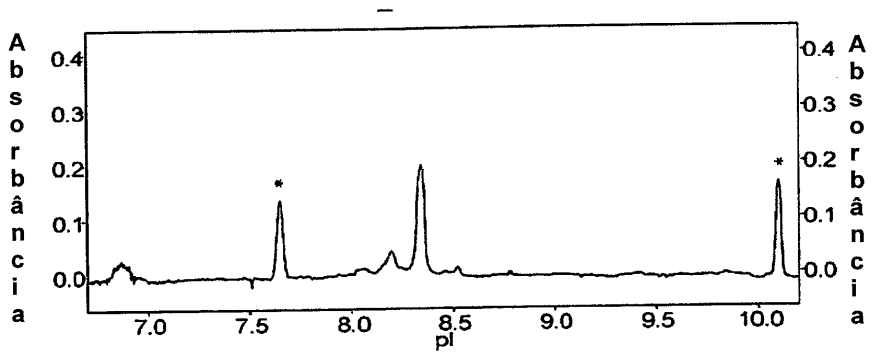


Figura 29

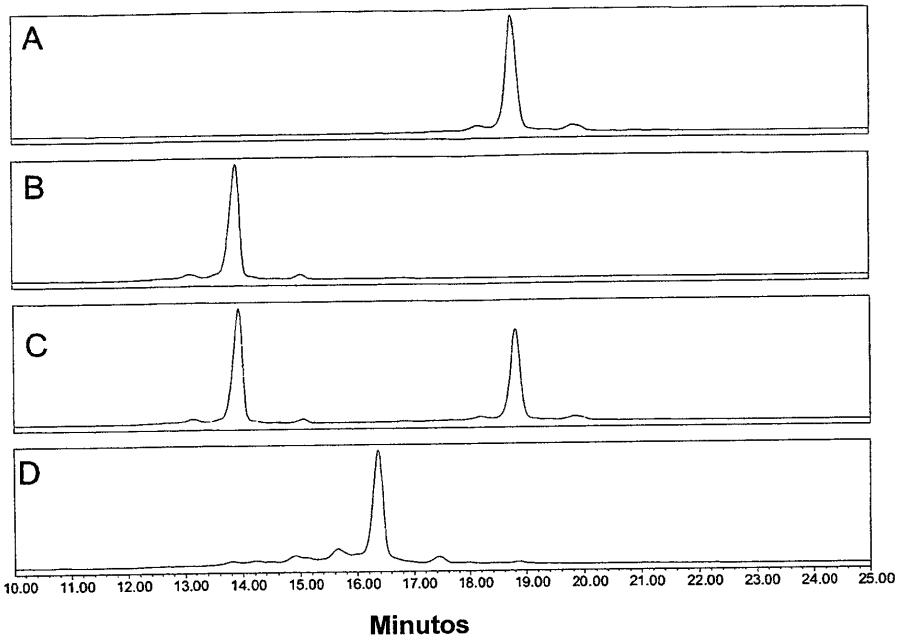

A
B
C
D
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
23.00
24.00
25.00
Minutos

Figura 30

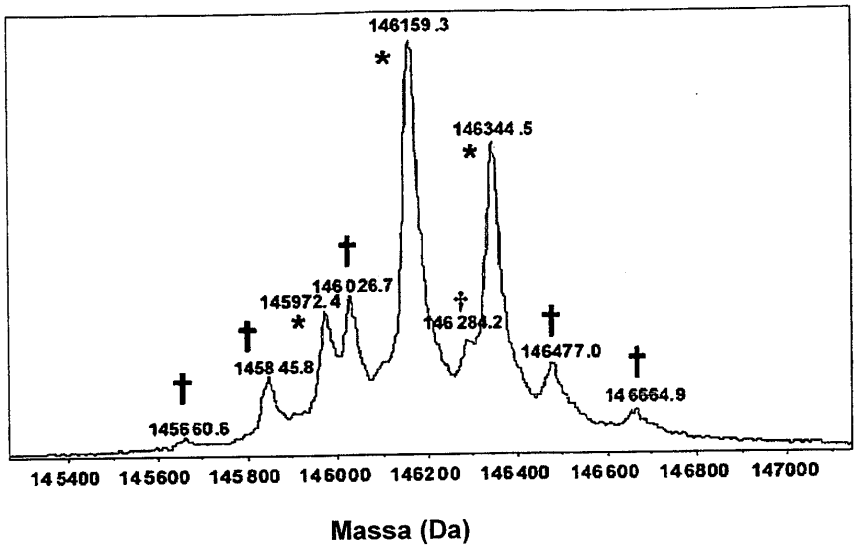

146159.3
*
146344.5
*
146026.7
145972.4
*
146284.2
145845.8
146477.0
146664.9
145560.6
145400
145600
145800
146000
146200
146400
146600
146800
147000
Massa (Da)

Figura 31

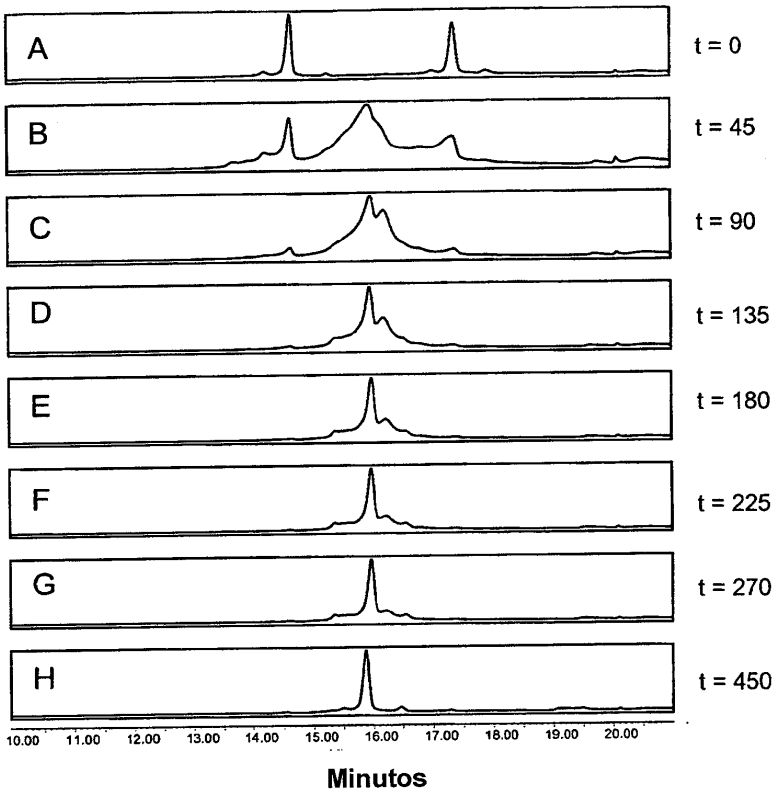

A
B
C
D
E
F
G
H
t = 0
t = 45
t = 90
t = 135
t = 180
t = 225
t = 270
t = 450
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
Minutos

Figura 32

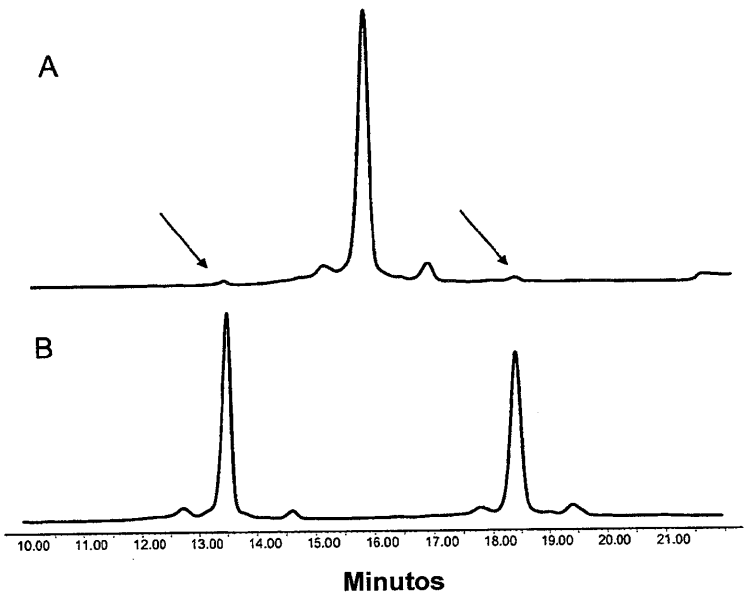
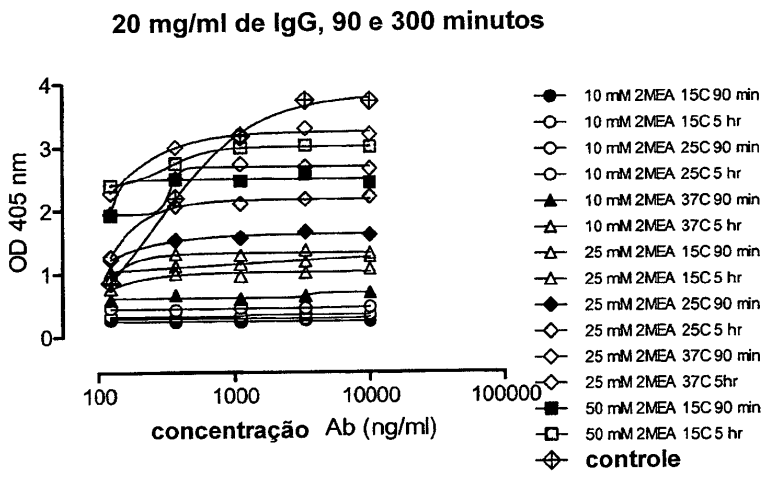

