



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

(21) BR 112021010457-7 A2



(22) Data do Depósito: 18/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 24/08/2021

(54) Título: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI CD28 E USOS DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/30; C07K 16/28; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 08/03/2019 US 62/815,861; 19/12/2018 US 62/782,142.

(71) Depositante(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

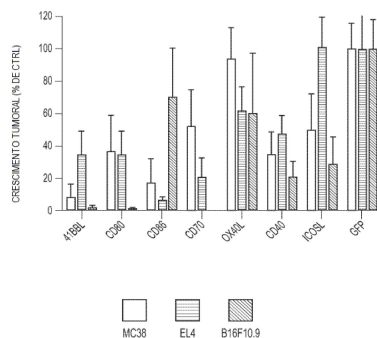
(72) Inventor(es): ANDREW J. MURPHY; DIMITRIS SKOKOS; JANELLE WAITE; ERICA ULLMAN; AYNUR HERMANN; ERIC SMITH; LAURIC HABER; GEORGE D. YANCOPOULOS; ALISON CRAWFORD.

(86) Pedido PCT: PCT US2019067109 de 18/12/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/132024 de 25/06/2020

(85) Data da Fase Nacional: 28/05/2021

(57) Resumo: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI-CD28 E USOS DOS MESMOS. A presente invenção fornece moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que compreendem um primeiro domínio de ligação ao antígeno se que liga especificamente a CD28 humano e uma segunda molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 humano. Em certas modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção têm capacidade de inibir o crescimento de tumores que expressam MUC16, como tumores de ovário. As moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da invenção são úteis para o tratamento de doenças e distúrbios nos quais uma resposta imunológica alvo induzida ou de regulação crescente é desejada e/ou terapeuticamente benéfica.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**ANTI-CORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI-CD28 E USOS DOS MESMOS**”.

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido está relacionado a e reivindica prioridade do Pedido Provisório nº US 62/782.142, depositado em 19 de dezembro de 2018, e do Pedido Provisório nº US 62/815.861, depositado em 8 de março de 2019. Todo o conteúdo dos pedidos anteriores é expressamente incorporado ao presente documento a título de referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi enviada eletronicamente em formato ASCII e é incorporada a título de referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 18 de dezembro de 2019, está nomeada como 10493WO01_118003_49320_SeqLst.txt e tem 38372 bytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção se refere às moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que se ligam a CD28 e a uma molécula alvo, como MUC16, e aos métodos de uso das mesmas.

ANTECEDENTES

[0004] CD28 é uma proteína transmembranar do tipo I, que tem um único domínio extracelular semelhante a Ig-V montado como um homodímero e que é expressa na superfície das células T. CD28 é o receptor para as proteínas CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) e é ativado por CD80 ou CD86 expressado em células apresentadoras de antígeno (APCs). A ligação de CD28 a CD80 ou CD86 fornece sinais coestimuladores importantes para a ativação e sobrevivência de células T. A estimulação de células T por meio de CD28 além do receptor de células T (TCR) fornece um sinal potente para a produção de várias interleucinas. O

CD28 também potencializa os sinais celulares, como as vias controladas pelo fator de transcrição NFκB após a ativação do TCR. O co-sinal de CD28 é importante para a ativação eficaz de células T, como diferenciação, proliferação, liberação de citocinas e morte celular.

[0005] Os anticorpos anti-CD28 têm sido propostos para fins terapêuticos envolvendo a ativação de células T. Um anticorpo anti-CD28 particular, TGN1412 (superagonista anti-CD28), foi usado em um ensaio clínico em 2006. Seis voluntários saudáveis receberam uma dose intravenosa de TGN1412 (superagonista anti-CD28) na dose de 0,1 mg/kg. Em duas horas, todos os seis pacientes apresentaram respostas inflamatórias significativas (tempestade de citocinas), e todos os pacientes apresentavam falência de múltiplos órgãos em dezesseis horas. Os indivíduos foram tratados com corticosteroides e os níveis de citocinas voltaram aos níveis normais em 2 a 3 dias. Uma dose inicial de 0,1 mg/kg em um estudo de Fase 1 foi baseada em um múltiplo de 500 vezes do nível de efeito adverso não observado ("NOAEL") de 50 mg/kg em macacos cynomolgus (Suntharalingam, *et al.*, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, *NEJM* 355: 1018 a 1028 (2006)). Infelizmente, a tempestade de citocinas induzida por TGN1412 não foi prevista por estudos de toxicologia em macacos cynomolgus ou em estudos de PBMC humana *ex vivo*.

[0006] A mucina 16 (MUC16), também conhecida como antígeno de câncer 125, antígeno de carcinoma 125, antígeno de carboidrato 125 ou CA-125, é uma glicoproteína de membrana integral altamente glicosilada. A MUC16 consiste em três domínios principais: um domínio terminal N extracelular, um grande domínio de repetição em tandem intercalado com espermatozoides de ouriço-do-mar, enterocinase e domínios agrin (SEA) e um domínio carboxila terminal que compreende um segmento da região transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. A

clivagem proteolítica resulta na derramamento de grande parte da porção extracelular de MUC16 na corrente sanguínea. A MUC16 é superexpressa em cânceres incluindo câncer de ovário, câncer de mama, câncer de pâncreas, câncer de pulmão de células não pequenas, colangiocarcinoma intra-hepático com formação de massa, adenocarcinoma do colo uterino e adenocarcinoma do trato gástrico e em doenças e afecções incluindo doença intestinal inflamatória, cirrose hepática, insuficiência cardíaca, infecção peritoneal e cirurgia abdominal. (Haridas, D. *et al.*, 2014, FASEB J., 28:4183-4199). Foi demonstrado que a expressão de MUC16 em células cancerosas protege as células cancerosas do sistema imunológico. (Felder, M. *et al.*, 2014, Molecular Cancer, 13: 129).

[0007] Foram investigados modos para o tratamento de câncer do ovário utilizando anticorpos para MUC16. No entanto, os anticorpos monoclonais, oregovomabe e abgovomabe, tiveram sucesso limitado. (Felder, supra, Das, S. e Batra, SK 2015, Cancer Res. 75: 4660-4674.) Por conseguinte, existe uma necessidade na técnica de anticorpos MUC16 melhorados para o tratamento do câncer.

[0008] Adicionalmente, moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que se ligam a CD28 e a um antígeno alvo, como MUC16, seriam úteis em configurações terapêuticas em que o alvejamento específico e é desejada a exterminação mediada por células T de células que expressam o antígeno alvo.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que se liga ao CD28 e MUC16, também referidas no presente documento como “moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16”. A porção anti-MUC16 da molécula biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 é útil para o alvejamento de células

de tumor que expressam MUC16 (por exemplo, células de tumor ovarianas), e a porção anti-CD28 da molécula biespecífica é útil para ativar células T. A ligação simultânea de MUC16 em uma célula de tumor e CD28 em uma célula T facilita o extermínio direcionado (lise celular) da célula de tumor alvejada pela célula T ativada. As moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 da invenção são, portanto úteis, entre outros, para tratar doenças e distúrbios relacionados a ou causados por tumores de expressão de MUC16 (por exemplo, câncer de ovário).

[0010] As moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas de acordo com esse aspecto da presente invenção compreendem um primeiro domínio de ligação ao antígeno que liga especificamente CD28 humano, e um segundo domínio de ligação ao antígeno que liga especificamente MUC16. A presente invenção inclui moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 (por exemplo, anticorpos biespecíficos) em que cada domínio de ligação ao antígeno compreende uma região variável de cadeia pesada (HCVR) emparelhada com uma região variável de cadeia leve (LCVR). Em certas modalidades exemplificativas da invenção, o domínio de ligação ao antígeno anti-CD28 e o domínio de ligação ao antígeno anti-MUC16 compreendem, cada um, diferentes HCVRs distintas emparelhadas com uma LCVR comum.

[0011] A presente invenção fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 compreende qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR, como apresentado na **Tabela 3**. O primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 também pode compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCVR, como apresentado na **Tabela 3**. De acordo com certas modalidades, o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 compreende qualquer uma dentre os pares de sequência de aminoácidos de HCVR/LCVR,

como apresentado na **Tabela 3**. A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 compreende qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de CDR1-CDR2-CDR3 de cadeia pesada, como apresentado na **Tabela 3**, e/ou qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de CDR1-CDR2-CDR3 de cadeia leve, como apresentado na **Tabela 3**.

[0012] De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 compreende uma região variável de cadeia pesada (HCVR) que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 18 e 42 ou uma sequência substancialmente similar da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0013] A presente invenção fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 compreende uma região variável de cadeia pesada (LCVR) que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 10 e 34 ou uma sequência substancialmente similar da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0014] A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 compreende um par de sequências de aminoácidos de HCVR e LCVR (HCVR/LCVR) selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18/10 e 42/34.

[0015] A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao

antígeno que se liga especificamente a CD28 compreende um domínio de CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24 e 48, ou uma sequência substancialmente similar à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; e um domínio de CDR3 de cadeia leve (LCDR3) que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16 e 40, ou a sequência substancialmente similar da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0016] Em certas modalidades, o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 compreende um par de sequências de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24/16 e 48/40.

[0017] A presente invenção também fornece moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 compreende um domínio CDR1 (HCDR1) de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20 e 44, ou uma sequência substancialmente semelhante à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; um domínio CDR2 (HCDR2) de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22 e 46, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; um domínio CDR1 (LCDR1) de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12 e 36, ou uma sequência subs-

tancialmente semelhante à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; e um domínio CDR2 (LCDR2) de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38, ou uma sequência substancialmente semelhante à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0018] Certas moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 exemplificativas não limitantes da invenção incluem um primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 que compreende domínios de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que têm a sequência de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NOs: 20-22-24-12-14-16 e 44-46-48-36-38-40.

[0019] A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende uma região variável de cadeia pesada (HCVR) que tem a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 e 26, ou uma sequência substancialmente similar da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0020] A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende uma região variável de cadeia leve (LCVR) que tem a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10 e 34, ou uma sequência substancialmente similar da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0021] A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende um par de sequências de aminoácidos de HCVR e LCVR (HCVR/LCVR) selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10 e 26/34.

[0022] A presente invenção também fornece moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende um domínio de CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) que tem a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em 8 e 32, ou uma sequência substancialmente similar à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; e um domínio de CDR3 de cadeia leve (LCDR3) que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16 e 40, ou uma sequência substancialmente similar da mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0023] Em certas modalidades, o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende um par de sequências de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8/16 e 32/40.

[0024] A presente invenção também fornece moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende um domínio de CDR1 (HCDR1) de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4 e 28, ou uma sequência substancialmente semelhante à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; um domínio

de CDR2 (HCDR2) de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6 e 30, ou uma sequência substancialmente semelhante à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; um domínio de CDR1 (LCDR1) de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12 e 36, ou uma sequência substancialmente semelhante à mesma que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência; e um domínio de CDR2 de cadeia leve (LCDR2) que tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38, ou uma sequência substancialmente semelhante à mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0025] Certas moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 exemplificativas não limitantes da invenção incluem um segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente à MUC16 que compreende domínios de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que têm as sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16 e 28-30-32-36-38-40.

[0026] Em uma modalidade relacionada, a invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 compreende os domínios de CDR de cadeia pesada e leve contidos dentro de sequências de região variável de cadeia pesada e leve (HCVR/LCVR) selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2/10 e 26/34.

[0027] Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de

HCVR, LCVR ou CDR das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 divulgadas no presente documento, incluindo as moléculas de ácido nucleico que compreendem as sequências de polinucleotídeos, como apresentado na **Tabela 2** e/ou na **Tabela 4** no presente documento, bem como moléculas de ácido nucleico que compreendem duas ou mais das sequências de polinucleotídeos como, apresentado na **Tabela 2** e/ou **Tabela 4** em qualquer combinação funcional ou disposição das mesmas. Os vetores de expressão recombinante que portam os ácidos nucleicos da invenção, e células hospedeiras nas quais tais vetores foram introduzidos, também são englobados pela invenção, como os métodos para produzir os anticorpos cultivando-se as células hospedeiras sob condições que permitem a produção dos anticorpos, e recuperando-se os anticorpos produzidos.

[0028] A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, em que qualquer um dentre os domínios de ligação ao antígeno supracitados que se ligam especificamente a CD28 é combinado, conectado ou, de outro modo, associado a qualquer um dentre os domínios de ligação ao antígeno supracitados que se ligam especificamente a MUC16 para formar uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica que se liga a CD28 e a MUC16.

[0029] A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que têm um padrão de glicosilação modificado. Em algumas aplicações, a modificação para remover os sítios de glicosilação indesejáveis pode ser útil, ou um anticorpo desprovido de uma porção química de fucose presente na cadeia de oligossacarídeos, por exemplo, para aumentar a função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (consulte Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Em outras aplicações, uma modificação de glicosilação pode ser produzida a fim de modificar a citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

[0030] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16, como divulgado no presente documento, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em um aspecto relacionado, a invenção apresenta uma composição que é uma combinação de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 e um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo agente terapêutico é qualquer agente que é vantajosamente combinado com uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16. Os agentes exemplificativos que podem ser vantajosamente combinados com uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 são discutidos em detalhes em outro local no presente documento.

[0031] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para alvejamento/exterminio de células de tumor que expressam MUC16 com o uso de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 da invenção, em que os métodos terapêuticos compreendem administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 da invenção para um indivíduo que precisa da mesma.

[0032] A presente invenção também inclui o uso de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio relacionado a ou causado por expressão de MUC16.

[0033] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para alvejar/exterminar células tumorais que expressam MUC16 com o uso de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 da invenção, em que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 é combinada com outras

moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas antitumorais que se ligam a CD3 (por exemplo, anti-CD28/anti-MUC16 combinado com anticorpos anti-CD3/anti-MUC16).

[0034] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para alvejar/exterminar células tumorais que expressam MUC16 com o uso de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 da invenção, em que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 é combinada com um direcionamento de inibidor de via de sinalização PD-1, PD-L1 ou CTLA-4 (por exemplo, anti-CD28/anti-MUC16 combinado com anticorpos anti-PD-1). Em certas modalidades, prevê-se que os anticorpos anti-CD28/anti-MUC16 da invenção podem ser combinados com agentes que visam PD-1, como Pembrolizumab (Keytruda®), Nivolumab (Opdivo®) ou Cemiplimabe (Libtayo®). Em certas modalidades, prevê-se que os anticorpos anti-CD28/anti-MUC16 da invenção podem ser combinados com agentes que têm como alvo PD-L1, como Atezolizumab (Tecentriq®), Avelumab (Bavencio®) ou Durvalumab (Imfinzi®). Em certas modalidades, prevê-se que os anticorpos anti-CD28/anti-MUC16 da invenção podem ser combinados com agentes que têm como alvo CTLA-4, como Ipilimumab (Yervoy®).