A
B
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
Minutos

Figura 33

A


20 mg/ml de IgG, 90 e 300 minutos
OD 405 nm
0
1
2
3
4
100
1000
10000
100000
concentração Ab (ng/ml)
10 mM 2MEA 15C 90 min
10 mM 2MEA 15C 5 hr
10 mM 2MEA 25C 90 min
10 mM 2MEA 25C 5 hr
10 mM 2MEA 37C 90 min
10 mM 2MEA 37C 5 hr
25 mM 2MEA 15C 90 min
25 mM 2MEA 15C 5 hr
25 mM 2MEA 25C 90 min
25 mM 2MEA 25C 5 hr
25 mM 2MEA 37C 90 min
25 mM 2MEA 37C 5hr
50 mM 2MEA 15C 90 min
50 mM 2MEA 15C 5 hr
controle

B

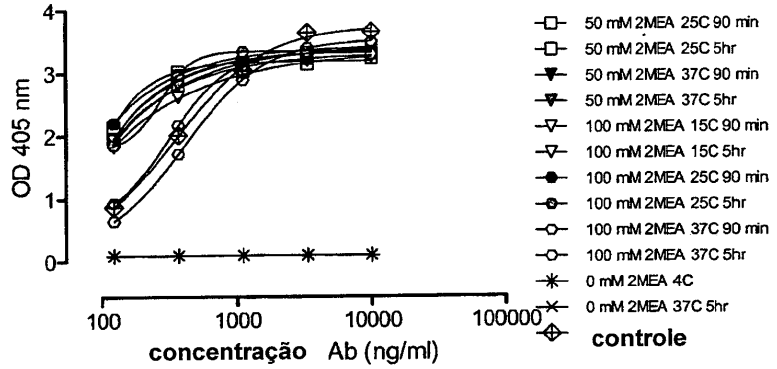
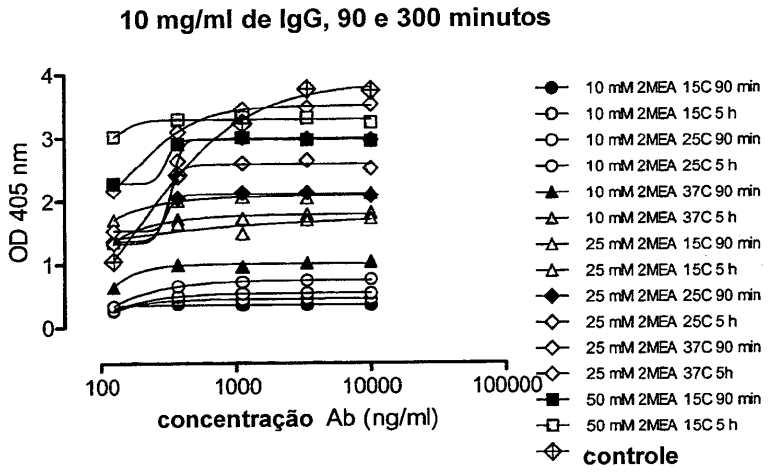

20 mg/ml de IgG, 90 e 300 minutos
OD 405 nm
0
1
2
3
4
100
1000
10000
100000
concentração Ab (ng/ml)
50 mM 2MEA 25C 90 min
50 mM 2MEA 25C 5hr
50 mM 2MEA 37C 90 min
50 mM 2MEA 37C 5hr
100 mM 2MEA 15C 90 min
100 mM 2MEA 15C 5hr
100 mM 2MEA 25C 90 min
100 mM 2MEA 25C 5hr
100 mM 2MEA 37C 90 min
100 mM 2MEA 37C 5hr
0 mM 2MEA 4C
0 mM 2MEA 37C 5hr
controle

Figura 33 cont.

C



D

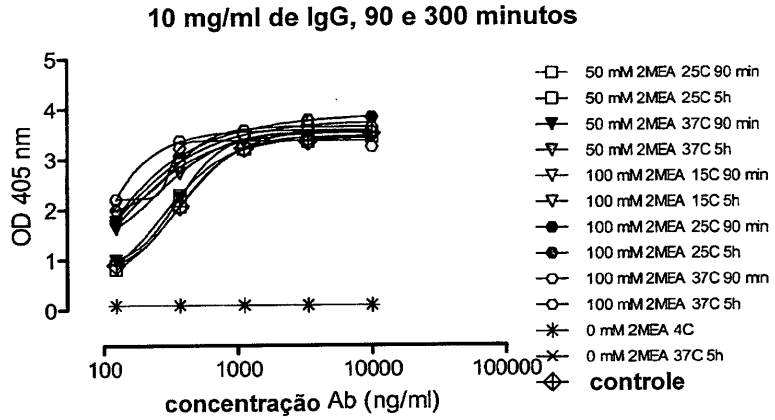
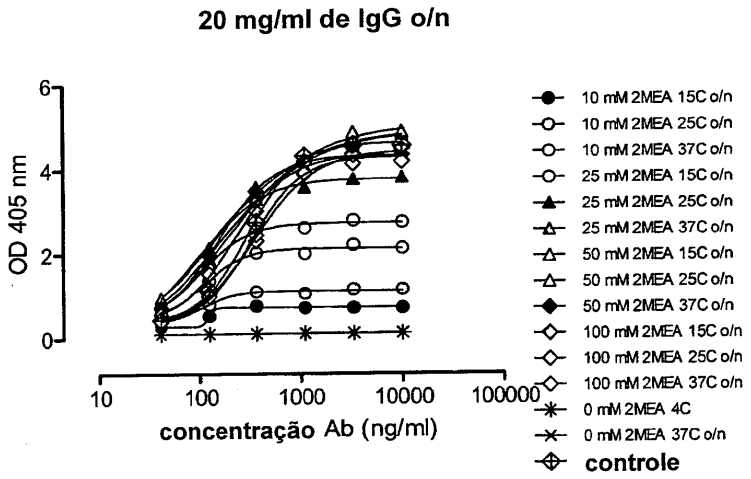


Figura 33 cont.

E



F

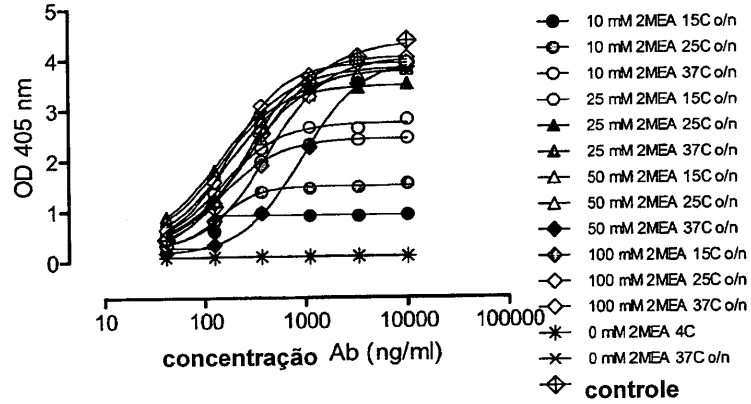
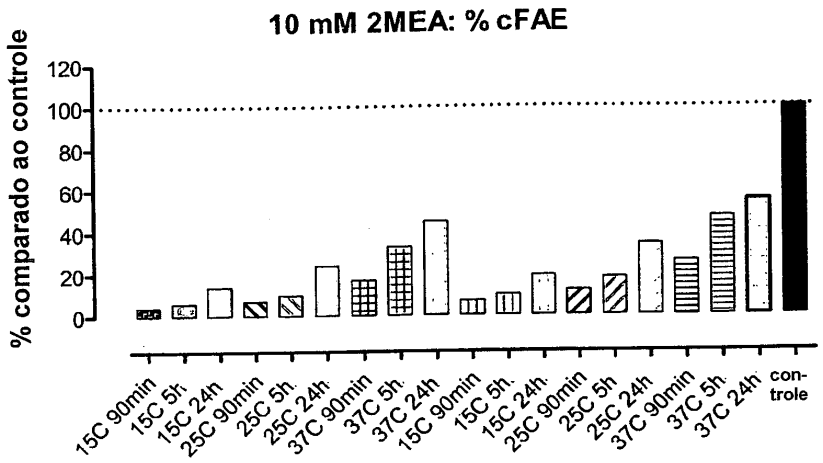


Figura 34

A


10 mM 2MEA: % cFAE
% comparado ao controle
120
100
80
60
40
20
0
15C 90min
15C 5h
15C 24h
25C 90min
25C 5h
25C 24h
37C 90min
37C 5h
37C 24h
15C 90min
15C 5h
15C 24h
25C 90min
25C 5h
25C 24h
37C 90min
37C 5h
37C 24h
con-
trole