[0035] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para alvejar/exterminar células tumorais que expressam MUC16 com o uso de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 da invenção, em que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 é combinada com outras moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas antitumorais que se ligam a CD3 (por exemplo, anti-CD28/anti-MUC16 combinado com anticorpos biespecíficos anti-CD3/anti-MUC16) e um inibidor de via de sinalização que tem como alvo a PD-1, PDL-1 ou CTLA-4 (por exemplo, anti-CD28/anti-MUC16 combinado com anticorpos anti-PD-1).

[0036] Outras modalidades irão se tornar evidentes a partir de uma revisão da descrição detalhada a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0037] A **Figura 1** é um gráfico que mostra a inibição do crescimento tumoral em linhagens celulares modificadas com a introdução da expressão de ligante coestimulador. Três linhagens celulares tumorais, B16F10.9, EL4 e MC38 foram geneticamente modificadas para expressar um ligante coestimulador, ou GFP, ou um vetor vazio como controle. Células tumorais manipuladas foram injetadas em camundongos C57BL/6. Os dados representam a média \pm SEM. Os dados são representativos de pelo menos uma experiência com cinco (5) camundongos por grupo. O gráfico mostra o crescimento do tumor como a porcentagem de controle calculada como

$$\frac{\text{Volume do tumor}}{\text{Volume de controle do tumor}} \times 100$$

[0038] As **Figuras 2A a 2I** são esquemáticas e gráficos que mostram que o anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção potencializa a ação das células T na presença de estimulação de TCR por anti-MUC16xCD3 e linhas de células cancerosas com MUC16 endógeno (PEO1). As **Figuras 2B a 2E** são gráficos que mostram os dados para PBMC humana. As **Figuras 2F a 2H** são gráficos que mostram os dados para PBMC de macaco cynomolgus. Células T humanas (para as **Figuras 2B a 2E**) ou células T de cynomolgus (para as **Figuras 2F a 2H**) foram cultivadas com células alvo de câncer com expressão de MUC16 endógena (linha de câncer de ovário PEO-1) e os anticorpos biespecíficos indicados por 96 horas.

[0039] A **Figura 2A** é um esquema da configuração do ensaio.

[0040] A **Figura 2B** é um gráfico que mostra o extermínio de células

tumorais. O valor no eixo geométrico Y se refere à porcentagem de célula PEO1 viável.

[0041] A **Figura 2C** é um gráfico que mostra a liberação de IFN γ .

[0042] A **Figura 2D** é um gráfico que mostra contagens de células T CD4 e frequência de células CD25⁺, representadas como porcentagem de células CD25⁺ em células T CD4.

[0043] A **Figura 2E** é um gráfico que mostra contagens de células T CD8 e frequência de células CD25⁺, representadas como porcentagem de células CD25⁺ em células T CD8.

[0044] A **Figura 2F** é um gráfico que mostra o extermínio de células tumorais. O valor no eixo geométrico Y se refere à porcentagem de célula PEO1 viável.

[0045] A **Figura 2G** é um gráfico que mostra contagens de células T CD4 e frequência de células CD25⁺, representadas como porcentagem de células CD25⁺ em células T CD4.

[0046] A **Figura 2H** é um gráfico que mostra contagens de células T CD4 e contagens de células T CD8 e frequência de células CD25⁺, representadas como porcentagem de células CD25⁺ em células T CD4 e células T CD8.

[0047] A **Figura 2I** fornece um gráfico que mostra a ligação do anticorpo a alvos celulares medidos por citometria de fluxo.

[0048] As **Figuras 3A a 3C** são gráficos que mostram que os anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da presente invenção aumentam a imunidade antitumoral por ativação de células T induzida por anti-MUC16xCD3.

[0049] A **Figura 3A** é um gráfico que mostra a carga tumoral medida pela radiância média (Radiância média [p/s/cm²/sr] ao longo do tempo. Os valores representam a mediana do grupo mais o intervalo. Os valores de P foram calculados com o teste de Mann Whitney para cada ponto de tempo. *, p <0,05 ou **, p <0,01 para comparação de

MUC16xCD3 e EGFRvIIIxCD3. ##, $p < 0,01$ para comparação de MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e EGFRvIIIxCD3. Camundongos NSG enxertados com PBMC humana foram implantados com OVCAR3-Luc por injeção intraperitoneal. Os camundongos foram dosados com IV nos dias 5 e 8 (flechas). Os camundongos receberam 2,5 μg de MUC16xCD3 ou 2,5 μg de EGFRvIIIxCD3. Alguns dos camundongos também receberam MUC16xCD28 a 100 μg . O fardo de tumor foi avaliado por BLI nos Dias 4, 8, 12, 15, 20 e 25 após a implantação de tumor monitorando-se bioluminescência ao longo do tempo. N = 5 camundongos por grupo

[0050] **A Figura 3B** fornece gráficos que mostram os níveis de citocinas no soro do sangue obtidos nas 4 horas após a primeira dose das mesmas experiências mostradas na **Figura 3A**. Os valores de P foram calculados com ANOVA de uma via. ##, $p < 0,01$ ou ####, $p < 0,0001$ para comparação de MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e EGFRvIIIxCD3. @@@, $p < 0,005$ para comparação MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e MUC16xCD3. ^, $p < 0,01$, ^^^, $p < 0,005$, ^^^^ P $< 0,0001$ para comparação de MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e EGFRvIIIxCD3 + MUC16xCD28.

[0051] **A Figura 3C** fornece gráficos que mostram a carga tumoral e a correlação com os níveis de CA-125 no soro no dia 26. N = 5 camundongos por grupo das mesmas experiências mostradas na **Figura 3A**.

[0052] **A Figura 4A** é um gráfico que mostra a carga tumoral medida pela radiância média (Radiância média [$\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$] ao longo do tempo. Os valores representam a mediana do grupo mais o intervalo. Os valores de P foram calculados com o teste de Mann Whitney para cada ponto de tempo. **, $p < 0,01$ para comparação de MUC16xCD3 e EGFRvIIIxCD3. ##, $p < 0,01$ para comparação de MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e EGFRvIIIxCD3. @, $p < 0,05$ para comparação

MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e MUC16xCD3. Camundongos NSG enxertados com PBMC humana foram implantados com OVCAR3-Luc por injeção intraperitoneal. Camundongos foram tratados por IV com 0,5 mg/kg de MUC16xCD3 ou 0,5 mg/kg de EGFRvIIIxCD3. Alguns dos camundongos também receberam MUC16xCD28 a 0,2 mg/kg nos Dias 5 e 8 (flechas). O fardo de tumor foi avaliado por BLI nos Dias 4, 8, 11, 14, 21, 28 e 34 monitorando-se bioluminescência ao longo do tempo. N = 5 ou 6 camundongos por grupo.

[0053] A **Figura 4B** fornece gráficos que mostram os níveis de citocinas no soro do sangue obtidos nas 4 horas após a primeira dose das mesmas experiências mostradas na **Figura 4A**. Os valores de P foram calculados com ANOVA de uma via. *, p <0,05 para comparação MUC16xCD3 e EGFRvIIIxCD3 ##, p <0,01 ou ###, p <0,001 ou ####, p <0,0001 para MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e comparação EGFRvIIIxCD3. @, p <0,05 ou @@@@, p <0,0001 para comparação MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e MUC16xCD3. ^, p <0,001 ou ^^P <0,001 ou ^^P <0,0001 para comparação de MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e EGFRvIIIxCD3 + MUC16xCD28.

[0054] A **Figura 5** é um gráfico que mostra a sobrevivência ao longo do tempo. Células ID8-VEGF/hMUC16 foram implantadas na cavidade peritoneal de camundongos humanizados para hCD3/hCD28/hMUC16. Os camundongos foram tratados por via intravenosa com EGFRvIIIxCD3 ou MUC16xCD3 a 1 mg/kg ou dias 3, 6 e 10 após a implantação do tumor, conforme indicado pelas setas. Alguns camundongos também receberam MUC16xCD28 a 1 mg/kg. Os valores de P foram calculados com o teste de Mantel-Cox para cada ponto de tempo. **, p <0,01 para comparação de MUC16xCD3 e EGFRvIIIxCD3. ##, p <0,01 para comparação de MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e EGFRvIIIxCD3. @, p <0,05 para comparação MUC16xCD3 + MUC16xCD28 e MUC16xCD3.

[0055] A **Figura 6A** é um gráfico que mostra o volume do tumor ao longo do tempo. As células tumorais MC38/hMUC16 foram implantadas subcutaneamente em camundongos humanizados hCD3/hMUC16. Os camundongos foram tratados com anti-MUC16xCD3 a 0,01 mg/kg, anticorpo biespecífico anti-MUC16xmCD28 exemplificativo da invenção a 0,5 mg/kg como indicado duas vezes por semana começando no dia 0 (setas). O volume do tumor foi monitorado por medição do calibrador ao longo do tempo. Os valores mostrados são a média \pm SEM. Os dados são representativos de três (3) experimentos. N = 7 camundongos por grupo. Os valores P foram calculados com ANOVA de 2 vias com comparação com o controle de isótipo (**, $p < 0,01$ e ****, $P < 0,0001$ para MUC16xCD3+MUC16xmCD28 e comparação de controle de isótipo; #, $p < 0,05$ para MUC16xCD3 e comparação de controle de isótipo; \$, $p < 0,05$ para MUC16xmCD28 e comparação de controle de isótipo).

[0056] A **Figura 6B** fornece gráficos que mostram os níveis de citocinas no soro do sangue obtidos no ponto de tempo indicado a partir das mesmas experiências mostradas na **Figura 6A**.

[0057] As **Figuras 6C e 6D** são gráficos que mostram os níveis de citocinas. Os camundongos sangraram devido a citocinas séricas 4 horas após a dose no dia 7. A significância estatística foi calculada com ANOVA de 1 via em comparação com o isótipo ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$. n = 7 camundongos por grupo. Os dados são representativos de 3 experimentos.

[0058] A **Figura 7** é um gráfico que mostra que a ancoragem de um MUC16xCD28 a placas de ensaio usando o método de revestimento seco ou úmido não induz a ativação de células T na ausência de um estímulo CD3 em contraste com o superagonista CD28.

[0059] As **Figuras 8A a 8C** são gráficos que mostram que MUC16xCD28 sozinho ou em terapia de combinação não induz a ativação de células T sistêmicas. Os macacos *Cynomolgus* receberam uma

dose única de biespecíficos de 1 ou 10 mg/kg (indicado entre parênteses). Um grupo adicional recebeu um total de 4 doses indicadas como dosagem repetida. O sangue foi coletado nos tempos indicados após a dose (h). **Figura 8A**: Citocinas séricas, **Figura 8B**: Contagens relativas de células T e **Figura 8C**: Frequência de células T Ki67+ e ICOS+ (% de CD3) são mostradas. Os dados representam a média +/- SEM. N = 3 animais por grupo. Os valores de P foram calculados com ANOVA de 2 fatores em comparação com o controle de isótipo. (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ e ****, $p < 0,0001$).

[0060] As **Figuras 9A e 9B** mostram que os anticorpos biespecíficos MUCxCD28 e MUC16xCD3 podem se ligar a células que expressam MUC na presença de CA-125 solúvel. As células OVCAR-3 foram incubadas em 8 nM de anticorpos indicados marcados com Alexa647 na presença de concentrações crescentes de CA-125 solúvel (**Figura 9A**) ou MUC16 nub (**Figura 9B**) por 30 minutos a 4 °C em tampão de citometria de fluxo (PBS + FBS a 1%). Após a incubação, as células foram lavadas, novamente suspensas em tampão de citometria de fluxo e analisadas por citometria de fluxo.

[0061] A **Figura 10** é um esquema do Bioensaio Reporter Baseado em Células T/Células Apresentadoras de Antígenos.

[0062] As **Figuras 11A e 11B** mostram que bs24963D (também conhecido como REGN5668) aprimora a sinalização de NF- κ B em células T modificadas na presença de células apresentadoras de antígeno estimuladoras que expressam MUC16. Resumidamente, células repórter J.RT3.T3.5/NF- κ B-Luc/1G4AB/hCD8 α β /hCD28 foram incubadas com bs24963D ou CD28 de anticorpo biespecífico de controle sem ponte (não TAAxCD28) em uma faixa de concentrações (39pM a 10nM), incluindo um controle sem anticorpo, na presença de células 3T3/h β 2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16 (**Figura 11A**) e 3T3/h β 2M/HLA-A2/NYESO1p em uma razão de células repórter 3,33:1 para células 3T3

estimuladoras (**Figura 11B**). A sinalização de NF- κ B foi detectada como atividade de luciferase e medida pela quantificação do sinal de luminescência, relatado como unidades de luz relativa (RLU). Os dados de um ensaio realizado em poços duplicados são representados graficamente como média \pm SD.

[0063] A **Figura 12** mostra que bs24963D (também conhecido como REGN5668) medeia a liberação de IL-2 dependente da concentração de células T primárias humanas na presença de REGN4018 (consultar o documento WO2017/053856A1, BSMUC16/CD3-001 que é REGN4018) com células alvo OVCAR-3 e PEO1. Resumidamente, células T primárias humanas enriquecidas foram incubadas com anticorpo biespecífico de controle sem ponte bs24963D ou CD28 (não TAAxCD28) em uma faixa de concentrações (7,6 pM a 500 nM), incluindo um controle sem anticorpo, na presença de uma concentração fixa (5 nM) de REGN4018 ou anticorpo biespecífico de controle sem ponte CD3 (não TAAxCD3) e as linhas de células de câncer de ovário humano OVCAR-3 ou PEO1 em uma razão de células efectoras-alvo de 10:1 ou 4:1, respectivamente. Os dados são de um ensaio realizado em poços em triplicado e são representados graficamente como média \pm SD. A liberação de IL-2 foi medida usando um imunoenensaio de IL-2 humana de acordo com o protocolo do fabricante.

[0064] A **Figura 13** mostra que bs24963D (também conhecido como REGN5668) medeia o aumento dependente da concentração da proliferação de células T primárias humanas na presença de REGN4018 com células alvo OVCAR-3 e PEO1. Resumidamente, células T primárias humanas enriquecidas foram incubadas com anticorpo biespecífico de controle sem ponte bs24963D ou CD28 (não TAAxCD28) em uma faixa de concentrações (7,6 pM a 500 nM), incluindo um controle sem anticorpo, na presença de uma concentração fixa (5 nM) de REGN4018 ou anticorpo biespecífico de controle sem ponte de CD3 (não TAAxCD3)

e as linhas de células de câncer de ovário humano OVCAR-3 e PEO1 em uma razão de células efetoras-alvo de 10:1 ou 4:1, respectivamente. Os dados são de um ensaio realizado em poços em triplicado e são representados graficamente como média \pm SD. A proliferação de células T foi medida por meio da detecção de decaimento do trítio (de timidina tritiada incorporada em células em divisão) e relatada como CPM.

[0065] A **Figura 14** mostra que bs24963D (também conhecido como REGN5668) medeia a liberação de IL-2 dependente da concentração e a adição de cemiplimabe aumenta modestamente a liberação de IL-2 de células T primárias humanas com células alvo SW1990 e SW1990/hPD-L1. Resumidamente, células T primárias humanas enriquecidas foram incubadas com anticorpo biespecífico de controle sem ponte bs24963D ou CD28 (não TAAxCD28) em uma faixa de concentrações (7,6 pM a 500 nM), incluindo um controle sem anticorpo, na presença de uma concentração fixa (20 nM) de cemiplimabe ou controle de IgG4^P e as linhas de células de câncer de pâncreas humano SW1990 e SW1990/hPD-L1 em uma razão de células efetoras para células-alvo de 2:1. Os dados são de um ensaio realizado em poços em triplicado e são representados graficamente como média \pm SD. A liberação de IL-2 foi medida usando um imunoenensaio de IL-2 humana de acordo com o protocolo do fabricante. As análises estatísticas foram realizadas usando uma ANOVA de 2 fatores. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. bs24963D + cemiplimabe demonstrou aumentos estatisticamente significativos na liberação de IL-2 em comparação com o controle REGN5668 + IgG4^P em células SW1990/hPD-L1 ($p < 0,0001$).

[0066] A **Figura 15** mostra que bs24963D (também conhecido como REGN5668) medeia o aumento da proliferação dependente da concentração e a adição de modestia de cemiplimabe aumenta a proliferação de células T primárias humanas com SW1990 e SW1990/hPD-

L1. Resumidamente, células T primárias humanas enriquecidas foram incubadas com bs24963D ou anticorpo biespecífico de controle sem ponte CD28 (não TAAxCD28) em uma faixa de concentrações (7,6 pM a 500 nM), incluindo um controle sem anticorpo, na presença de uma concentração fixa (20 nM) de qualquer cemiplimabe ou controle de IgG4^P e as linhas de células de câncer pancreático humano SW1990 e SW1990/hPD-L1 em uma razão de células efetoras para células-alvo de 2:1. Os dados são de um ensaio realizado em poços em triplicado e são representados graficamente como média \pm SD. A proliferação de células T foi medida por meio da detecção de decaimento do trítio (de timidina tritiada incorporada em células em divisão) e relatada como CPM. As análises estatísticas foram realizadas usando uma ANOVA de 2 fatores. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. bs24963D + cemiplimabe demonstrou aumentos estatisticamente significativos na proliferação em comparação com o controle bs24963D + IgG4^P em células SW1990/hPD-L1 ($p < 0,0001$).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0067] Antes de a presente invenção ser descrita, deve ser entendido que esta invenção não é limitada a métodos e condições experimentais particulares descritos, visto que tais métodos e condições podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada no presente documento é para o propósito de descrever modalidades particulares apenas, e não se destina a ser limitante, visto que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

[0068] Exceto se for definido de outro modo, todos os termos técnicos e específicos usados no presente documento têm o mesmo significado que é comumente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual a presente invenção pertence. Como usado no presente documento, o termo "cerca de", quando utilizado em referência a um valor numérico particular recitado, significa que o valor pode variar

do valor indicado em não mais do que 1%. Por exemplo, como usado no presente documento, a expressão "cerca de 100" inclui 99 e 101 e todos os valores entre (por exemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

[0069] Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são, agora, descritos. Todas as patentes, pedido e publicações de não patente mencionados no presente relatório específico são incorporados no presente documento a título de referência em suas totalidades.

DEFINIÇÕES

[0070] A expressão "CD28", tal como usada no presente documento, refere-se a um antígeno que é expresso nas células T como um receptor coestimulador. O CD28 humano compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 50 e/ou que tem a sequência de aminoácidos apresentada no número de acesso NCBI NP_006130.1. O domínio ecto de CD28 humano (N19-P152) com um Fc de camundongo é mostrado na SEQ ID NO: 52. O domínio ecto de CD28 humano (N19-P152) com uma etiqueta myc-myc-his é mostrado na SEQ ID NO: 53. Todas as referências a proteínas, polipeptídeos e fragmentos de proteínas no presente documento se destinam a se referir à versão humana da respectiva proteína, polipeptídeo ou fragmento de proteína, a menos que explicitamente especificado como sendo de uma espécie não humana. Assim, a expressão "CD28" significa CD28 humano, a menos que especificado como sendo de uma espécie não humana, por exemplo, "CD28 de camundongo", "CD28 de macaco", etc. Domínio ecto de CD28 de camundongo (número de acesso NP_031668.3) tendo uma etiqueta myc-myc-his é mostrada na SEQ ID NO: 54.

[0071] Como usado no presente documento, "um anticorpo que se liga ao CD28" ou um "anticorpo anti-CD28" inclui anticorpos e fragmen-

tos de ligação ao antígeno dos mesmos que reconhecem especificamente um CD28 monomérico, bem como anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que reconhecem especificamente um CD28 dimérico. Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção podem se ligar a CD28 solúvel e/ou CD28 expressado em superfície celular. O CD28 solúvel inclui proteínas de CD28 naturais, bem como variantes de proteína de CD28 recombinante como, por exemplo, construtos de CD28 monoméricos e diméricos, desprovidos de um domínio transmembranar ou são, de outro modo, não associados a uma membrana celular.

[0072] Como usado no presente documento, a expressão "CD28 expressado em superfície celular" significa uma ou mais proteínas de CD28 que são expressas na superfície de uma célula *in vitro* ou *in vivo*, de modo que pelo menos uma porção de uma proteína de CD28 seja exposta ao lado extracelular da membrana celular e seja acessível a uma porção de ligação ao antígeno de um anticorpo. O "CD28 expressado em superfície celular" inclui proteínas de CD28 contidas dentro do contexto de um receptor coestimulador de célula T funcional na membrana de uma célula. A expressão "CD28 expressado na superfície celular" inclui a proteína CD28 expressa como parte de um homodímero na superfície de uma célula. Um "CD28 expressado na superfície celular" pode compreender ou consistir em uma proteína CD28 expressada na superfície de uma célula que normalmente expressa a proteína CD28. Alternativamente, "CD28 expressado em superfície celular" pode compreender ou consistir na proteína de CD28 expressada na superfície de uma célula que normalmente não expressa CD28 humano em sua superfície, porém, foi geneticamente modificada para expressar CD28 em sua superfície.

[0073] Como usado no presente documento, a expressão "anticorpo anti-CD28" inclui ambos os anticorpos monovalentes com uma

única especificidade, bem como anticorpos biespecíficos que compreendem um primeiro braço que se liga a CD28 e um segundo braço que se liga a um segundo antígeno (alvo), em que o braço anti-CD28 compreende qualquer uma das sequências de HCVR/LCVR ou CDR conforme estabelecido na **Tabela 3** no presente documento. Exemplos de anticorpos biespecíficos anti-CD28 são descritos em outro lugar no presente documento. O termo "molécula de ligação ao antígeno" inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos, incluindo, por exemplo, anticorpos biespecíficos.

[0074] O termo "MUC16", como usado no presente documento, se refere à proteína de MUC16 humana exceto se especificado como sendo de uma espécie não humana (por exemplo, "MUC16 de camundongo", "MUC16 de macaco", etc.). A proteína MUC16 humana tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 49 e/ou que tem a sequência de aminoácidos conforme apresentado no número de acesso NCBI NP_078966. O domínio proximal da membrana MUC16 humana (P13810-P14451) com uma etiqueta myc-myc-his é mostrado como SEQ ID NO: 51.

[0075] Como usado no presente documento, "um anticorpo que se liga a MUC16" ou um "anticorpo anti-MUC16" inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que podem se ligar a MUC16 solúvel e/ou MUC16 expresso na superfície celular. O MUC16 solúvel inclui proteínas de MUC16 naturais, bem como variantes de proteína de MUC16 recombinante como, por exemplo, construtos de MUC16 monoméricos e diméricos, desprovidos de um domínio transmembranar ou são, de outro modo, não associados a uma membrana celular.

[0076] Como usado no presente documento, a expressão "anticorpo anti-MUC16" inclui ambos os anticorpos monovalentes com uma

única especificidade, bem como anticorpos biespecíficos que compreendem um primeiro braço que se liga a MUC16 e um segundo braço que se liga a um segundo antígeno (alvo), em que o braço anti-MUC16 compreende qualquer uma das sequências de HCVR/LCVR ou CDR conforme estabelecido na **Tabela 1** no presente documento. Exemplos de anticorpos biespecíficos anti-MUC16 são descritos em outro lugar no presente documento. O termo "molécula de ligação ao antígeno" inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos, incluindo, por exemplo, anticorpos biespecíficos.

[0077] O termo "molécula de ligação ao antígeno" inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos, incluindo, por exemplo, anticorpos biespecíficos.

[0078] O termo "anticorpo", como usado no presente documento, significa qualquer molécula de ligação ao antígeno ou complexo molecular que compreende pelo menos uma região de determinação de complementaridade (CDR) que se liga especificamente a ou interage com um antígeno particular (por exemplo, CD28). O termo "anticorpo" inclui moléculas de imunoglobulina que compreendem quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto, bem como multímeros dos mesmos (por exemplo, IgM). Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (abreviada no presente documento como HCVR ou VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada compreende três domínios, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (abreviada no presente documento como LCVR ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante da cadeia leve compreende um domínio (C_{L1}). As regiões V_H e V_L podem ser subdivididas ainda em regiões de hipervariabilidade, denominadas de regiões de determinação de com-

plementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de framework (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir de aminoterminação à carboxiterminação na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em diferentes modalidades da invenção, as FRs do anticorpo anti-CD28 e/ou anti-MUC16 (ou a porção de ligação ao antígeno do mesmo) podem ser idênticas às sequências de linhagem germinativa humanas, ou podem ser modificadas natural ou artificialmente. Uma sequência de consenso de aminoácidos pode ser definida com base em uma análise tipo lado a lado de duas ou mais CDRs.

[0079] O termo "anticorpo", como usado no presente documento, também inclui fragmentos de ligação ao antígeno de moléculas de anticorpo completas. Os termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, e similares, como usado no presente documento, incluem qualquer polipeptídeo de ocorrência natural, enzimaticamente obtenível, sintético ou geneticamente modificado ou glicoproteína que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de moléculas de anticorpo completas com o uso de quaisquer técnicas padrão adequadas, como digestão proteolítica ou técnicas de modificação genética recombinante que envolvem a manipulação e expressão de DNA que codifica domínios variável e (opcionalmente) constante de anticorpo. Esse DNA é conhecido e/ou está prontamente disponível, por exemplo, junto a fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo) ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou com o uso de técnicas de biologia molecular, por exemplo, para dispor um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar

aminoácidos, etc.

[0080] Exemplos não limitantes de fragmentos de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadeia simples (scFv); (vi) fragmentos de dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimo que consistem nos resíduos de aminoácidos que imitam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região de determinação de complementaridade (CDR) isolada, como um peptídeo CDR3) ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restringido. Outras moléculas geneticamente modificadas, como anticorpos específicos de domínio, anticorpos de domínio único, anticorpos com domínio excluído, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (por exemplo, nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes etc.), imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs) e domínios IgNAR variáveis de tubarão, também são abrangidos pela expressão "fragmento de ligação ao antígeno", conforme usado no presente documento.

[0081] Um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo irá compreender tipicamente pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácido e irá compreender geralmente pelo menos uma CDR que é adjacente a ou enquadrada com uma ou mais sequências de framework. Nos fragmentos de ligação ao antígeno que têm um domínio V_H associado a um domínio V_L, os domínios V_H e V_L podem estar situados um em relação ao outro em qualquer disposição adequada. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros V_H-V_H, V_H-V_L ou V_L-V_L. Alternativamente, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter um domínio de V_H ou V_L monomérico.

[0082] Em certas modalidades, um fragmento de ligação ao antí-

geno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável covalentemente aglutinado a pelo menos um domínio constante. As configurações exemplificativas não limitantes de domínios variáveis e constantes que podem ser encontradas dentro de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção incluem: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; e (xiv) V_L-C_L . Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer uma das configurações exemplificativas listadas acima, os domínios variável e constante podem ser aglutinados diretamente entre si ou podem ser aglutinados por uma região de aglutinante ou região de articulação completa ou parcial. Uma região de articulação pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos que resultam em uma aglutinação flexível ou semiflexível entre variáveis adjacentes e/ou domínios constantes em uma molécula de polipeptídeo. Ademais, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma dentre as configurações de domínio variável e constante listadas acima em associação não covalente entre si e/ou a um ou mais domínios monoméricos V_H ou V_L (por exemplo, por ligação (ou ligações) de dissulfeto).

[0083] Como ocorre com as moléculas de anticorpo completas, os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos). Um fragmento de ligação ao antígeno multiespecífico de um anticorpo tipicamente irá compreender pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável tem capacidade de se ligar especificamente a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato

de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpo biespecífico exemplificativos revelados no presente documento, pode ser adaptado para uso no contexto de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção com o uso de técnicas de rotina disponíveis na técnica.

[0084] Os anticorpos da presente invenção podem funcionar através de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC). A "citotoxicidade dependente de complemento" (CDC) se refere à lise de células que expressam antígeno por um anticorpo da invenção na presença de complemento. "Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" (ADCC) refere-se a uma reação mediada por células em que células citotóxicas não específicas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células Exterminadoras Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado em uma célula alvo e, assim, leva à lise da célula alvo. CDC e ADCC podem ser medidos com o uso de ensaios que são bem conhecidos e disponíveis na técnica. (Consulte, por exemplo, Patentes nº U.S. 5.500.362 e 5.821.337, e Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sei. (EUA) 95: 652 a 656). A região constante de um anticorpo é importante na capacidade de um anticorpo fixar complemento e mediar a citotoxicidade dependente de células. Portanto, o isótipo de um anticorpo pode ser selecionado com base na possibilidade de ser desejável que o anticorpo seja mediador da citotoxicidade.

[0085] Em certas modalidades da invenção, os anticorpos anti-CD28 e/ou anti-MUC16 da invenção (monoespecíficos ou biespecíficos) são anticorpos humanos. O termo "anticorpo humano", como usado no presente documento, se destina a incluir anticorpos que têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulinas de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de

imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese sítio-específica aleatória *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nos CDRs e, em particular, no CDR3. Entretanto, o termo "anticorpo humano", como usado no presente documento, não se destina a incluir anticorpos em que sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências de framework humanas.

[0086] Os anticorpos da invenção podem, em algumas modalidades, ser anticorpos humanos recombinantes. O termo "anticorpo humano recombinante", como usado no presente documento, se destina a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressados, criados ou isolados por meios recombinantes, como anticorpos expressados com o uso de um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira (descrita mais abaixo), anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatoriais recombinantes (descrita mais abaixo), anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana (consulte, por exemplo, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) ou anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva o splicing de sequências de genes de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Esses anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em certas modalidades, tais anticorpos humanos recombinantes são submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humana é usado, mutagênese somática *in vivo*) e, assim, as sequências de aminoácidos das regiões de V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências

que, embora derivadas e relacionadas às sequências de V_H e V_L de linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de linhagem germinativa de anticorpo humano *in vivo*.