B

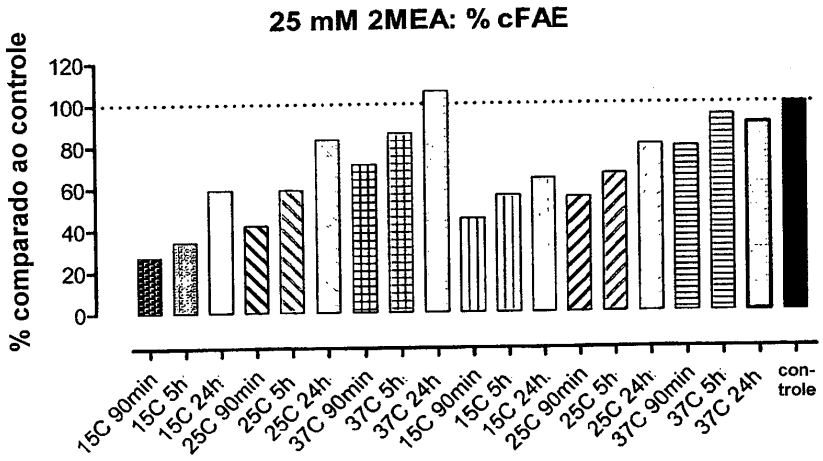
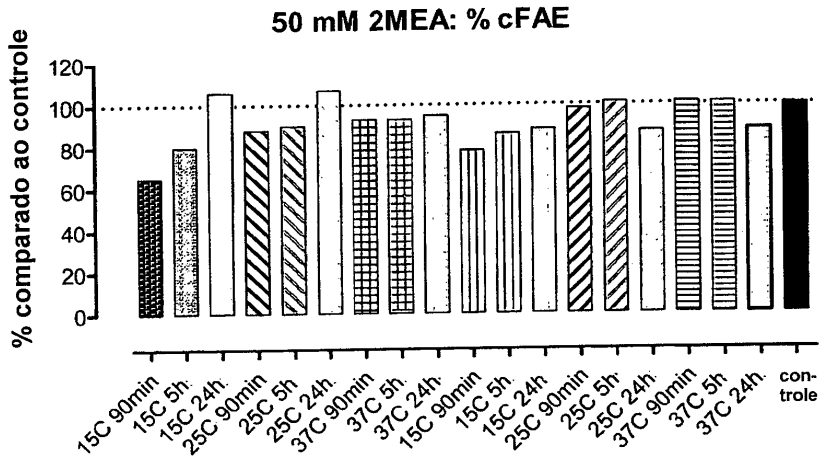

25 mM 2MEA: % cFAE
% comparado ao controle
120
100
80
60
40
20
0
15C 90min
15C 5h
15C 24h
25C 90min
25C 5h
25C 24h
37C 90min
37C 5h
37C 24h
15C 90min
15C 5h
15C 24h
25C 90min
25C 5h
25C 24h
37C 90min
37C 5h
37C 24h
con-
trole

Figura 34 cont.

C



D

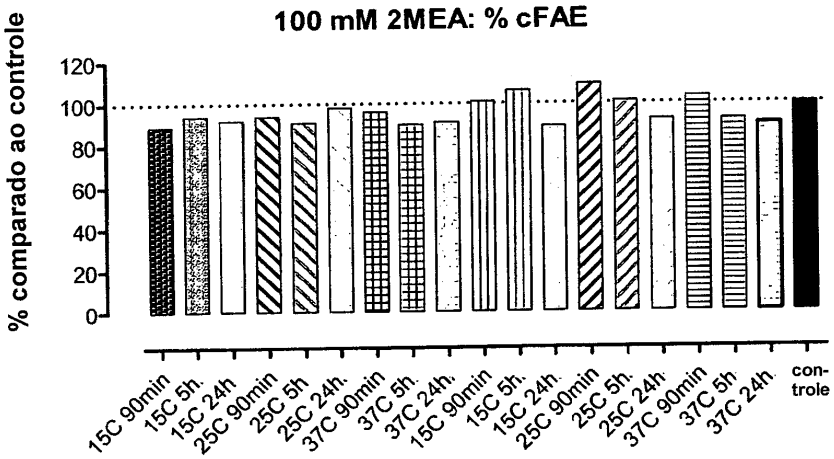
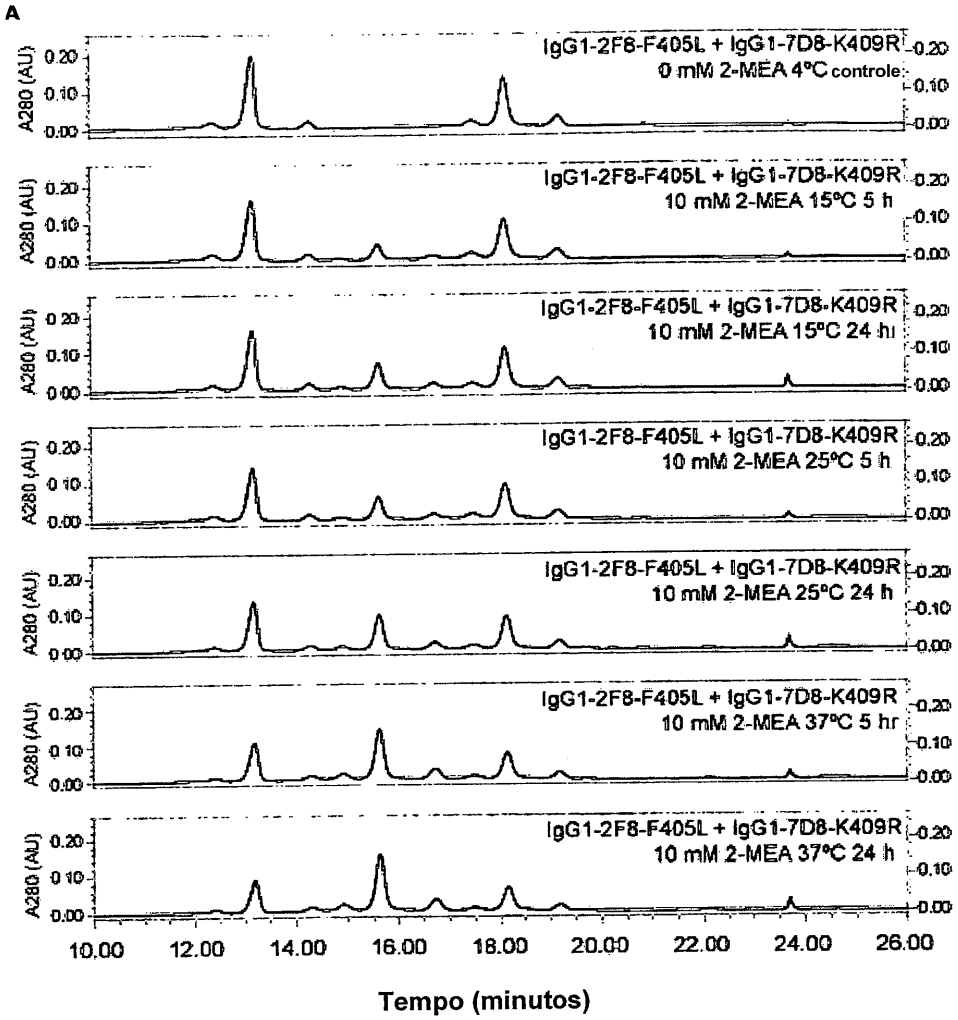
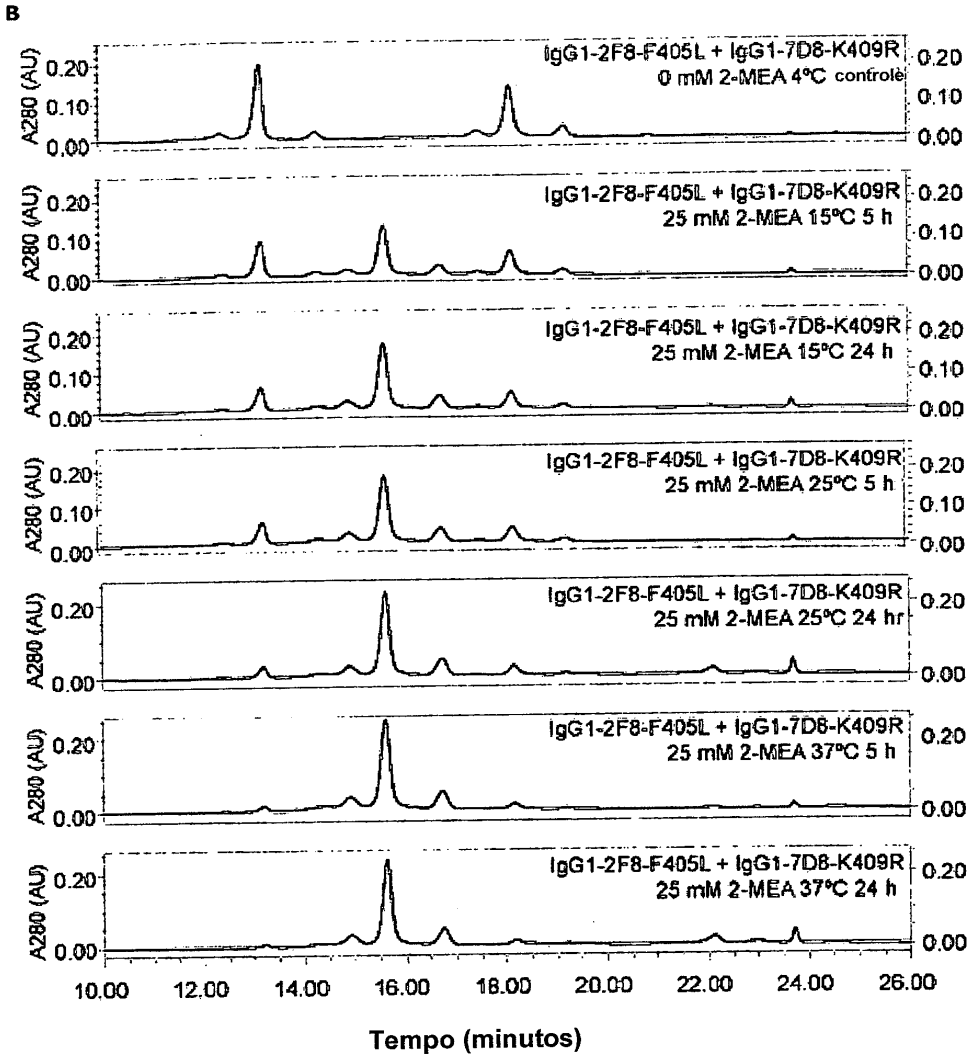
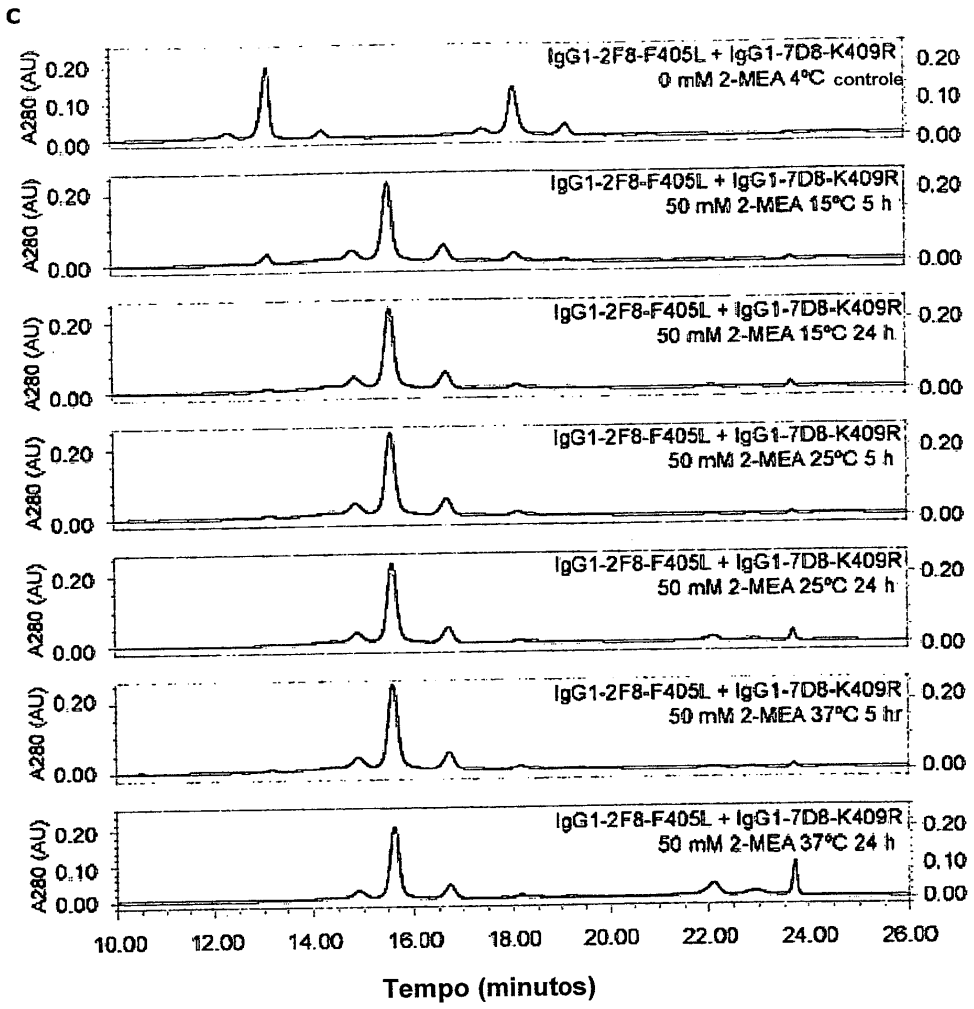