[0087] Os anticorpos humanos podem existir em duas formas que são associadas à heterogeneidade de articulação. Em uma forma, uma molécula de imunoglobulina compreende um construto estável de quatro cadeias de aproximadamente 150 a 160 kDa em que os dímeros são mantidos juntos por uma ligação de dissulfeto de cadeia pesada intercadeias. Em uma segunda forma, os dímeros não estão aglutinados através de ligações dissulfeto entre cadeias e uma molécula de cerca de 75 a 80 kDa é formada composta por uma cadeia leve e pesada acoplada covalentemente (semianticorpo). Essas formas foram extremamente difíceis de separar, mesmo após a purificação de afinidade.

[0088] A frequência de aparecimento da segunda forma em vários isótipos de IgG intactos se deve a, mas sem limitações, diferenças estruturais associadas ao isótipo de região de articulação do anticorpo. Uma única substituição de aminoácido na região de articulação da articulação de IgG4 humana pode reduzir significativamente o aparecimento da segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) a níveis tipicamente observados com o uso de uma articulação de IgG1 humana. A presente invenção engloba anticorpos que têm uma ou mais mutações na articulação, região de CH2 ou CH3 que podem ser desejáveis, por exemplo, na produção, para aprimorar o rendimento da forma de anticorpo desejada.

[0089] Os anticorpos da invenção podem ser anticorpos isolados. Um "anticorpo isolado", como usado no presente documento, significa um anticorpo que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de pelo menos um componente de seu ambiente natural. Por exemplo, um anticorpo que foi separado ou removido de pelo menos um componente de um organismo, ou de um tecido ou célula em que o anticorpo existe

naturalmente ou é produzido naturalmente, é um "anticorpo isolado" para os fins da presente invenção. Um anticorpo isolado também inclui um anticorpo *in situ* dentro de uma célula recombinante. Os anticorpos isolados são anticorpos que foram submetidos a pelo menos uma etapa de purificação ou isolamento. De acordo com certas modalidades, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou agentes químicos.

[0090] A presente invenção também inclui anticorpos de um braço que se ligam a CD28 e/ou MUC16. Como usado no presente documento, um "anticorpo de um braço" significa uma molécula de ligação ao antígeno que compreende uma cadeia pesada de anticorpo único e uma cadeia leve de anticorpo único. Os anticorpos de um braço da presente invenção podem compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR ou CDR como apresentado na **Tabela 1** e na **Tabela 3**.

[0091] Os anticorpos anti-CD28 e/ou anti-MUC16 no presente documento, ou os domínios de ligação ao antígeno dos mesmos, podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos nas regiões de framework e/ou CDR dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve em comparação com as sequências de linhagem germinativa correspondentes a partir das quais os domínios de ligação ao antígeno individuais ou proteínas foram derivados. Tais mutações podem ser prontamente apuradas comparando-se as sequências de aminoácidos reveladas no presente documento com sequências de linhagem germinativa disponíveis a partir de, por exemplo, bancos de dados públicos de sequência de anticorpo. A presente invenção inclui anticorpos, e os domínios de ligação ao antígeno dos mesmos, que são derivados de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos reveladas no presente documento, sendo que um ou mais ami-

noácidos dentro de uma ou mais regiões de framework e/ou CDR sofrem mutação para o resíduo (ou resíduos) correspondente da sequência de linhagens germinativas da qual o anticorpo foi derivado ou do resíduo (ou resíduos) correspondente de outra sequência de linhagens germinativas humanas, ou a uma substituição conservadora de aminoácido do resíduo (ou resíduos) da linhagem germinativa correspondente (tais alterações de sequência são denominadas no presente documento coletivamente de "mutações de linhagem germinativa"). Uma pessoa versada na técnica, começando com as sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e leve reveladas no presente documento, pode produzir facilmente inúmeros anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que compreendem uma ou mais mutações de linhagem germinativa individual ou suas combinações dos mesmos. Em determinadas modalidades, todos os resíduos de framework e/ou de CDR dentro dos domínios V_H e/ou V_L sofrem mutação de volta para os resíduos constatados na sequência original de linhagens germinativas da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas determinados resíduos sofrem mutação de volta para a sequência original de linhagens germinativas, por exemplo, apenas os resíduos que sofreram mutação constatados nos primeiros 8 aminoácidos do FR1 ou nos últimos 8 aminoácidos do FR4, ou apenas os resíduos que sofreram mutação constatados no CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais dos resíduos de framework e/ou de CDR sofrem mutação para o resíduo correspondente (ou resíduos correspondentes) de uma sequência diferentes de linhagens germinativas (isto é, uma sequência de linhagens germinativas que é diferente da sequência de linhagens germinativas da qual o anticorpo derivou originalmente). Além disso, os anticorpos, ou os domínios de ligação ao antígeno do mesmo, da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações da linhagem germinativa dentro das regiões de framework

e/ou de CDR, por exemplo, em que determinados resíduos individuais sofrem mutação para o resíduo correspondente de uma determinada sequência de linhagem germinativa, enquanto certos outros resíduos que são diferentes da sequência original de linhagem germinativa são mantidos ou sofrem mutação para o resíduo correspondente de uma sequência diferente da linhagem germinativa. Uma vez obtidos, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que contêm uma ou mais mutações germinativas podem ser facilmente testados em relação a uma ou mais propriedades desejadas, como melhor especificidade de ligação, maior afinidade de ligação, propriedades biológicas antagonistas ou agonísticas aprimoradas ou amplificadas (conforme o caso), imunogenicidade reduzida etc. Os anticorpos, ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, obtidos dessa maneira geral são abrangidos pela presente invenção.

[0092] A presente invenção também inclui anticorpos anti-CD28 e/ou MUC16 e moléculas de ligação ao antígeno que compreendem variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR reveladas no presente documento. Variantes exemplificativas incluídas nesse aspecto da invenção incluem variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR divulgadas neste documento que têm uma ou mais substituições conservativas. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-CD28 e moléculas de ligação ao antígeno que têm sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR, por exemplo, com 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. As substituições de aminoácido conservadoras em relação a qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR apresentadas na **Tabela 3** no presente documento.

[0093] O termo "epitopo" refere-se a um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação ao antígeno específico na região

variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um único antígeno pode ter mais de um epitopo. Desse modo, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas de um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. Os epitopos podem ser conformacionais ou lineares. Um epitopo conformacional é produzido por aminoácidos espacialmente justapostos de diferentes segmentos da cadeia polipeptídica linear. Um epitopo linear é aquele produzido por resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica. Em certa circunstância, um epitopo pode incluir porções químicas de sacarídeos, grupos fosforila ou grupos sulfonila no antígeno.

[0094] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico", quando se refere a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando idealmente alinhado com inserções ou deleções de nucleotídeo adequadas com outro ácido nucleico (ou seu filamento complementar), há identidade de sequência de nucleotídeo em pelo menos cerca de 95% e, mais preferencialmente, pelo menos cerca de 96%, 97%, 98% ou 99% das bases de nucleotídeo, conforme medido por um algoritmo bem conhecido de identidade de sequência, como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucleico que tem identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em determinados casos, codificar um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos igual ou substancialmente semelhante ao polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de referência.

[0095] Como aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeos, quando alinhadas de modo ideal, como pelos programas GAP ou BESTFIT com o uso de ponderações de lacuna-padrão, compartilham pelo menos 95% de identidade de sequência, ainda mais preferencialmente, pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequência.

Preferencialmente, as posições de resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservadoras. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição conservadora de aminoácidos não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos são diferentes entre si por substituições conservadoras, a porcentagem de identidade de sequência ou grau de similaridade podem ser ajustados de maneira ascendente para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para realizar esse ajuste são bem conhecidos pelos indivíduos versados da técnica. Consulte, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24, 307 a 331. Os exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem (1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadeias laterais de hidroxila alifática: serina e treonina; (3) cadeias laterais que contêm amida: asparagina e glutamina; (4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; (5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato e (7) cadeias laterais que contêm enxofre: cisteína e metionina. Os grupos preferências de substituição de aminoácidos conservativas são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer mudança que tem um valor positivo na matriz com probabilidade logarítmica PAM250 em Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração que tenha um valor não negativo na matriz PAM250 de probabilidade de log.

[0096] A similaridade de sequência para polipeptídeos, que também é chamada de identidade de sequência, é tipicamente medida com o uso de software de análise de sequência. O software de análise de proteína corresponde sequências similares com o uso de medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, o software GCG contém programas, tais como GAP e BESTFIT, que podem ser usados com parâmetros-padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e uma muteína da mesma. Consulte, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos também podem ser comparadas com o uso de FASTA com o uso de parâmetros recomendados ou padrão, um programa em GCG Versão 6.1. O FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e percentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson (2000) *supra*). Outro algoritmo preferencial quando uma sequência da invenção é comparada a uma base de dados que contém um grande número de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente, BLASTP ou TBLASTN, com o uso de parâmetros-padrão. Consulte, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 and Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO BIESPECÍFICO

[0097] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos ou multiespecíficos. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epitopos de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação ao antígeno específico para mais de um polipeptídeo-alvo. Consulte, por exemplo, Tutt *et al.*, 1991,

J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Os anticorpos anti-CD28 e/ou anti-MUC16 da presente invenção podem ser ligados a ou coexpressados com outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser funcionalmente aglutinado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, como outro anticorpo ou fragmento de anticorpo para produzir um anticorpo biespecífico ou multiespecífico com uma segunda especificidade de ligação.

[0098] O uso da expressão "anticorpo anti-CD28" e/ou "anticorpo anti-MUC16" se destina, no presente documento, a incluir tanto os anticorpos anti-CD28 e/ou anti-MUC16 mono-específicos quanto os anticorpos biespecíficos que compreendem um braço de ligação a CD28 ou um braço de ligação a MUC16 e um segundo braço que se liga a um antígeno alvo. Desse modo, a presente invenção inclui anticorpos biespecíficos em que um braço de uma imunoglobulina se liga ao CD28 humano ou MUC16, e o outro braço da imunoglobulina é específico para um antígeno alvo. O antígeno alvo ao qual o outro braço do anticorpo biespecífico CD28 ou MUC16 se liga pode ser qualquer antígeno expressado em ou na proximidade de uma célula, tecido, órgão, micro-organismo ou vírus, contra o qual uma resposta imunológica alvejada é desejada. O braço de ligação a CD28 pode compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR ou CDR como apresentado na **Tabela 3** no presente documento. O braço de ligação a MUC16 pode compreender qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR ou CDR como apresentado na **Tabela 1** no presente documento. Em certas modalidades, o braço de ligação a CD28 se liga a CD28 humano e induz a proliferação de células T humanas.

[0099] No contexto de anticorpos biespecíficos da presente invenção, em que um braço do anticorpo se liga a CD28 e o outro braço se liga a um antígeno alvo, o antígeno alvo pode ser um antígeno associado a tumor, como MUC16.

[0100] De acordo com certas modalidades exemplificativas, a presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que se ligam especificamente a CD28 e MUC16. Tais moléculas podem ser referidas aqui como, por exemplo, "anti-CD28/anti-MUC16" ou "anti-CD28xMUC16" ou "CD28xMUC16" ou "anti-MUC16/anti-CD28" ou "anti-MUC16xCD28", ou moléculas biespecíficas "MUC16xCD28" ou outra terminologia semelhante.

[0101] De acordo com certas modalidades exemplificativas, como mostrado nas Figuras, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas (por exemplo, anticorpo biespecífico) podem ter um braço efetor e um braço de alvejamento. O braço efetor pode ser o primeiro domínio de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpo anti-CD28) que se liga aos antígenos nas células efetoras (por exemplo, células T). O braço de alvejamento pode ser o segundo domínio de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpo anti-MUC16) que se liga aos antígenos nas células alvo (por exemplo, células tumorais). De acordo com certas modalidades exemplificativas, o braço efetor se liga ao CD28 e o braço de alvejamento se liga a MUC16. O anti-CD28/MUC16 biespecífico pode fornecer sinal coestimulador para células efetoras (por exemplo, células T). O braço efetor não tem efeito para estimular as células T sem agrupamento. Após o agrupamento, o braço efetor sozinho tem pouco efeito para estimular as células T. Em combinação com o braço de alvejamento, o braço efetor estimula as células T. O braço de alvejamento de tumor pode ter especificidade de tumor imperfeita. O antígeno que é o alvo do braço de alvejamento (por exemplo, MUC16) pode ser expressado em uma fração de células tumorais. A especificidade do braço de

alvejamento do tumor pode ser aumentada pela sobreposição com a combinação com moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD3 (por exemplo, anticorpo biespecífico anti-CD3/MUC16).

[0102] Como usado no presente documento, a expressão "molécula de ligação ao antígeno" significa uma proteína, um polipeptídeo ou complexo molecular que compreende ou consiste em pelo menos uma região de determinação de complementaridade (CDR) que, sozinha ou em combinação com uma ou mais CDRs adicionais e/ou regiões de framework (FRs), se liga especificamente a um antígeno particular. Em certas modalidades, uma molécula de ligação ao antígeno é um anticorpo ou um fragmento de um anticorpo, como aqueles termos são definidos em outro local no presente documento.

[0103] Como usado no presente documento, a expressão "molécula de ligação ao antígeno biespecífica" significa uma proteína, um polipeptídeo ou complexo molecular que compreende pelo menos um primeiro domínio de ligação ao antígeno e um segundo domínio de ligação ao antígeno. Cada domínio de ligação ao antígeno dentro da molécula de ligação ao antígeno biespecífica compreende pelo menos um CDR que, sozinha ou em combinação com um ou mais CDRs e/ou FRs adicionais, se liga especificamente a um antígeno particular. No contexto da presente invenção, o primeiro domínio de ligação ao antígeno se liga especificamente a um primeiro antígeno (por exemplo, CD28) e o segundo domínio de ligação ao antígeno se liga especificamente a um segundo antígeno distinto (por exemplo, MUC16).

[0104] Em certas modalidades exemplificativas da presente invenção, a molécula de ligação ao antígeno biespecífica é um anticorpo biespecífico. Cada domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo biespecífico compreende um domínio variável de cadeia pesada (HCVR) e um domínio variável de cadeia leve (LCVR). No contexto de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica que compreende um primeiro

e um segundo domínios de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo biespecífico), os CDRs do primeiro domínio de ligação ao antígeno podem ser designados com o prefixo "D1" e os CDRs do segundo domínio de ligação ao antígeno podem ser designados com o prefixo "D2". Desse modo, os CDRs do primeiro domínio de ligação ao antígeno podem ser denominados, no presente documento, de D1-HCDR1, D1-HCDR2 e D1-HCDR3; e os CDRs do segundo domínio de ligação ao antígeno podem ser denominados, no presente documento, de D2-HCDR1, D2-HCDR2 e D2-HCDR3.

[0105] O primeiro domínio de ligação ao antígeno e o segundo domínio de ligação ao antígeno podem estar direta ou indiretamente conectados um ao outro para formar uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica da presente invenção. Alternativamente, o primeiro domínio de ligação ao antígeno e o segundo domínio de ligação ao antígeno podem, cada um, ser conectados a um domínio de multimerização separado. A associação de um domínio de multimerização a outro domínio de multimerização facilita a associação entre os dois domínios de ligação ao antígeno, formando, assim, uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica. Como usado no presente documento, um "domínio de multimerização" é qualquer macromolécula, proteína, polipeptídeo, peptídeo ou aminoácido que tem a capacidade de se associar a um segundo domínio de multimerização da mesma estrutura ou constituição ou semelhante. Por exemplo, um domínio de multimerização pode ser um polipeptídeo que compreende um domínio C_H3 de imunoglobulina. Um exemplo não limitante de um componente de multimerização é uma porção de Fc de uma imunoglobulina (que compreende um domínio de C_H2-C_H3), por exemplo, um domínio de Fc de uma IgG selecionada a partir dos isótipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, assim como qualquer alótipo dentro de cada grupo de isótipo.

[0106] As moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção irão compreender tipicamente dois domínios de multimerização, por exemplo, dois domínios de Fc que são, cada um, individualmente, parte de uma cadeia pesada de anticorpo separado. O primeiro e o segundo domínios de multimerização podem ser do mesmo isótipo de IgG como, por exemplo, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Alternativamente, o primeiro e o segundo domínios de multimerização podem ser de isótipos de IgG diferentes como, por exemplo, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, etc.

[0107] Em certas modalidades, o domínio de multimerização é um fragmento de Fc ou uma sequência de aminoácidos de 1 a cerca de 200 aminoácidos em comprimento que contém pelo menos um resíduo de cisteína. Em outras modalidades, o domínio de multimerização é um resíduo de cisteína ou um peptídeo que contém cisteína curta. Outros domínios de multimerização incluem peptídeos ou polipeptídeos que compreendem ou consistem em um zíper de leucina, um motivo de hélice-laço ou a motivo de bobina bobinada.

[0108] Qualquer formato ou tecnologia de anticorpo biespecífico pode ser usado para produzir as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo que tem uma primeira especificidade de ligação ao antígeno pode ser funcionalmente aglutinado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, como outro anticorpo ou fragmento de anticorpo que tem uma segunda especificidade de ligação ao antígeno para produzir uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica. Os formatos biespecíficos exemplificativos específicos que podem ser usados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, formatos biespecíficos de diacorpo ou à base de scFv, fusões de IgG-scFv, de domínio variável duplo (OVO),

Quadroma, empacotamentos tipo *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com empacotamentos tipo *knobs-into-holes*, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)corpo, zíper de leucina, Duocorpo, IgG1/IgG2, Fab de atuação dupla (DAF)-IgG e formatos bi-específicos de Mab² (consultar, por exemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, e referências citadas no presente documento, para uma revisão dos formatos anteriores).

[0109] No contexto de moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção, os domínios de multimerização, por exemplo, domínios de Fc, podem compreender uma ou mais alterações de aminoácido (por exemplo, inserções, deleções ou substituições) em comparação com a versão de ocorrência natural de tipo selvagem do domínio de Fc. Por exemplo, a invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que compreendem uma ou mais modificações no domínio de Fc que resulta em um domínio de Fc modificado que tem uma interação de ligação modificada (por exemplo, intensificada ou reduzida) entre Fc e FcRn. Em uma modalidade, a molécula de ligação ao antígeno biespecífica compreende uma modificação em uma região C_H2 ou C_H3, em que a modificação aumenta a afinidade do domínio de Fc para FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossomo em que o pH está na faixa de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Exemplos não limitantes de tais modificações de Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, LN/FIW ou T), 254 (por exemplo, S ou T) e 256 (por exemplo, S/R/Q/EID ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, UR/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, HF ou V); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F) e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação 428L, 2591

(por exemplo, V259I) e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e uma modificação 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P).

[0110] A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que compreendem um primeiro domínio de C_{H3} e um segundo domínios de C_{H3} de Ig, em que o primeiro e o segundo domínios de C_{H3} de Ig diferem um do outro em pelo menos um aminoácido, e em que pelo menos uma diferença de aminoácido reduz a ligação do anticorpo biespecífico à Proteína A em comparação com um anticorpo biespecífico desprovido da diferença de aminoácido. Em uma modalidade, o primeiro domínio de C_{H3} de Ig se liga à Proteína A e o segundo domínio de C_{H3} de Ig contém uma mutação que reduz ou abole a ligação de Proteína A como uma modificação de H95R (por numeração de éxon de IMGT; H435R por numeração de EU). O segundo C_{H3} pode compreender ainda uma modificação Y96F (por IMGT; Y436F por EU). As modificações adicionais que podem ser constatadas dentro do segundo CH3 incluem: D16E, L 18M, N44S, K52N, V57M e V821 (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M e V4221 por EU) no caso de anticorpos de IgG1; N44S, K52N e V821 (IMGT; N384S, K392N e V4221 por EU) no caso de anticorpos de IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q e V821 (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q e V4221 por EU) no caso de anticorpos de IgG4.

[0111] Em certas modalidades, o domínio de Fc pode ser quimérico, combinando sequências Fc derivadas de mais de um isótipo de imunoglobulina. Por exemplo, um domínio de Fc quimérico pode compreender parte ou a totalidade de uma sequência de C_{H2} derivada de uma região de C_{H2} de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, e parte ou a totalidade de uma sequência de C_{H3} derivada de uma IgG1 humana,

IgG2 humana ou IgG4 humana. Um domínio de Fc quimérico também pode conter uma região de articulação quimérica. Por exemplo, uma articulação quimérica pode compreender uma sequência “articulações superiores”, derivadas de uma região de articulação de IgG1 humana, uma região de articulação de IgG2 humana ou uma região de articulação de IgG4 humana, combinada com uma sequência de “articulações inferiores”, derivadas de uma região de articulação de IgG1 humana, uma região de articulação de IgG2 humana ou uma região de articulação de IgG4 humana. Um exemplo particular de um domínio de Fc quimérico que pode ser incluído em qualquer uma das moléculas de ligação ao antígeno apresentadas no presente documento compreende, do terminal N ao C: [IgG4 C_H1] - [articulação superior de IgG4] - [articulação inferior de IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG4 C_H3]. Outro exemplo de um domínio de Fc quimérico que pode ser incluído em qualquer uma das moléculas de ligação ao antígeno apresentadas no presente documento compreende, do terminal N ao C: [IgG1 C_H1] - [articulação superior de IgG1] - [articulação inferior de IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG1 C_H3]. Esses e outros exemplos de domínios de Fc quiméricos que podem ser incluídos em qualquer uma das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção são descritos no documento WO2014/022540 A1, domínios de Fc quiméricos com esses arranjos estruturais gerais, e variantes dos mesmos, podem ter ligação de receptor de Fc alterado que, por sua vez, afeta a função efetora de Fc.

VARIANTES DE SEQUÊNCIA

[0112] Os anticorpos e moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos nas regiões de framework e/ou CDR dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve em comparação com as sequências de linhagem germinativa correspondentes a partir das quais os domínios de ligação ao antígeno individuais

foram derivados. Tais mutações podem ser prontamente apuradas comparando-se as sequências de aminoácidos reveladas no presente documento com sequências de linhagem germinativa disponíveis a partir de, por exemplo, bancos de dados públicos de sequência de anticorpo. As moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção podem compreender fragmentos de ligação ao antígeno que são derivados de qualquer uma das sequências de aminoácidos reveladas no presente documento, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões de framework e/ou CDR sofrem mutação para o resíduo (ou resíduos) correspondente da sequência de linhagens germinativas da qual o anticorpo foi derivado ou do resíduo (ou resíduos) correspondente de outra sequência de linhagens germinativas humana, ou a uma substituição conservadora de aminoácido do resíduo (ou resíduos) da linhagem germinativa correspondente (tais alterações de sequência são denominadas no presente documento coletivamente de "mutações de linhagem germinativa"). Um indivíduo versado na técnica, começando com as sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e leve reveladas no presente documento, pode produzir facilmente inúmeros anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que compreendem uma ou mais mutações de linhagem germinativa individual ou combinações dos mesmos. Em determinadas modalidades, todos os resíduos de framework e/ou de CDR dentro dos domínios V_H e/ou V_L sofrem mutação de volta para os resíduos constatados na sequência original de linhagens germinativas das quais o domínio de ligação ao antígeno foi originalmente derivado. Em outras modalidades, apenas determinados resíduos sofrem mutação de volta para a sequência original de linhagens germinativas, por exemplo, apenas os resíduos que sofreram mutação constatados nos primeiros 8 aminoácidos do FR1 ou nos últimos 8 aminoácidos do FR4, ou apenas os resíduos que sofreram mutação constatados no CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais

dos resíduos de framework e/ou de CDR sofrem mutação para o resíduo (ou resíduos) correspondente de uma sequência diferentes de linhagens germinativas (isto é, uma sequência de linhagens germinativas que é diferente da sequência de linhagens germinativas das quais o anticorpo originalmente foi derivado). Ademais, os domínios de ligação ao antígeno podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações de linhagem germinativa dentro das regiões de framework e/ou CDR, por exemplo, em que certos resíduos individuais sofrem mutação para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagens germinativas particular, enquanto certos outros resíduos que diferem da sequência de linhagens germinativas original são mantidos ou sofrem mutação para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagens germinativas diferente. Uma vez obtidos, os domínios de ligação ao antígeno que contêm uma ou mais mutações de linhagem germinativa podem ser facilmente testados quanto a uma ou mais propriedades desejadas como, especificidade de ligação aprimorada, afinidade de ligação aumentada, propriedades biológicas antagonistas ou agonistas aprimoradas ou intensificadas (de acordo com o caso), imunogenicidade reduzida, etc. As moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que compreendem um ou mais domínios de ligação ao antígeno obtido dessa maneira geral são abrangidas dentro da presente invenção.

[0113] A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno em que um ou ambos os domínios de ligação ao antígeno compreendem variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR reveladas no presente documento que têm uma ou mais substituições conservadoras. Por exemplo, a presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno que compreendem um domínio de ligação ao antígeno que tem sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR, por exemplo, com 10 ou menos, 8 ou menos,

6 ou menos, 4 ou menos, etc. substituições de aminoácido conservadoras em relação a qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR reveladas no presente documento. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição conservadora de aminoácidos não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Os exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem (1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadeias laterais de hidroxila alifática: serina e treonina; (3) cadeias laterais que contêm amida: asparagina e glutamina; (4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; (5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato e (7) cadeias laterais que contêm enxofre: cisteína e metionina. Os grupos preferências de substituição de aminoácidos conservativas são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer alteração que tem um valor positivo na matriz com probabilidade logarítmica PAM250 revelada em Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração que tenha um valor não negativo na matriz PAM250 de probabilidade de log.

[0114] A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno que compreendem um domínio de ligação ao antígeno com uma sequência de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR que é substancialmente idêntica a qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR divulgadas no presente documento. O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntica", em referência

a uma sequência de aminoácidos significa que duas sequências de aminoácidos, quando idealmente alinhadas, como através dos programas GAP ou BESTFIT com o uso de ponderações de lacuna-padrão, compartilham pelo menos 95% de identidade de sequência, ainda mais preferencialmente, pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequência. Preferencialmente, as posições de resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservadoras. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos são diferentes entre si por substituições conservadoras, a porcentagem de identidade de sequência ou grau de similaridade podem ser ajustados de maneira ascendente para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para realizar esse ajuste são bem conhecidos pelos indivíduos versados da técnica. Consulte, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24, 307 a 331.

[0115] A similaridade de sequência para polipeptídeos, que também é chamada de identidade de sequência, é tipicamente medida com o uso de software de análise de sequência. O software de análise de proteína corresponde sequências similares com o uso de medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, o software GCG contém programas, tais como GAP e BESTFIT, que podem ser usados com parâmetros-padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e uma muteína da mesma. Consulte, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos também podem ser comparadas com o uso de FASTA com o uso de parâmetros recomendados ou padrão, um programa em GCG Versão 6.1. O FASTA (por exemplo, FASTA2 e

FASTA3) fornece alinhamentos e percentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson (2000) *supra*). Outro algoritmo preferencial quando uma sequência da invenção é comparada a uma base de dados que contém um grande número de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente, BLASTP ou TBLASTN, com o uso de parâmetros-padrão. Consulte, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 and Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

LIGAÇÃO DEPENDENTE DE PH

[0116] A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16, com características de ligação dependentes de pH. Por exemplo, um anticorpo anti-CD28 da presente invenção pode exibir ligação reduzida a CD28 em pH ácido em comparação com o pH neutro. Alternativamente, os anticorpos anti-MUC16 da invenção podem exibir ligação intensificada à MUC16 em pH ácido em comparação com o pH neutro. A expressão "pH ácido" inclui valores de pH menores que cerca de 6,2, por exemplo, cerca de 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 ou menos. Como usado no presente documento, a expressão "pH neutro" significa um pH de cerca de 7,0 a cerca de 7,4. A expressão "pH neutro" inclui valores de pH de cerca de 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 e 7,4.

[0117] Em certos casos, "ligação reduzida... em pH ácido em comparação com o pH neutro" é expresso em termos de uma razão do valor de K_D da ligação de anticorpo ao seu antígeno em pH ácido para o valor de K_D da ligação de anticorpo ao seu antígeno em pH neutro (ou vice-versa). Por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser considerado como exibindo "ligação reduzida a CD28 em pH ácido em comparação com o pH neutro" para propósitos

da presente invenção se o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo exibir uma razão de K_D ácida/neutra de cerca de 3,0 ou maior. Em certas modalidades exemplificativas, a razão de K_D ácida/neutra para um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da presente invenção pode ser cerca de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 ou maior.

[0118] Os anticorpos com características de ligação dependente de pH podem ser obtidos, por exemplo, examinando-se uma população de anticorpos para ligação reduzida (ou intensificada) a um antígeno particular em pH ácido em comparação com o pH neutro. Adicionalmente, as modificações do domínio de ligação ao antígeno no nível de aminoácido podem produzir anticorpos com características dependentes de pH. Por exemplo, substituindo-se um ou mais aminoácidos de um domínio de ligação ao antígeno (por exemplo, dentro de um CDR) por um resíduo de histidina, um anticorpo com ligação ao antígeno reduzida em pH ácido em relação ao pH neutro pode ser obtido.

ANTICORPOS QUE COMPREENDEM VARIANTES DE FC

[0119] De acordo com certas modalidades da presente invenção, são fornecidas moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que compreendem um domínio de Fc que compreende uma ou mais mutações que intensificam ou diminuem a ligação de anticorpo ao receptor de FcRn, por exemplo, em pH ácido em comparação com o pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos e moléculas de ligação ao antígeno que compreendem uma mutação na região de C_H2 ou C_H3 do domínio de Fc, em que a mutação (ou mutações) aumenta a afinidade do domínio de Fc ao FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossomo em que o pH está na faixa de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento na meia-vida sérica do anticorpo quando administradas a

um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações de Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T) e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, H/F ou Y; ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F) e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação de 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação de 428L, 259I (por exemplo, V259I), e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação de 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação de 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação de 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P).