Figura 35


A
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
0 mM 2-MEA 4°C controle
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
10 mM 2-MEA 15°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
10 mM 2-MEA 15°C 24 hr
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
10 mM 2-MEA 25°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
10 mM 2-MEA 25°C 24 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
10 mM 2-MEA 37°C 5 hr
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
10 mM 2-MEA 37°C 24 h
A280 (AU)
0.20
0.10
0.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
Tempo (minutos)


B
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
0 mM 2-MEA 4°C controle
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
25 mM 2-MEA 15°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
25 mM 2-MEA 15°C 24 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
25 mM 2-MEA 25°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
25 mM 2-MEA 25°C 24 hr
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
25 mM 2-MEA 37°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
25 mM 2-MEA 37°C 24 h
A280 (AU)
0.20
0.10
0.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
Tempo (minutos)


c
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
0 mM 2-MEA 4°C controle
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
50 mM 2-MEA 15°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
50 mM 2-MEA 15°C 24 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
50 mM 2-MEA 25°C 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
50 mM 2-MEA 25°C 24 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
50 mM 2-MEA 37°C 5 hr
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
50 mM 2-MEA 37°C 24 h
A280 (AU)
0.20
0.10
0.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
Tempo (minutos)

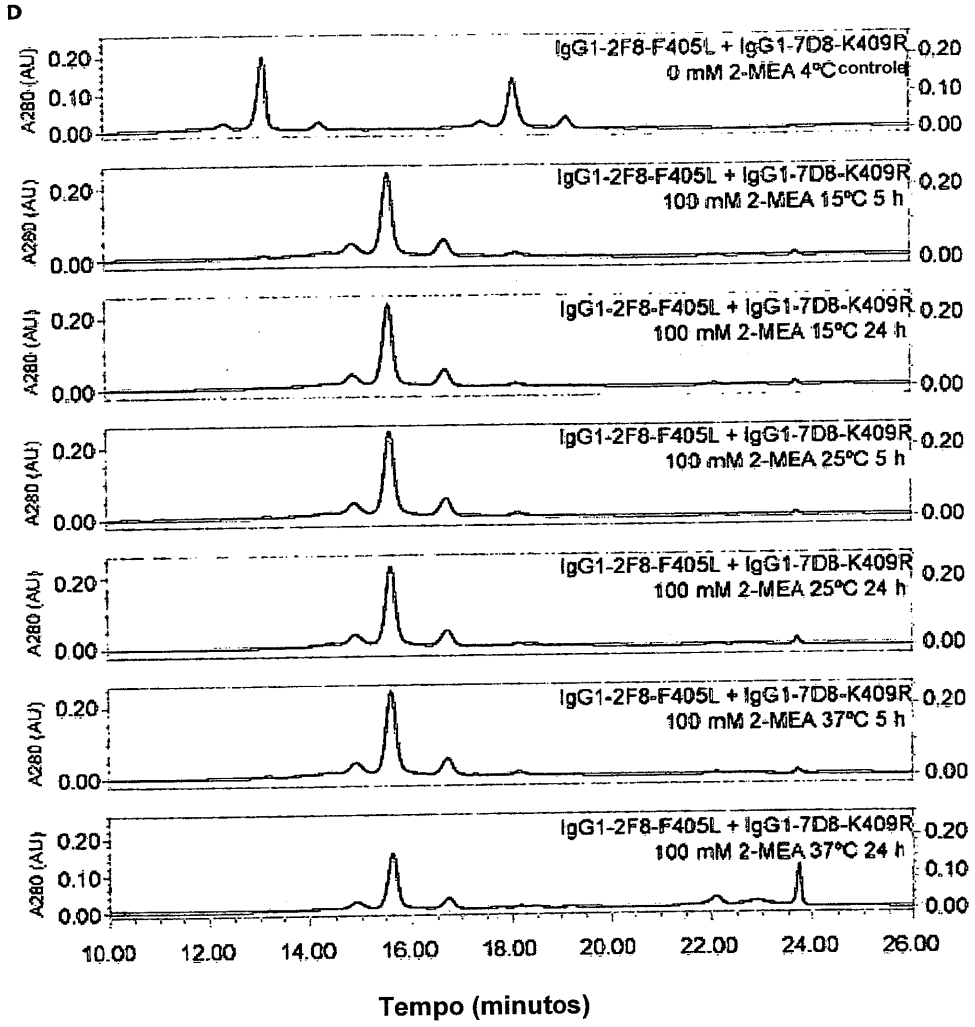
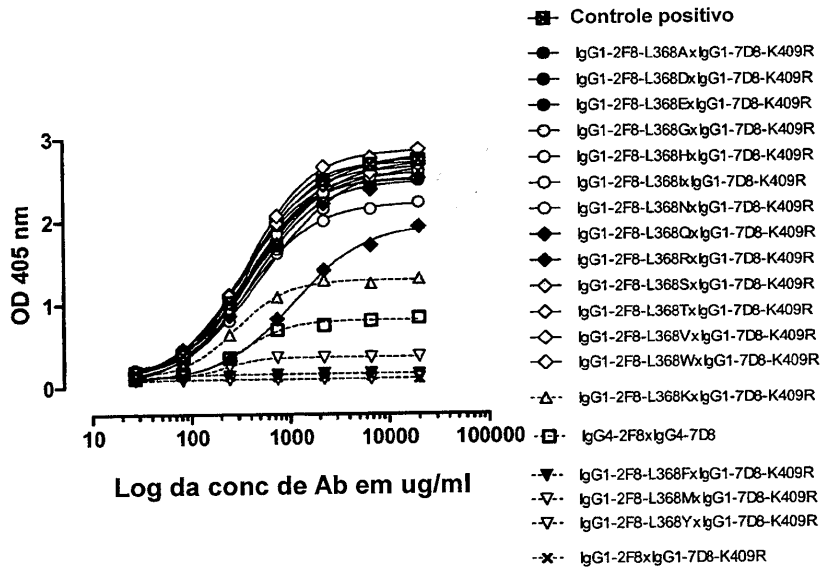