[0120] Por exemplo, a presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que compreendem um domínio de Fc que compreende um ou mais pares ou grupos de mutações selecionadas a partir do grupo que consiste em: 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Todas as combinações possíveis das mutações de domínio de Fc supracitadas, e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpo reveladas no presente documento, são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS ANTICORPOS E MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO

[0121] A presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam a CD28 e/ou MUC16 humano

com alta afinidade. A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam ao CD28 e/ou MUC16 humano com afinidade média ou baixa, dependendo do contexto terapêutico e das propriedades de alvejamento particulares que são desejadas. Por exemplo, no contexto de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica, em que um braço se liga a CD28 e outro braço se liga a um antígeno alvo (por exemplo, MUC16), pode ser desejável que o braço de ligação ao antígeno alvo se ligue ao antígeno alvo com alta afinidade, enquanto o braço anti-CD28 se liga a CD28 apenas com afinidade moderada ou baixa. Dessa maneira, o alvejamento preferencial da molécula de ligação ao antígeno à células que expressam o antígeno alvo pode ser alcançado enquanto se evita a ligação ao CD28 geral/não alvejado e os efeitos colaterais adversos consequentes associados à mesma.

[0122] De acordo com certas modalidades, a presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que se ligam a CD28 humano (por exemplo, em 37 °C) com uma K_D menor que cerca de 165 nM, conforme medido por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção se ligam a CD28 com uma K_D menor que cerca de 150 nM, menor que cerca de 130 nM, menor que cerca de 120 nM, menor que cerca de 100 nM, menor que cerca de 50 nM, menor que cerca de 80 nM, menor que cerca de 60 nM, menor que cerca de 40 nM, menor que cerca de 30 nM, conforme medido por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento ou um ensaio substancialmente similar.

[0123] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam a CD28 com uma

meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) maior que cerca de 2,1 minutos, conforme medido por ressonância de plasmônio de superfície a 37 °C, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio, como definido no Exemplo 4 do presente documento, ou um ensaio substancialmente similar. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção se ligam a CD28 com uma $t_{1/2}$ maior que cerca de 5 minutos, maior que cerca de 10 minutos, maior que cerca de 20 minutos, maior que cerca de 30 minutos, maior que cerca de 40 minutos, maior que cerca de 50 minutos, maior que cerca de 60 minutos, maior que cerca de 70 minutos, maior que cerca de 80 minutos, maior que cerca de 90 minutos, maior que cerca de 100 minutos, maior que cerca de 200 minutos, maior que cerca de 300 minutos, maior que cerca de 400 minutos, maior que cerca de 500 minutos, maior que cerca de 600 minutos, maior que cerca de 700 minutos, maior que cerca de 800 minutos, maior que cerca de 900 minutos, maior que cerca de 1000 minutos ou maior que cerca de 1200 minutos, conforme medido por ressonância plasmônica de superfície em 25 °C ou 37 °C, por exemplo, com o uso de um formato de ensaio como definido no Exemplo 4 no presente documento ou um ensaio substancialmente similar.

[0124] A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas (por exemplo, anticorpos biespecíficos) que têm capacidade de se ligarem simultaneamente a CD28 humano e MUC16 humano. De acordo com certas modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da invenção interagem especificamente com células que expressam CD28 e/ou MUC16. A extensão à qual uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica se liga às células que expressam CD28 e/ou MUC16 pode ser avaliada por fluorescência classificação de célula ativada (FACS), como ilustrado no Exemplo 5 no presente documento. Por exemplo, a presente invenção inclui moléculas de liga-

ção a antígeno biespecíficas que se ligam especificamente a células humanas ou de cynomolgus que expressam CD28, mas não MUC16 (por exemplo, células T) e linhas de células de carcinoma de ovário humano que expressam MUC16, mas não CD28 (por exemplo, OVCAR-3 ou PEO1). A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que se ligam a qualquer uma das células e linhagens celulares acima mencionadas com um valor de EC_{50} de cerca de $9,2 \times 10^{-6}$ a cerca de $2,8 \times 10^{-10}$, ou menos, conforme determinado com o uso de um ensaio FACS, conforme apresentado no Exemplo 4 ou um ensaio substancialmente semelhante.

[0125] A presente invenção também fornece moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que induzem ou aumentam o extermínio de células tumorais mediado por células T. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-CD28xMUC16 que induzem ou aumentam o extermínio mediado por células T de células tumorais com uma EC_{50} de menos que cerca de 392 pM, conforme medido em um ensaio de extermínio de célula tumoral mediada por célula T *in vitro*, por exemplo, usando-se o formato de ensaio, conforme definido no Exemplo 7 no presente documento (por exemplo, avaliando a extensão do extermínio de células tumorais de PEO1 por PBMCs humanas na presença de anticorpos anti-CD28xMUC16) ou um ensaio substancialmente semelhante. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção induzem o extermínio de células tumorais mediada por células T (por exemplo, morte mediada por PBMC de células PEO1) com um valor de EC_{50} menor que cerca de 200 pM, menor que cerca de 150 pM, menor que cerca de 100 pM, menor que cerca de 75 pM, menor que cerca de 50 pM, menor que cerca de 25 pM, menor que cerca de 10 pM, menor que cerca de 5,0 pM, menor que cerca de 4,0 pM, menor que cerca de 3,0 pM, menor que cerca de 2,5 pM, menor que cerca de 2,0 pM, menor que

cerca de 1,5 pM ou menor que cerca de 1,45 pM, conforme medido por um ensaio de extermínio de células tumorais mediado por célula T *in vitro*, por exemplo, usando-se o formato de ensaio conforme definido no Exemplo 7 neste documento, ou um ensaio substancialmente similar.

[0126] A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que se ligam a células T humanas que expressam CD28 e/ou cynomolgus com um valor de EC₅₀ entre 1,0 pM e 10 nM. Em certas modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 se ligam às células T humanas que expressam CD28 e/ou cynomolgus com um valor de EC₅₀ entre 9,2 nM e 120 nM. Por exemplo, a presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que se ligam a células T humanas que expressam CD28 com um valor EC₅₀ de cerca de 1 pM, cerca de 10 pM, cerca de 100 pM, cerca de 500 pM, cerca de 1 nM, cerca de 2 nM, cerca de 5 nM, cerca de 10 nM, cerca de 20 nM, cerca de 30 nM, cerca de 40 nM, cerca de 50 nM, cerca de 60 nM, cerca de 70 nM, cerca de 80 nM, cerca de 90 nM, cerca de 100 nM, cerca de 200 nM, cerca de 300 nM, cerca de 500 nM, cerca de 800 nM, cerca de 1000 nM, cerca de 2 µM, cerca de 4 µM, cerca de 6 µM, cerca de 8 µM, cerca de 10 µM ou mais.

[0127] A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que exibem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em: (a) ativação de células T, indução da liberação de IL-2 e regulação crescente de CD25+ e PD-1 em PBMCs humanas (consultar, por exemplo, Exemplos 6 e 7 aqui); (b) aumento da citotoxicidade mediada por células T humanas ou de cynomolgus em linhas de células que expressam MUC16 (consultar, por exemplo, Exemplo 7 aqui); (c) indução de citotoxicidade mediada por células T de primatas virgens em linhas de células que expressam MUC16 (consultar, por exemplo, Exemplo 7 aqui); (e) esgotamento de

células tumorais em camundongos (por exemplo, Exemplo 8 aqui); (f) aumento da eliminação do tumor em camundongos (por exemplo, Exemplo 8 aqui); (g) não indução da ativação de células T sistêmicas em macacos cynomolgus.

[0128] A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 que têm capacidade de esgotar as células tumorais em um indivíduo (consultar, por exemplo, Exemplo 9). Por exemplo, de acordo com certas modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 são fornecidas, em que uma única administração da molécula de ligação ao antígeno biespecífica a um indivíduo (por exemplo, em uma dose de cerca de 5,0 mg/kg, cerca de 2,5 mg/kg, cerca de 1,0 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg ou menos) causa uma redução no número de células tumorais no indivíduo. De acordo com certas modalidades, moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 são fornecidas, em que administrações duplas da molécula de ligação ao antígeno biespecífica a um indivíduo (por exemplo, a uma dose de cerca de 2500 mg, cerca de 1000 mg, cerca de 500 mg, cerca de 200 mg, cerca de 100 mg, cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 mg/kg ou menos) causa uma redução no número de células tumorais no indivíduo.

MAPEAMENTO DE EPITOPO E TECNOLOGIAS RELACIONADAS

[0129] O epitopo em CD28 e/ou MUC16 ao qual as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção se ligam pode consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos de uma proteína de CD28 ou MUC16. Alternativamente, o epitopo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos) de CD28 ou MUC16. Os anticorpos da invenção podem interagir com aminoácidos contidos dentro de um monômero de

CD28 ou podem interagir com aminoácidos em duas ou mais cadeias de CD28 diferentes de um dímero de CD28. O termo “epitopo”, como usado no presente documento, se refere a um determinante de antígeno que interage com um sítio de ligação ao antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátipo. Um único antígeno pode ter mais de um epitopo. Desse modo, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas de um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. Os epitopos podem ser conformacionais ou lineares. Um epitopo conformacional é produzido por aminoácidos espacialmente justapostos de diferentes segmentos da cadeia polipeptídica linear. Um epitopo linear é aquele produzido por resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica. Em certa circunstância, um epitopo pode incluir porções químicas de sacarídeos, grupos fosforila ou grupos sulfonila no antígeno.

[0130] Várias técnicas conhecidas por pessoas de habilidade comum na técnica podem ser usadas para determinar se um domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos" dentro de um polipeptídeo ou proteína. Técnicas exemplificativas que podem ser usadas para determinar um epitopo ou domínio de ligação de um determinado anticorpo ou domínio de ligação ao antígeno incluem, por exemplo, ensaio de bloqueio cruzado de rotina, como o descrito em Antibodies, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), mutagênese pontual (por exemplo, mutagênese de varredura de alanina, mutagênese de varredura de arginina, etc.), análise de manchas de peptídeo (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443 a 463), proteção de protease e análise de clivagem de peptídeo. Adicionalmente, podem ser empregados métodos, como excisão de epitopos, extração de epitopo e modificação química de antígenos (Tomer (2000) *Protein Science* 9:487-496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual

um anticorpo interage é troca de hidrogênio/deutério detectado por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de troca de hidrogênio/deutério envolve o etiquetamento com deutério da proteína de interesse, seguido pela ligação do anticorpo à proteína etiquetada com deutério. Em seguida, o complexo proteína/anticorpo é transferido para água para permitir que a troca de hidrogênio-deutério ocorra em todos os resíduos, exceto para os resíduos protegidos pelo anticorpo (que permanecem etiquetados com deutério). Após a dissociação do anticorpo, a proteína alvo é submetida à análise de clivagem de protease e espectrometria de massa, revelando, assim, os resíduos etiquetados com deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais o anticorpo interage. Consultar, por exemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2): 252 a 259; Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. A análise da estrutura de cristal de raios X também pode ser usada para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um anticorpo interage.

[0131] A presente invenção inclui adicionalmente anticorpos anti-CD28 e anti-MUC16 que se ligam ao mesmo epitopo que qualquer um dentre os anticorpos exemplificativos específicos descritos no presente documento (por exemplo, anticorpos que compreendem qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos, como apresentado nas **Tabelas 1 e 3** no presente documento). De modo similar, a presente invenção também inclui anticorpos anti-CD28 e/ou anti-MUC16 que competem pela ligação a CD28 e/ou MUC16 com qualquer um dentre os anticorpos exemplificativos específicos descritos no presente documento (por exemplo, anticorpos que compreendem qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos como apresentado na **Tabela 1** no presente documento).

[0132] A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao

antígeno biespecíficas que compreendem um primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 humano e um segundo fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 humano, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno se liga ao mesmo epitopo no CD28 que qualquer um dentre os domínios de ligação ao antígeno específico de CD28 exemplificativos específicos descritos no presente documento, e/ou em que o segundo domínio de ligação ao antígeno se liga ao mesmo epitopo em MUC16 que qualquer um dentre os domínios de ligação ao antígeno específico de MUC16 exemplificativos específicos descritos no presente documento.

[0133] De modo similar, a presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que compreendem um primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 humano, e um segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 humana, em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD28 com qualquer um dentre os domínios de ligação ao antígeno específico de CD28 exemplificativos específicos descritos no presente documento, e/ou em que o segundo domínio de ligação ao antígeno compete pela ligação a MUC16 com qualquer um dentre os domínios de ligação ao antígeno específico de MUC16 exemplificativos específicos descritos no presente documento.

[0134] É facilmente possível determinar se uma molécula particular de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpo) ou domínio de ligação ao antígeno da mesma se liga ao mesmo epitopo que, ou compete pela ligação com, uma molécula de ligação ao antígeno de referência da presente invenção usando-se métodos de rotina conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epitopo na CD28 (ou MUC16) que uma molécula de ligação ao antígeno

biespecífica de referência da presente invenção, a molécula biespecífica de referência primeiro pode se ligar a uma proteína de CD28 (ou proteína de MUC16). Em seguida, a habilidade de um anticorpo de teste para se ligar à molécula de CD28 (ou MUC16) é avaliada. Se o anticorpo de teste puder se ligar a CD28 (ou MUC16) após a ligação de saturação com a molécula de ligação ao antígeno biespecífica de referência, pode ser concluído que o anticorpo de teste se liga a um epitopo diferente de CD28 (ou MUC16) do que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica de referência. Por outro lado, se o anticorpo de teste não puder se ligar à molécula de CD28 (ou MUC16) após a ligação de saturação com a molécula de ligação ao antígeno biespecífica de referência, então o anticorpo de teste pode se ligar ao mesmo epitopo de CD28 (ou MUC16) que o epitopo ligado pela molécula de ligação ao antígeno biespecífica de referência da invenção. A experimentação de rotina adicional (por exemplo, as análises de mutação e ligação de peptídeo) pode, então, ser executada para confirmar se a falta observada de ligação do anticorpo de teste se deve, de fato, à ligação ao mesmo epitopo que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica de referência ou se o bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável pela falta de ligação observada. Os experimentos desse tipo podem ser realizados com o uso de ELISA, RIA, Biacore, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio de ligação a anticorpo quantitativo ou qualitativo na técnica. De acordo com certas modalidades da presente invenção, duas proteínas de ligação ao antígeno se ligam ao mesmo epitopo (ou se sobrepõem) se, por exemplo, 1-, 5-, 10-, 20- ou 100 dobras de uma proteína de ligação ao anticorpo inibirem a ligação do outro em pelo menos 50%, mas, preferencialmente, 75%, 90% ou até mesmo 99%, conforme medido em um teste de ligação competitivo (consulte, por exemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Alternativamente, duas proteínas de ligação ao antígeno são consideradas como se ligando ao mesmo epitopo se

essencialmente todas as mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de uma proteína de ligação ao antígeno reduzirem ou eliminarem a ligação do outro. Considera-se que duas proteínas de ligação ao antígeno tenham "epitopos sobrepostos" se apenas um subconjunto das mutações de aminoácido que reduz ou elimina a ligação de uma proteína de ligação ao antígeno reduz ou elimina a ligação da outra.