D
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
0 mM 2-MEA 4ºC controle
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
100 mM 2-MEA 15ºC 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
100 mM 2-MEA 15ºC 24 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
100 mM 2-MEA 25ºC 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
100 mM 2-MEA 25ºC 24 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
100 mM 2-MEA 37ºC 5 h
IgG1-2F8-F405L + IgG1-7D8-K409R
100 mM 2-MEA 37ºC 24 h
A280 (AU)
0.20
0.10
0.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
Tempo (minutos)

Figura 36

A


Controle positivo
IgG1-2F8-L368AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368KxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-L368FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368YxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
OD 405 nm
0
1
2
3
10
100
1000
10000
100000
Log da conc de Ab em ug/ml

B

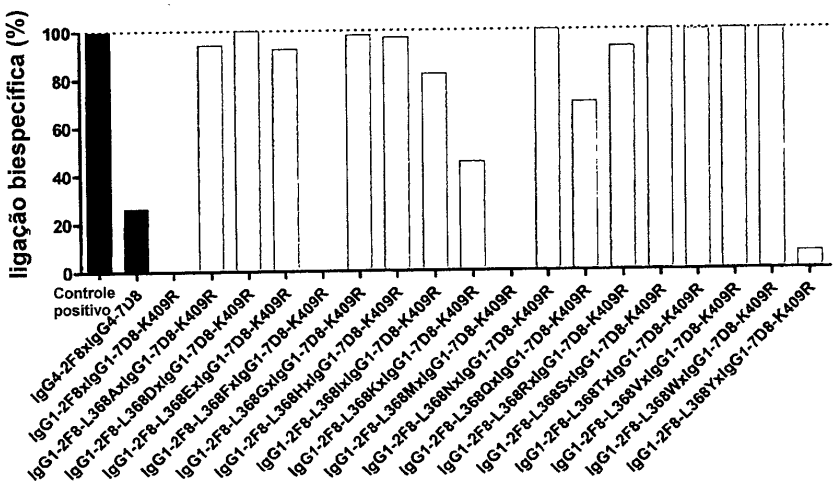
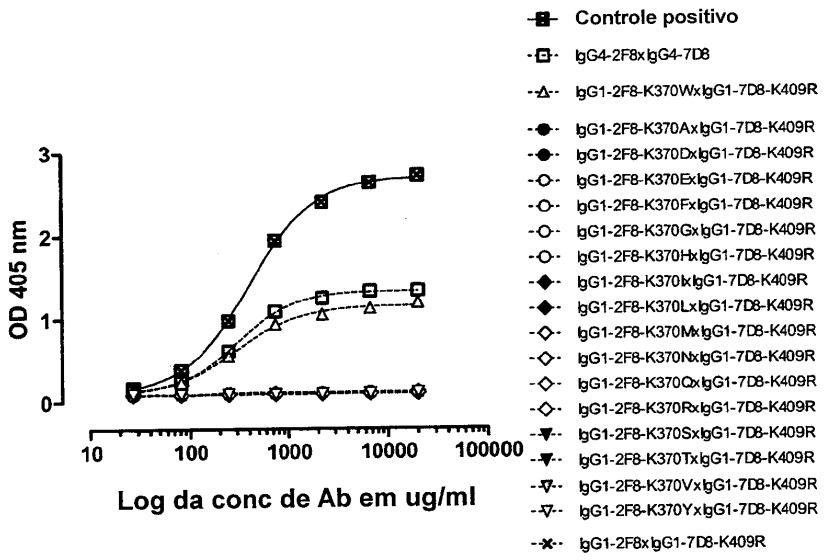

ligação biespecífica (%)
0
20
40
60
80
100
Controle positivo
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368YxIgG1-7D8-K409R

Figura 37

A


Controle positivo
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-K370WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370YxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
OD 405 nm
0
1
2
3
10
100
1000
10000
100000
Log da conc de Ab em ug/ml

B

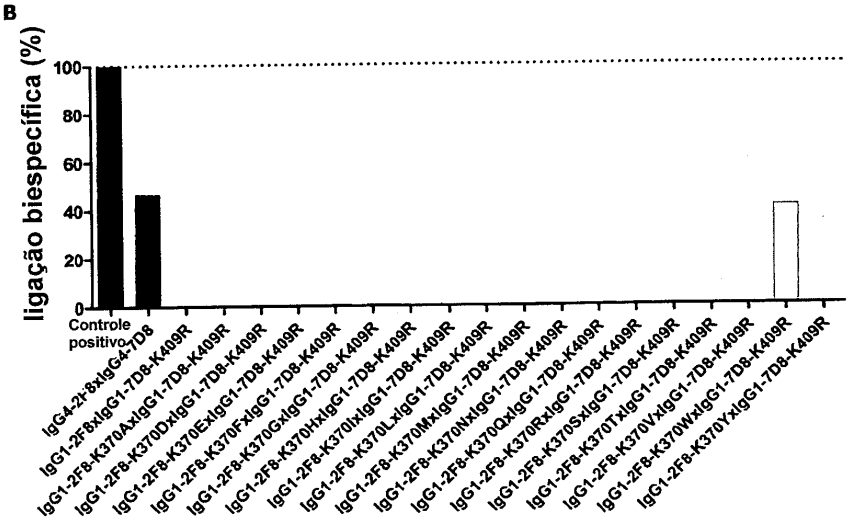
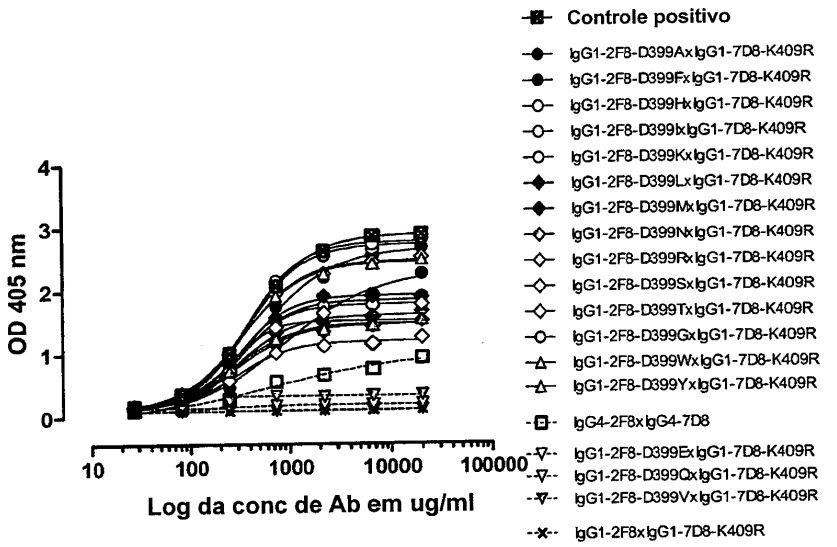

ligação biespecífica (%)
0
20
40
60
80
100
Controle positivo
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370YxIgG1-7D8-K409R

Figura 38

A


Controle positivo
IgG1-2F8-D399AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399YxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-D399ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
OD 405 nm
0
1
2
3
4
10
100
1000
10000
100000
Log da conc de Ab em ug/ml

B

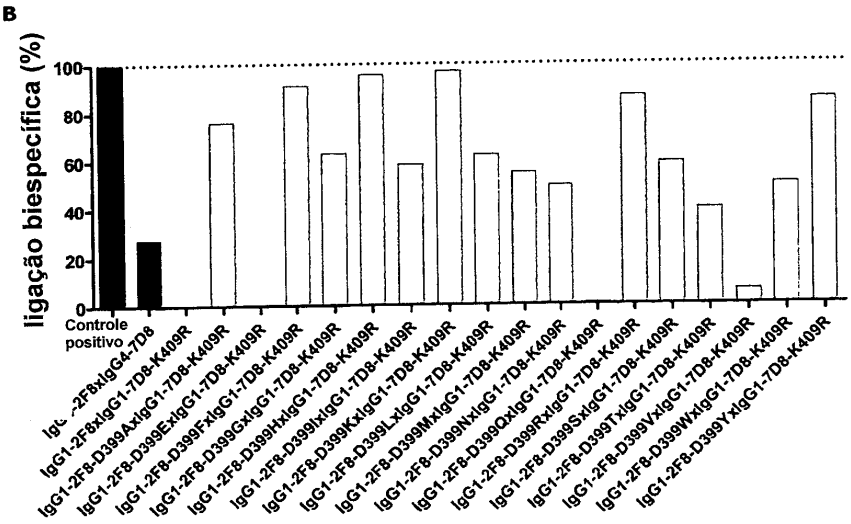

ligação biespecífica (%)
0
20
40
60
80
100
Controle positivo
IgG1-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399YxIgG1-7D8-K409R