[0135] Para determinar se um anticorpo ou domínio de ligação ao antígeno do mesmo compete pela ligação com uma molécula de ligação ao antígeno de referência, a metodologia de ligação descrita acima é realizada em duas orientações: Em uma primeira orientação, a molécula de ligação ao antígeno de referência pode se ligar a uma proteína de CD28 (ou proteína de MUC16) sob condições de saturação seguidas pela avaliação da ligação do anticorpo de teste à molécula de CD28 (ou MUC16). Em uma segunda orientação, o anticorpo de teste pode se ligar a uma molécula de CD28 (ou MUC16) sob condições de saturação seguidas pela avaliação da ligação da molécula de ligação ao antígeno de referência à molécula de CD28 (ou MUC16). Se, em ambas as orientações, apenas a primeira molécula de ligação ao antígeno (de saturação) for capaz de ligação à molécula de CD28 (ou MUC16), então, é concluído que o anticorpo de teste e a molécula de ligação ao antígeno de referência competem pela ligação a CD28 (ou MUC16). Como será observado por uma pessoa de habilidade comum na técnica, um anticorpo que compete pela ligação com uma molécula de ligação ao antígeno de referência por não se ligar necessariamente ao mesmo epitopo que o anticorpo de referência, porém, pode bloquear estericamente a ligação do anticorpo de referência através da ligação de um epitopo sobreposto ou adjacente.

PREPARAÇÃO DE DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO E CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS

[0136] Os domínios de ligação ao antígeno específicos para antígenos particulares podem ser preparados por qualquer tecnologia geradora de anticorpo conhecida na técnica. Uma vez obtidos, dois domínios de ligação ao antígeno diferentes, específicos para dois antígenos diferentes (por exemplo, CD28 e MUC16), podem ser adequadamente dispostos um em relação ao outro para produzir uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica da presente invenção com o uso de métodos de rotina. (Uma discussão de formatos de anticorpo biespecífico exemplificativos que podem ser usados para construir as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção é fornecida em outra parte no presente documento). Em certas modalidades, um ou mais dos componentes individuais (por exemplo, cadeias pesadas e leves) das moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas da invenção são derivados de anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos. Os métodos para produzir tais anticorpos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, uma ou mais dentre as cadeias pesadas e/ou leves das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas com o uso de tecnologia VELOCIMMUNE™. Com o uso da tecnologia VELOCIMMUNE™ (ou qualquer outra tecnologia geradora de anticorpo humano), anticorpos quiméricos de alta afinidade a um antígeno particular (por exemplo, CD28 ou MUC16) são inicialmente isolados, tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Os anticorpos são caracterizados e selecionados por características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, epitopo, etc. As regiões constantes de camundongo são substituídas por uma região constante humana desejada para gerar cadeias pesadas e/ou leves totalmente humanas que podem ser incorporadas nas moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção.

[0137] Os animais geneticamente modificados podem ser usados

para produzir moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas humano. Por exemplo, um camundongo geneticamente modificado pode ser usado, o qual não tem capacidade de rearranjar e expressar uma sequência variável de cadeia leve de imunoglobulina de camundongo endógena, em que o camundongo expressa apenas um ou dois domínios variáveis de cadeia leve humana codificados por sequências de imunoglobulina humanas operacionalmente aglutinadas ao gene constante tipo kapa de camundongo no locus kapa de camundongo endógeno. Tais camundongos geneticamente modificados podem ser usados para produzir moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas totalmente humanas que compreendem duas cadeias pesadas diferentes que se associam a uma cadeia leve idêntica que compreende um domínio variável derivado de um dentre dois segmentos de gene diferentes de região variável de cadeia leve humana. (Consulte, por exemplo, o documento U.S. 2011/0195454 para uma discussão detalhada de tais camundongos geneticamente modificados e uso dos mesmos para produzir moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas).

BIOEQUIVALENTES

[0138] A presente invenção abrange moléculas de ligação ao antígeno que têm sequências de aminoácidos que variam daquelas dos anticorpos exemplificativos descritos, mas que têm a capacidade de se ligar ao CD28 e/ou MUC16. Tais moléculas variantes podem compreender uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos em comparação com a sequência parental, mas exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente àquela das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas descritas. Do mesmo modo, as sequências de DNA de codificação de moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção abrangem sequências que compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de nucleotídeos em comparação com a

sequência revelada, mas que codificam uma molécula de ligação ao antígeno que é essencialmente bioequivalente às moléculas de ligação ao antígeno descritas da invenção. Exemplos dessas sequências de aminoácidos e DNA variantes são discutidos acima.

[0139] A presente invenção inclui moléculas de ligação ao antígeno que são bioequivalentes a qualquer uma dentre as moléculas de ligação ao antígeno exemplificativas apresentadas no presente documento. Duas proteínas de ligação ao antígeno, ou anticorpos são considerados bioequivalentes se, por exemplo, forem equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e extensão de absorção não mostram uma diferença significativa quando administradas à mesma dose molar sob condições experimentais similares, tanto doses únicas quanto múltiplas doses. Alguns anticorpos serão considerados equivalentes ou alternativas farmacêuticas se forem equivalentes na extensão da sua absorção, porém não na taxa de absorção dos mesmos e ainda podem ser considerados bioequivalentes devido ao fato de que tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na marcação, não são essenciais para a obtenção de concentrações eficazes de fármaco no corpo, por exemplo, uso crônico e são considerados medicamente insignificantes para o produto farmacológico particular estudado.

[0140] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se não houver diferenças clinicamente significativas em sua segurança, pureza e potência.

[0141] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se um paciente puder alternar uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma alteração clinicamente significativa na imunogenicidade ou eficácia reduzida, em comparação com a terapia continuada sem tal alteração.

[0142] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno

são bioequivalentes se ambas atuarem por um mecanismo ou mecanismos comuns de ação para a condição ou condições de uso, ao ponto em que tais mecanismos são conhecidos.

[0143] A bioequivalência pode ser demonstrada por métodos *in vivo* e *in vitro*. As medidas de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, em que a concentração do anticorpo ou dos seus metabolitos é medida no sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico em função de tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado com dados de biodisponibilidade *in vivo* em seres humanos e é razoavelmente preditivo dos mesmos; (c) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, sendo que o efeito farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou do alvo do mesmo) é medido em função do tempo; e (d) em um ensaio clínico bem controlado que estabeleça segurança, eficácia ou biodisponibilidade ou bioequivalência de um anticorpo.

[0144] As variantes bioequivalentes das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas exemplificativas apresentadas no presente documento podem ser construídas, por exemplo, produzindo-se várias substituições de resíduos ou sequências ou deletando-se resíduos terminais ou internos ou sequências não necessárias para a atividade biológica. Por exemplo, os resíduos de cisteína não essenciais para atividade biológica podem ser deletados ou substituídos por outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes de dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas mediante a renaturação. Em outros contextos, os anticorpos bioequivalentes podem incluir as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas exemplificativas apresentadas no presente documento que compreendem alterações de aminoácidos que modificam as características de glicosilação dos anticorpos, por exemplo, mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

SELETIVIDADE DE ESPÉCIE E REATIVIDADE CRUZADA DE ESPÉCIES

[0145] A presente invenção, de acordo com certas modalidades, fornece moléculas de ligação ao antígeno que se ligam ao CD28 humano, mas não ao CD28 de outras espécies. A presente invenção, de acordo com certas modalidades, fornece moléculas de ligação ao antígeno que se ligam a MUC16 humano, mas não a MUC16 de outras espécies. A presente invenção também inclui moléculas de ligação ao antígeno que se ligam a CD28 humano e a CD28 de uma ou mais espécies não humanas; e/ou moléculas de ligação ao antígeno que se ligam a MUC16 humano ou a MUC16 de uma ou mais espécies não humanas.

[0146] De acordo com certas modalidades exemplificativas da invenção, as moléculas de ligação ao antígeno são fornecidas, as quais se ligam ao CD28 humano e/ou MUC16 humano e pode se ligar ou não se ligar, de acordo com o caso, a um ou mais dentre CD28 e/ou MUC16 de camundongo, rato, porquinho-da-índia, criceto, gerbilo, porco, gato, cachorro, coelho, cabra, ovelha, vaca, cavalo, camelo, cynomolgus, mico, macaco rhesus ou chimpanzé. Por exemplo, em uma modalidade exemplificativa particular da presente invenção, são fornecidas das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas compreendendo um primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga ao CD28 humano e CD28 cynomolgus, e um segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 humano.

IMUNOCONJUGADOS

[0147] A presente invenção abrange moléculas de ligação ao antígeno conjugadas a uma porção química terapêutica ("imunoconjugado"), como uma citotoxina, um fármaco quimioterapêutico, um imunossupressor ou um radioisótopo. Os agentes citotóxicos incluem qualquer agente que seja prejudicial às células. Os exemplos de agentes

citotóxicos e agentes quimioterapêuticos adequados para formar imunocombinados são conhecidos na técnica; consulte, por exemplo, o documento WO 05/103081.

FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO TERAPÊUTICA

[0148] A presente invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção. As composições farmacêuticas da invenção são formuladas com veículos, excipientes e outros agentes que fornecem transferência, entrega, tolerância e similares aprimorados. Uma multiplicidade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido por todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Essas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geleias, ceras, óleos, lipídios, vesículas que contêm lipídios (catiônicos ou aniônicos) (como LIPOFECTIN™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões de óleo em água e água óleo, emulsões de carbocera (polietileno-glicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas que contêm carbocera. Ver também Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0149] A dose de molécula de ligação ao antígeno administrada a um paciente pode variar dependendo da idade e do tamanho do paciente, da doença alvo, das afecções, da via de administração e similares. A dose preferencial é tipicamente calculada de acordo com o peso corporal ou a área de superfície corporal. Quando uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica da presente invenção é usada para fins terapêuticos em um paciente adulto, pode ser vantajoso administrar por via intravenosa a molécula de ligação ao antígeno biespecífica da presente invenção normalmente em uma dose única de cerca de 0,01 a cerca de 20 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente, cerca de 0,02 a

cerca de 7, cerca de 0,03 a cerca de 5, ou cerca de 0,05 a cerca de 3 mg/kg de peso corporal. Dependendo da gravidade da afecção, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustadas. As dosagens e horários eficazes para a administração de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica podem ser determinados empiricamente; por exemplo, o progresso do paciente pode ser monitorado por avaliação periódica e a dose ajustada em conformidade. Além disso, o escalonamento interespecíficas de dosagens pode ser realizado com o uso de métodos bem conhecidos na técnica (por exemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[0150] Vários sistemas de entrega são conhecidos e podem ser usados para administrar a composição farmacêutica da invenção, por exemplo, encapsulamento em lipossomos, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes com capacidade de expressar os vírus mutantes, a endocitose mediada por receptor (consulte, por exemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Os métodos de introdução incluem, mas sem limitações, vias intradérmicas, intramusculares, intraperitoneais, intravenosas, subcutâneas, intranasais, epidurais e orais. A composição pode ser administrada por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou bolo de injeção, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal etc.) e pode ser administrada junto de outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local.

[0151] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser entregue de modo subcutâneo ou intravenoso com uma seringa ou agulha padrão. Além disso, em relação à entrega subcutânea, um dispositivo de entrega por caneta prontamente tem aplicações na entrega de uma composição farmacêutica da presente invenção. Tal dispositivo de entrega por caneta pode ser reutilizável ou descartável. Um dispositivo de entrega por caneta reutilizável geralmente utiliza um cartucho

substituível que contém uma composição farmacêutica. Uma vez que toda a composição farmacêutica dentro do cartucho tenha sido administrada, e o cartucho esteja vazio, o cartucho vazio pode ser facilmente descartado e substituído por um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de entrega por caneta pode ser reusado. Em um dispositivo de entrega por caneta descartável, não há cartucho substituível. Pelo contrário, o dispositivo de entrega por caneta descartável vem pré-carregado com a composição farmacêutica mantida em um reservatório dentro do dispositivo. Uma vez que o reservatório é esvaziado da composição farmacêutica, todo o dispositivo é descartado.

[0152] Inúmeros dispositivos de entrega de caneta e de autoinjeter reutilizáveis têm aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Os exemplos incluem, mas sem limitações, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suíça), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta HUMALOG™, caneta HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, e OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha), apenas para nomear alguns. Os exemplos de dispositivos de entrega por caneta descartáveis que têm aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, mas sem limitações, a caneta SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), a FLEXPEN™ (Novo Nordisk) e a KWIKPEN™ (Eli Lilly), o Autoinjeter SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), a PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemanha), a EPIPEN (Dey, L.P.) e a Caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), para mencionar apenas alguns.

[0153] Em certas situações, a composição farmacêutica pode ser

entregue em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada (consulte Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Em outra modalidade, os materiais poliméricos podem ser usados; consultar, Medical Applications of Controlled Release, Langer e Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado próximo ao alvo da composição, exigindo, assim, apenas uma fração da dose sistêmica (consulte, por exemplo, Goodson, 1984, em Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 a 138). Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[0154] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosas, subcutâneas, intracutâneas e intramusculares, infusões em gotas, etc. Essas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos publicamente conhecidos. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, dissolvendo-se suspendendo-se ou emulsificando-se o anticorpo ou o sal do mesmo descrito acima em um meio aquoso estéril ou em um meio oleoso convencionalmente usados para injeções. Como o meio aquoso para injeções, há, por exemplo, solução salina fisiológica, uma solução isotônica que contém glicose e outros agentes auxiliares etc., que podem ser usados em combinação com um agente de solubilização apropriado, tal como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, propilenoglicol, polietilenoglicol), um tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) aduto de óleo de rícino hidrogenado)] etc. Como meio oleoso, são empregados, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de soja etc., que pode ser usado em combinação com um agente solubilizante tal como benzoato de benzila, álcool benzílico etc. A injeção assim preparada é, preferencialmente, preenchida em uma ampola apropriada.

[0155] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para uso oral ou parenteral descritas acima são preparadas em formas de dosagens em uma dose unitária adequada para ajustar uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagens em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios etc. A quantidade do anticorpo contido é geralmente de cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente na forma de injeção, é preferencial que o anticorpo esteja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para as outras formas de dosagens.

USOS TERAPÊUTICOS DAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO

[0156] A presente invenção inclui métodos que compreendem administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma composição terapêutica que compreende um anticorpo anti-CD28 ou molécula de ligação ao antígeno biespecífica que se liga especificamente a CD28 e um antígeno alvo (por exemplo, MUC16). A composição terapêutica pode compreender qualquer um dentre os anticorpos ou moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas como revelado no presente documento e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável. Como usado no presente documento, a expressão "um indivíduo que precisa do mesmo" significa um ser humano ou animal não humano que exibe um ou mais sintomas ou indicações de câncer (por exemplo, um indivíduo que expressa um tumor ou que sofre com qualquer um dentre os cânceres mencionados no presente documento abaixo), ou que, de outro modo, se beneficiaria de uma inibição ou redução na atividade de MUC16 ou um esgotamento de células de MUC16+.