Figura 39

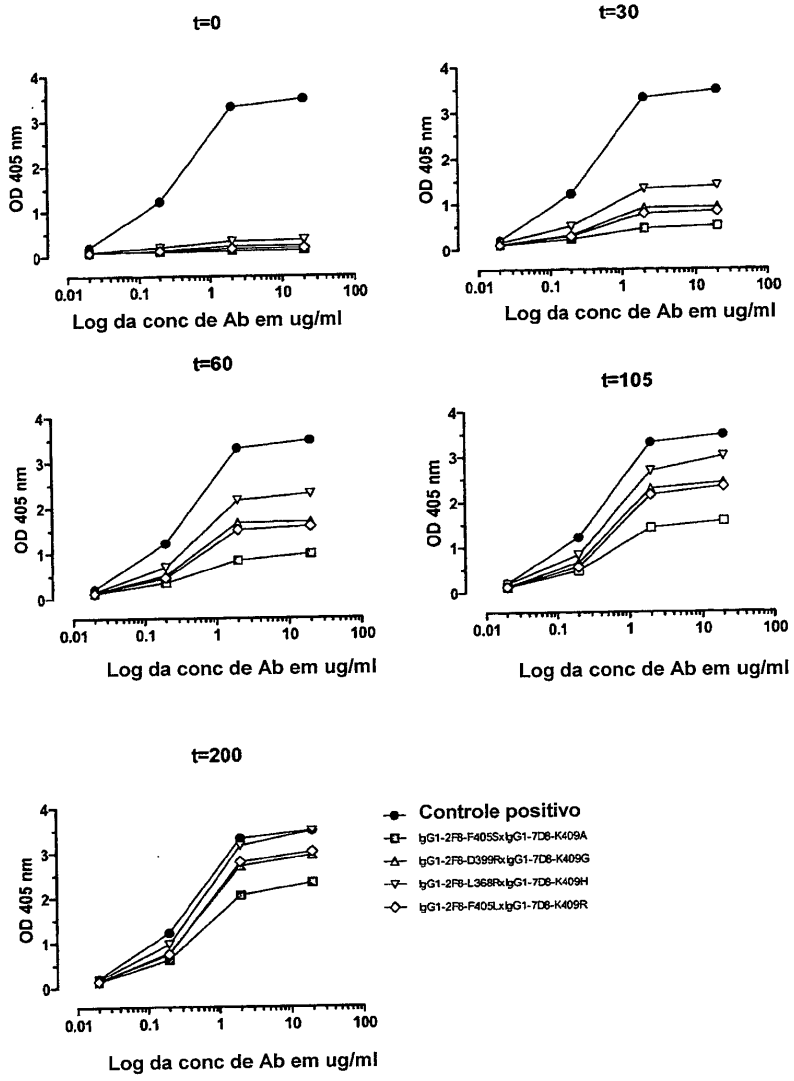

t=0
t=30
t=60
t=105
t=200
OD 405 nm
Log da conc de Ab em ug/ml
0.01
0.1
1
10
100
Controle positivo
IgG1-2F8-F405SxIgG1-7D8-K409A
IgG1-2F8-D399RxIgG1-7D8-K409G
IgG1-2F8-L368RxIgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-F405LxIgG1-7D8-K409R

Figura 40

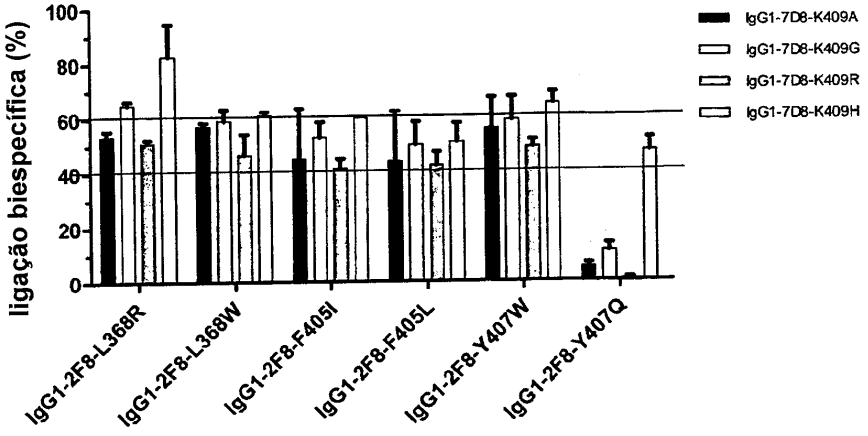

ligação biespecífica (%)
100
80
60
40
20
0
IgG1-7D8-K409A
IgG1-7D8-K409G
IgG1-7D8-K409R
IgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-L368R
IgG1-2F8-L368W
IgG1-2F8-F405I
IgG1-2F8-F405L
IgG1-2F8-Y407W
IgG1-2F8-Y407Q

Figura 41

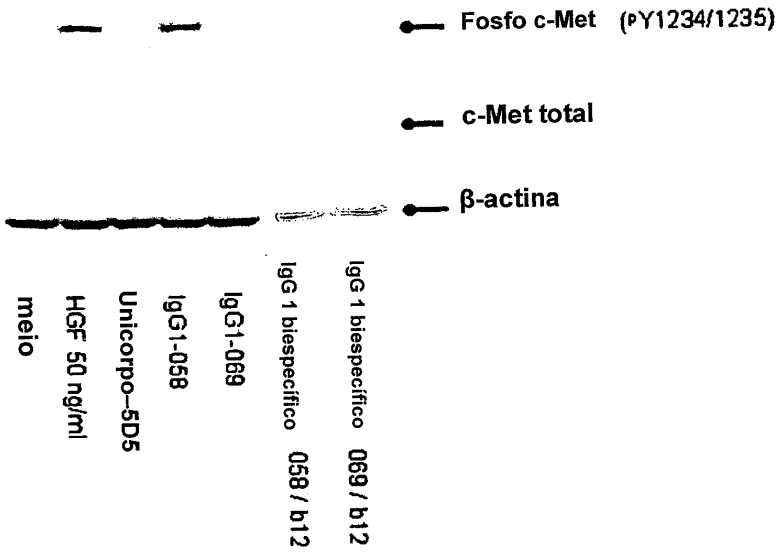

Fosfo c-Met (pY1234/1235)
c-Met total
β-actina
IgG 1 biespecífico 069 / b12
IgG 1 biespecífico 058 / b12
IgG1-069
IgG1-058
Unicorpo–5D5
HGF 50 ng/ml
meio

Figura 42

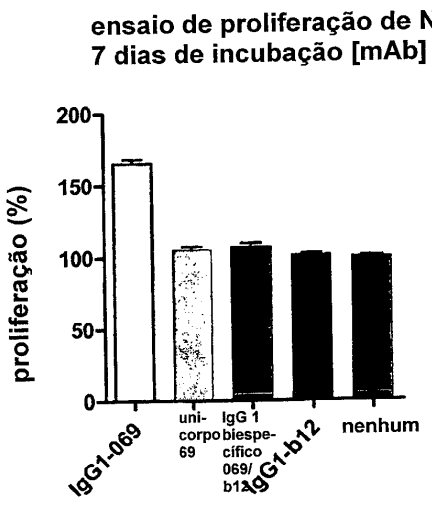
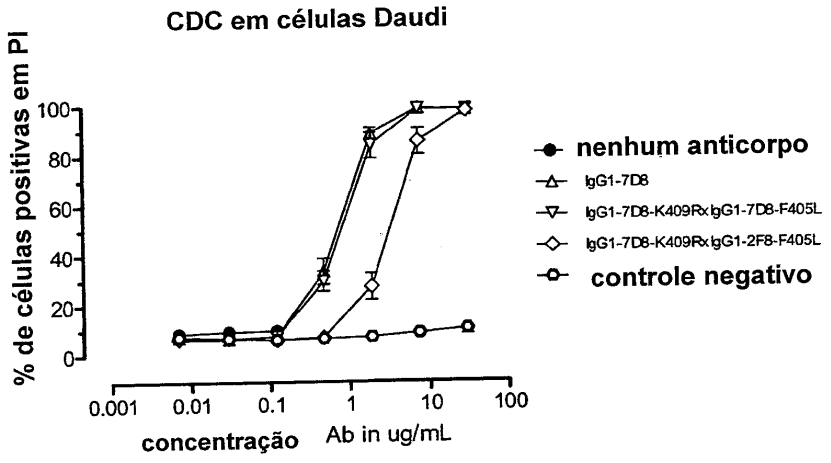

ensaio de proliferação de NCI-H441
7 dias de incubação [mAb] 10 µg/ml
proliferação (%)
200
150
100
50
0
IgG1-069
uni-corpo 69
IgG 1 biespe-cífico 069/ b12
IgG1-b12
nenhum

Figura 43

A


CDC em células Daudi
% de células positivas em PI
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
concentração Ab in ug/mL
nenhum anticorpo
IgG1-7D8
IgG1-7D8-K409R x IgG1-7D8-F405L
IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L
controle negativo

B

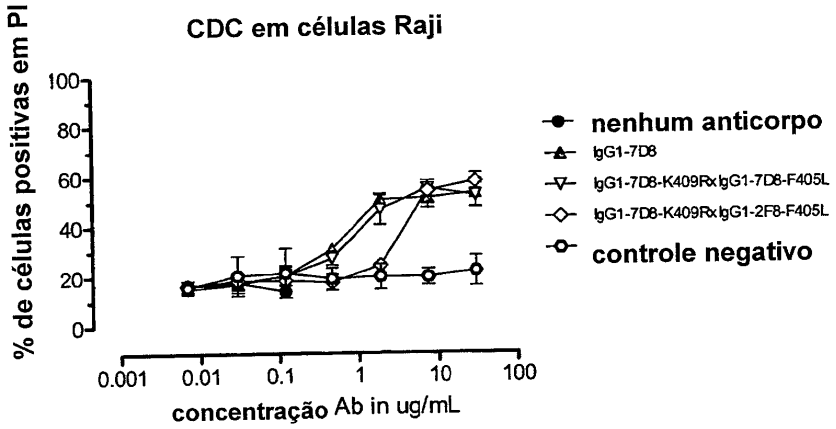

CDC em células Raji
% de células positivas em PI
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
concentração Ab in ug/mL
nenhum anticorpo
IgG1-7D8
IgG1-7D8-K409R x IgG1-7D8-F405L
IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L
controle negativo

Figura 44

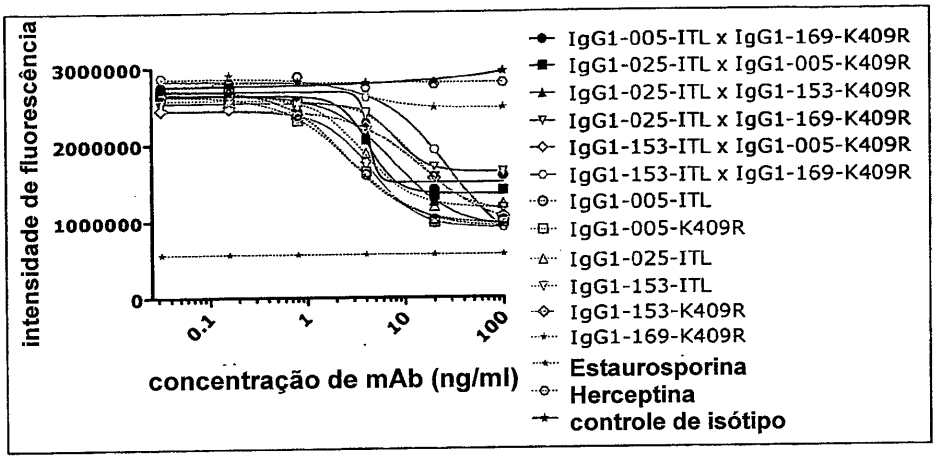

intensidade de fluorescência
3000000
2000000
1000000
0
0.1
1
10
100
concentração de mAb (ng/ml)
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-005-ITL
IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL
IgG1-153-ITL
IgG1-153-K409R
IgG1-169-K409R
Estaurosporina
Herceptina
controle de isótipo

Figura 45

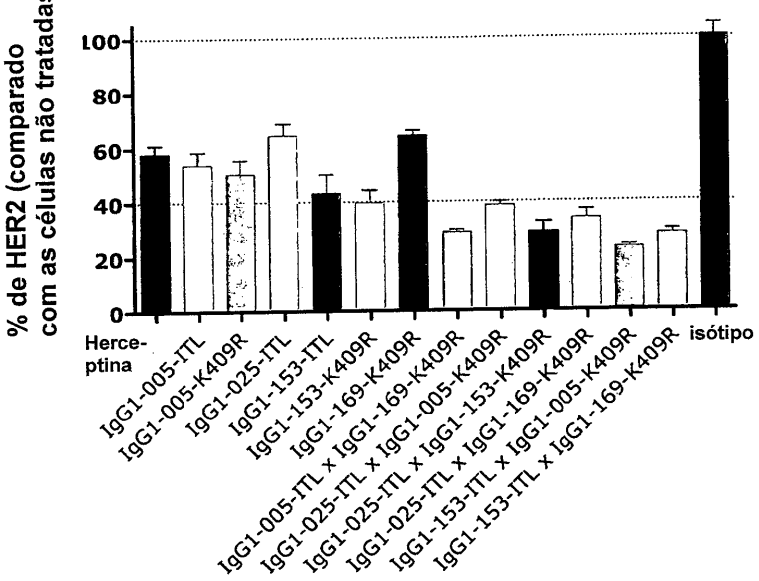
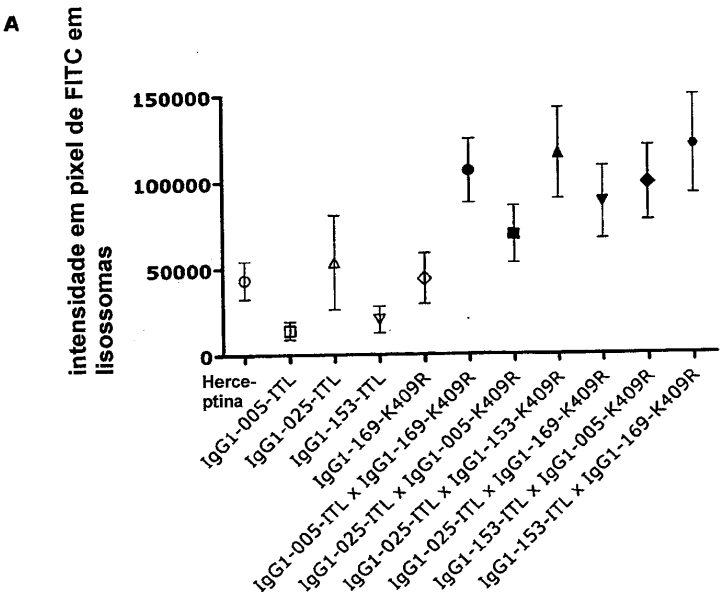

% de HER2 (comparado com as células não tratadas)
100
80
60
40
20
0
Herce-ptina
IgG1-005-ITL
IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL
IgG1-153-ITL
IgG1-153-K409R
IgG1-169-K409R
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R
isótipo

Figura 46


A
intensidade em pixel de FITC em lisossomas
150000
100000
50000
0
Herce-ptina
IgG1-005-ITL
IgG1-025-ITL
IgG1-153-ITL
IgG1-169-K409R
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R

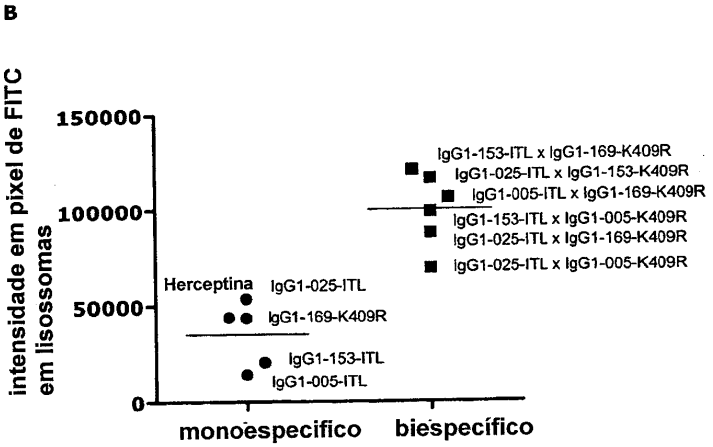

B
intensidade em pixel de FITC em lisossomas
150000
100000
50000
0
Herceptina
IgG1-025-ITL
IgG1-169-K409R
IgG1-153-ITL
IgG1-005-ITL
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
monoespecifico
biespecífico

Figura 47

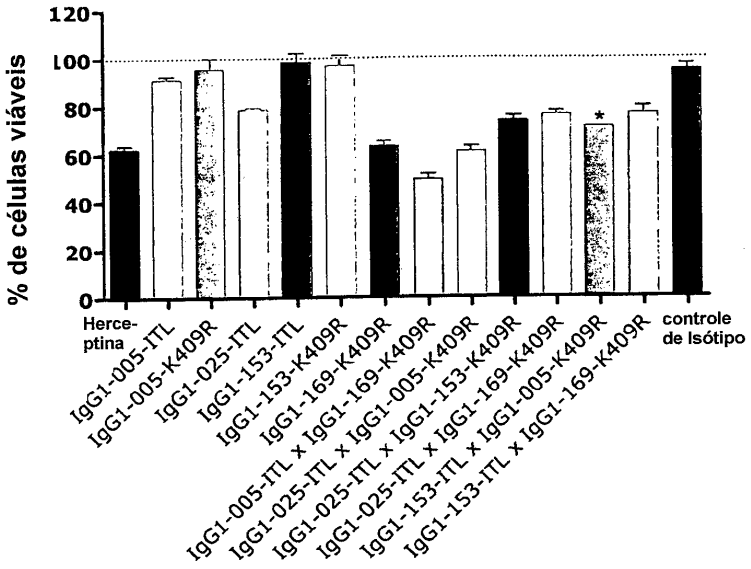

% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
*
Herce-
ptina
IgG1-005-ITL
IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL
IgG1-153-ITL
IgG1-153-K409R
IgG1-169-K409R
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R
controle
de Isótipo

Figura 48

A

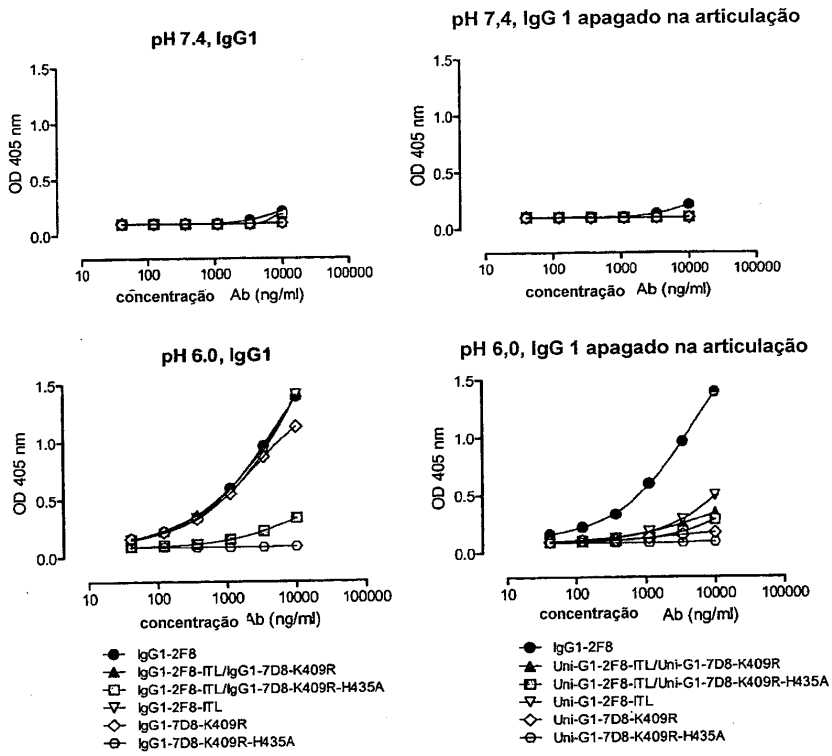

pH 7.4, IgG1
pH 7,4, IgG 1 apagado na articulação
pH 6.0, IgG1
pH 6,0, IgG 1 apagado na articulação
OD 405 nm
1.5
1.0
0.5
0.0
10
100
1000
10000
100000
concentração Ab (ng/ml)
IgG1-2F8
IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R-H435A
IgG1-2F8-ITL
IgG1-7D8-K409R
IgG1-7D8-K409R-H435A
Uni-G1-2F8-ITL/Uni-G1-7D8-K409R
Uni-G1-2F8-ITL/Uni-G1-7D8-K409R-H435A
Uni-G1-2F8-ITL
Uni-G1-7D8-K409R
Uni-G1-7D8-K409R-H435A

Figura 48 cont.

B

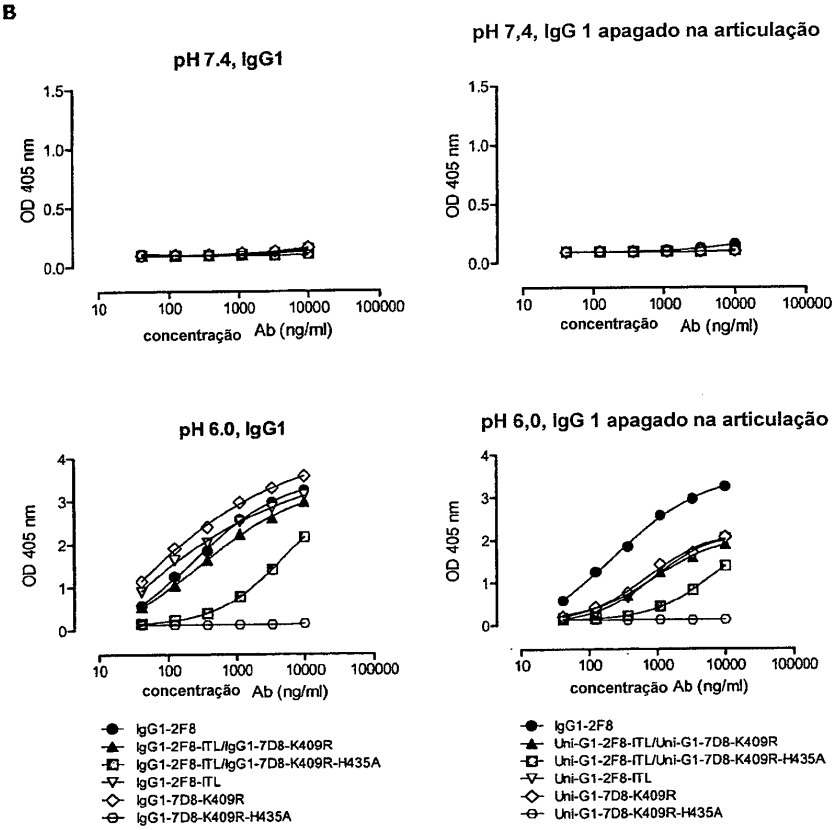
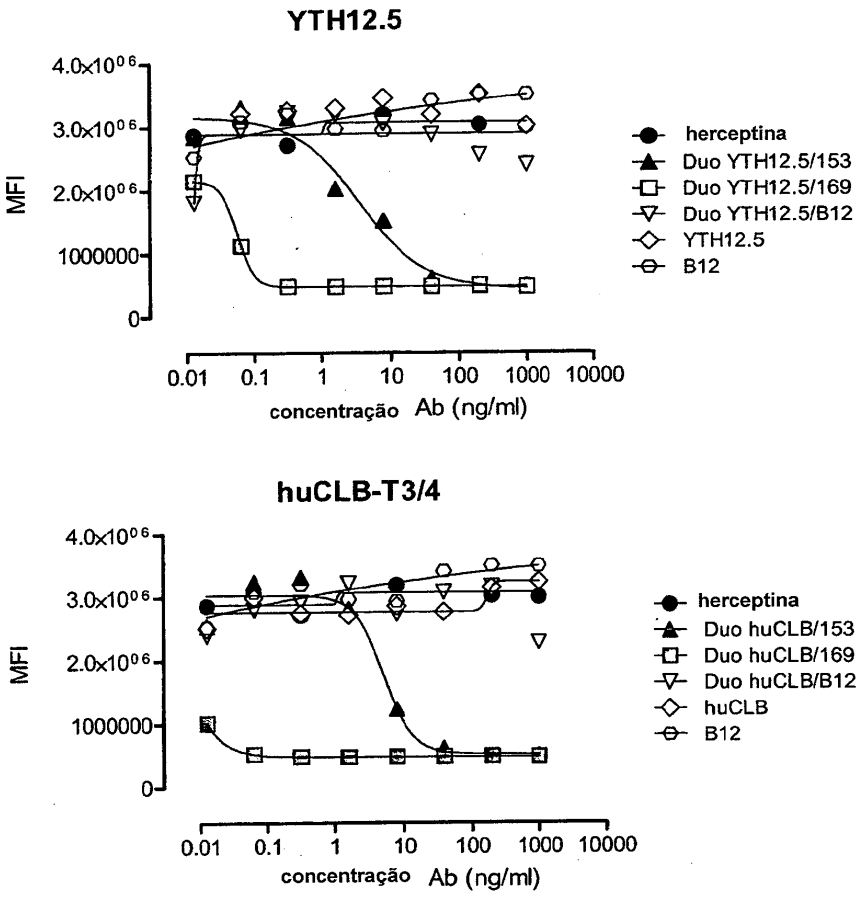


Figura 49


YTH12.5
4.0x10^06
3.0x10^06
2.0x10^06
1000000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentração Ab (ng/ml)
herceptina
Duo YTH12.5/153
Duo YTH12.5/169
Duo YTH12.5/B12
YTH12.5
B12
huCLB-T3/4
4.0x10^06
3.0x10^06
2.0x10^06
1000000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentração Ab (ng/ml)
herceptina
Duo huCLB/153
Duo huCLB/169
Duo huCLB/B12
huCLB
B12

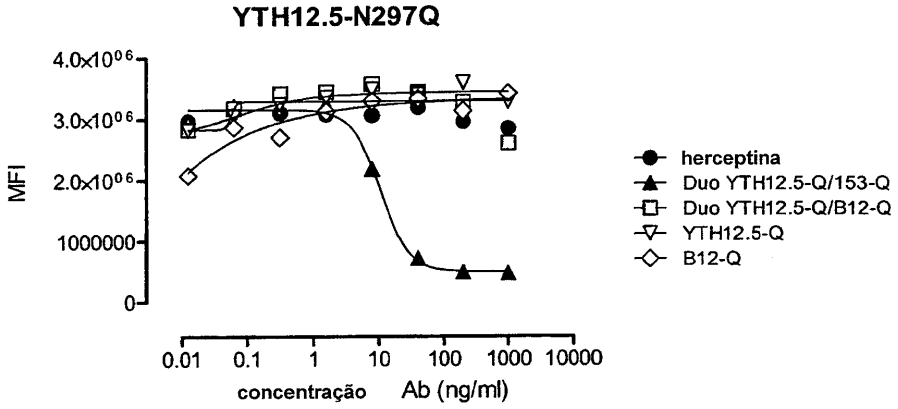
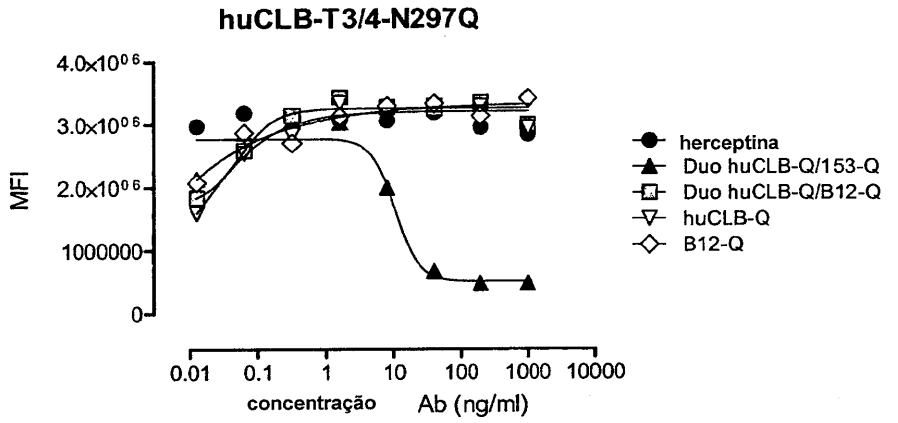



Figura 49 cont.