[0157] Os anticorpos e moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da invenção (e composições terapêuticas que compreendem os

mesmos) são úteis, entre outros, para tratar qualquer doença ou distúrbio em que o estímulo, ativação e/ou alvejamento de uma resposta imunológica será benéfico. Em particular, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas anti-CD28/anti-MUC16 da presente invenção podem ser usadas para o tratamento, prevenção e/ou melhora de qualquer doença ou distúrbio associado a ou mediado por expressão ou atividade de MUC16 ou a proliferação de células de MUC16+. O mecanismo de ação pelo qual os métodos terapêuticos da invenção são alcançados inclui extermínio das células que expressam MUC16 na presença de células efectoras, por exemplo, células T. As células que expressam MUC16 que podem ser inibidas ou exterminadas com o uso das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da invenção incluem, por exemplo, células de câncer de ovário.

[0158] As moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção podem ser usadas para tratar, por exemplo, tumores primários e/ou metastáticos que surgem no cólon, pulmão, mama, câncer renal e subtipos de câncer de bexiga. De acordo com certas modalidades exemplificativas, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção são usadas para tratar um câncer de ovário.

[0159] A presente invenção também inclui métodos para tratar câncer residual em um indivíduo. Como usado no presente documento, o termo "câncer residual" significa que a existência ou persistência de uma ou mais células cancerígenas em um indivíduo após o tratamento com uma terapia anticâncer.

[0160] De acordo com certos aspectos, a presente invenção fornece métodos para tratar uma doença ou distúrbio associado à expressão de MUC16 (por exemplo, MUC16 que expressa câncer, tal como câncer de ovário) que compreende administrar uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas descritas em outro local no presente

documento a um indivíduo após o indivíduo ter se mostrado não responsivo a outros tipos de terapias contra o câncer. Por exemplo, a presente invenção inclui métodos para tratar o câncer de ovário que compreendem administrar uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16 a um paciente em 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 ano ou mais após o indivíduo ter recebido o padrão de cuidados para pacientes que sofrem de câncer, por exemplo, câncer de ovário. Em outros aspectos, uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica da invenção (uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16) que compreende um domínio de Fc de IgG4 é inicialmente administrado a um indivíduo em um ou mais pontos de tempo (por exemplo, para fornecer depleção inicial robusta de células cancerígenas de próstata), seguido pela administração de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica equivalente que compreende um domínio de IgG diferente, como um domínio de Fc de IgG1, em pontos de tempo subsequentes. É previsto que os anticorpos anti-CD28/anti-MUC16 da invenção podem ser usados em combinação com outras moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas, como com um anticorpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. Também é previsto que os anticorpos biespecíficos da invenção serão usados em combinação com inibidores de via de sinalização, por exemplo, aqueles que têm como alvo PD-1 e CTLA-4, e outros alvos. Pode ser vantajoso combinar dois anticorpos biespecíficos que têm como alvo o mesmo antígeno tumoral (por exemplo, MUC16), mas com um dos biespecíficos tendo como alvo o CD3 em células T e o outro biespecífico tendo como alvo uma molécula coestimuladora, como CD28. Essa combinação pode ser usada sozinha para aumentar a morte de células tumorais ou pode ser usada em combinação com um inibidor de via de sinalização.

[0161] Cânceres que expressam MUC16 exemplificativos incluem,

porém sem limitação, câncer de ovário, câncer de mama, câncer de endométrio, câncer de pâncreas, câncer de pulmão de células não pequenas, colangiocarcinoma intra-hepático do tipo formador de massa, adenocarcinoma do colo uterino e adenocarcinoma do trato gástrico.

TERAPIAS E FORMULAÇÕES DE COMBINAÇÃO

[0162] A presente invenção inclui composições e formulações terapêuticas que compreendem qualquer um dos anticorpos exemplificativos e moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas descritas no presente documento em combinação com um ou mais componentes terapeuticamente ativos adicionais e métodos de tratamento que compreendem a administração de tais combinações a indivíduos que necessitam dos mesmos.

[0163] Os agentes terapêuticos adicionais exemplificativos que podem ser combinados ou administrados em combinação com uma molécula de ligação ao antígeno da presente invenção incluem, por exemplo, quimioterapia, radioterapia, inibidores de via de sinalização que têm como alvo PD-1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-1, como pembrolizumabe, nivolumabe e cemiplimabe (consultar o documento U.S. 9.987.500), CTLA-4, LAG3, TIM3 e outros, anticorpos bivalentes agonistas coestimuladores que têm como alvo moléculas, como GITR, OX40, 4-1BB e outros), anticorpos biespecíficos CD3x (consultar, por exemplo, os documentos WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 e WO2018/058001A1), outros anticorpos que têm como alvo MUC16 X CD3 (consultar, por exemplo, o documento WO2017/053856A1) e outros anticorpos biespecíficos CD28 coestimuladores.

[0164] Outros agentes que podem ser administrados de forma benéfica em combinação com anticorpos da invenção incluem, por exemplo, tamoxifeno, inibidores de aromatase e inibidores de citocinas, incluindo inibidores de citocinas de pequenas moléculas e anticorpos que se

ligam a citocinas, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 ou para seus respectivos receptores. As composições farmacêuticas da presente invenção (por exemplo, composições farmacêuticas que compreendem uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica anti-CD28/anti-MUC16, como revelado no presente documento) também podem ser administradas como parte de um regime terapêutico que compreende uma ou mais combinações terapêuticas selecionadas a partir de "ICE": ifosfamida (por exemplo, Ifex®), carboplatina (por exemplo, Paraplatin®), etoposídeo (por exemplo, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": dexametasona (por exemplo, Decadron®), citarabina (por exemplo, Cytosar-U®, citosina arabinoside, ara-C), cisplatina (por exemplo, Platinol®-AQ); e "ESHAP": etoposídeo (por exemplo, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), metilprednisolona (por exemplo, Medrol®), citarabina de alta dose, cisplatina (por exemplo, Platinol®-AQ).

[0165] A presente invenção também inclui combinações terapêuticas que compreendem qualquer uma dentre as moléculas de ligação ao antígeno mencionadas no presente documento e um inibidor de um ou mais dentre VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplaquina, ou qualquer uma das citocinas supracitadas, em que o inibidor é um aptâmero, uma molécula antissenso, uma ribozima, um siRNA, um peptídeo, um nanocorpo ou um fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de Fab; fragmento de F(ab')₂; fragmento de Fd; fragmento de Fv; scFv; fragmento de dAb; ou outras moléculas geneticamente modificadas, como diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos e unidades de reconhecimento mínimo). As moléculas de ligação ao antígeno da invenção também podem ser administradas e/ou coformuladas em combinação com antivirais, antibióticos, analgésicos, corticosteroides e/ou NSAIDs. As moléculas de

ligação ao antígeno da invenção também podem ser administradas como parte de um regime de tratamento que também inclui tratamento de radiação e/ou quimioterapia convencional, ou tratamento com um biológico, incluindo inibidores de via de sinalização ou outros anticorpos biespecíficos.

[0166] A presente invenção inclui composições e formulações terapêuticas que compreendem qualquer uma das moléculas de ligação ao antígeno descritas no presente documento em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes, como tiotepa e ciclosfosfamida (CytosanTM); sulfonatos de alquila, como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; mostardas de nitrogênio, como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureias, como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabólitos, como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, como fludarabina, 6-mer-

captipurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais, como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforçador de ácido fólico, como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantrene; edatratrato; defofamina; demecolcine; diaziquone; elfornitina; acetato de eliptínio; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxioureia; lentinan; lonidamina; mitoguazone; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenameto; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; PSK™; razoxano; sizofiran; spirogermanium; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesine; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por exemplo, paclitaxel (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) e docetaxel (Taxotere™; Aventis Antony, França); clorambucil; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptipurina; metotrexato; análogos de platina, como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrone; teniposide; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos citados acima. Também incluídos nesta definição estão os agentes anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação hormonal em tumores, como antiestrogênicos, incluindo, por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, inibição da aromatase 4(5)-imidazóis, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona e toremifeno (Fareston); e anti-andrógenos, como flutamida, nilutamida,

bicalutamida, leuprolida e goserelina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos citados acima.

[0167] O componente (ou componentes) terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado imediatamente antes de, simultaneamente com ou logo após a administração de uma molécula de ligação ao antígeno da presente invenção; (para propósitos da presente divulgação, tais regimes de administração são considerados a administração de uma molécula de ligação ao antígeno “em combinação com” um componente terapeuticamente ativo adicional).

[0168] A presente invenção inclui composições farmacêuticas em que uma molécula de ligação ao antígeno da presente invenção é co-formulada com um ou mais componentes terapeuticamente ativos adicionais como descrito em outra parte no presente documento.

REGIMES DE ADMINISTRAÇÃO

[0169] De acordo com certas modalidades da presente invenção, múltiplas doses de uma molécula de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo anti-CD28 ou uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica que se liga especificamente a MUC16 e CD28) podem ser administradas a um indivíduo ao longo de um curso de tempo definido. Os métodos de acordo com o presente aspecto da invenção compreendem administrar sequencialmente a um indivíduo múltiplas doses de uma molécula de ligação ao antígeno da invenção. Conforme usado no presente documento, "administrar sequencialmente" significa que cada dose uma molécula de ligação ao antígeno é administrada ao indivíduo em um ponto no tempo diferente, por exemplo, em dias diferentes separados por um intervalo predeterminado (por exemplo, horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui métodos que compreendem administrar sequencialmente ao paciente uma única dose inicial de uma molécula de ligação ao antígeno, seguida por uma ou mais doses

secundárias da molécula de ligação ao antígeno, e opcionalmente seguido por uma ou mais doses terciárias da molécula de ligação ao antígeno.

[0170] Os termos "dose inicial", "doses secundárias" e "doses terciárias", se referem à sequência temporal de administração da molécula de ligação ao antígeno da invenção. Portanto, a "dose inicial" é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também chamada de uma "dose de linha de base"); as "doses secundárias" são as doses que são administradas após a dose inicial; e as "doses terciárias" são as doses que são administradas após as doses secundárias. As doses inicial, secundária e terciária podem todas conter a mesma quantidade de molécula de ligação ao antígeno, mas, geralmente, podem ser diferentes entre si em termos de frequência de administração. No entanto, em determinadas modalidades, a quantidade de uma molécula de ligação ao antígeno contida nas doses inicial, secundária e/ou terciária varia entre si (por exemplo, ajustada de maneira ascendente ou descendente, conforme apropriado) durante o curso do tratamento. Em certas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4 ou 5) doses são administradas no início do regime de tratamento como "doses de carregamento" seguidas por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente (por exemplo, "doses de manutenção").

[0171] Em uma modalidade exemplificativa da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada de 1 a 26 (por exemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ ou mais) semanas após a dose imediatamente anterior. A frase "a dose imediatamente anterior", como usada no presente documento, significa, em uma sequência de múltiplas administrações, a

dose de molécula de ligação ao antígeno que é administrada a um paciente antes da administração da dose imediatamente a seguir, em sequência sem doses de intervenção.

[0172] Os métodos de acordo com esse aspecto da invenção podem compreender administrar a um paciente qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de uma molécula de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo anti-CD28 ou uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica que se liga especificamente a MUC16 e CD28). Por exemplo, em certas modalidades, apenas uma única dose secundária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais doses secundárias (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) são administradas ao paciente. Do mesmo modo, em determinadas modalidades, apenas uma única dose terciária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) doses terciárias são administradas ao paciente.

[0173] Em modalidades que envolvem múltiplas doses secundárias, cada dose secundária pode ser administrada com a mesma frequência que as outras doses secundárias. Por exemplo, cada dose secundária pode ser administrada ao paciente 1 a 2 semanas após a dose imediatamente anterior. Da mesma forma, em modalidades envolvendo múltiplas doses terciárias, cada dose terciária pode ser administrada na mesma frequência que as outras doses terciárias. Por exemplo, cada dose terciária pode ser administrada ao paciente 2 a 4 semanas após a dose imediatamente anterior. Alternativamente, a frequência com a qual as doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente pode variar ao longo do curso do regime de tratamento. A frequência de administração também pode ser ajustada durante o curso do tratamento por um médico, dependendo das necessidades do paciente individual após o exame clínico.

[0174] Em uma modalidade, a molécula de ligação ao antígeno (por

exemplo, uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica que se liga especificamente a MUC16 e CD28) é administrada a um indivíduo como uma dose baseada no peso. Uma "dose com base no peso" (por exemplo, uma dose em mg/kg) é uma dose do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou da molécula de ligação ao antígeno biespecífica que mudará dependendo do peso do indivíduo.

[0175] Em outra modalidade, um anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica é administrado a um indivíduo como uma dose fixa. Uma "dose fixa" (por exemplo, uma dose em mg) significa que uma dose do anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou a molécula de ligação ao antígeno biespecífica é usado para todos os indivíduos, independentemente de quaisquer fatores relacionados ao indivíduo específico, tais como peso. Em uma modalidade particular, uma dose fixa de um anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica da invenção é baseada em um peso ou idade predeterminados.

[0176] Em geral, uma dose adequada da molécula de ligação ao antígeno da invenção pode estar na faixa de cerca de 0,001 a cerca de 200,0 miligramas por quilograma de peso corporal do receptor, geralmente na faixa de cerca de 1 a 50 mg por quilograma de peso corporal. Por exemplo, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou a molécula de ligação ao antígeno biespecífica podem ser administrados em cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, cerca de 15 mg/kg, cerca de 20 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 30 mg/kg, cerca de 40 mg/kg, cerca de 50 mg/kg por dose única. Valores e faixas intermediários aos valores citados também se destinam a fazer parte desta invenção.

[0177] Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno da invenção é administrada como uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 2500 mg. Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno da invenção é administrada como uma dose fixa de cerca de 25 mg, cerca de 30 mg, cerca de 50 mg, cerca de 75 mg, cerca de 100 mg, cerca de 125 mg, cerca de 150 mg, cerca de 175 mg, 200 mg, cerca de 225 mg, cerca de 250 mg, cerca de 275 mg, cerca de 300 mg, cerca de 325 mg, cerca de 350 mg, cerca de 375 mg, cerca de 400 mg, cerca de 425 mg, cerca de 450 mg, cerca de 475 mg, cerca de 500 mg, cerca de 525 mg, cerca de 550 mg, cerca de 575 mg, cerca de 600 mg, cerca de 625 mg, cerca de 650 mg, cerca de 675 mg, cerca de 700 mg, cerca de 725 mg, cerca de 750 mg, cerca de 775 mg, cerca de 800 mg, cerca de 825 mg, cerca de 850 mg, cerca de 875 mg, cerca de 900 mg, cerca de 925 mg, cerca de 950 mg, cerca de 975 mg, cerca de 1000 mg, cerca de 1500 mg, cerca de 2000 mg ou cerca de 2500 mg. Valores e faixas intermediários aos valores citados também se destinam a fazer parte desta invenção.

USOS DE DIAGNÓSTICO DOS ANTICORPOS

[0178] Os anticorpos biespecíficos da presente invenção também podem ser usados para detectar e/ou medir CD28 ou MUC16, ou células que expressam CD28 ou MUC16 em uma amostra, por exemplo, para fins de diagnóstico. Por exemplo, um anticorpo anti-CD28 x MUC16, ou fragmento do mesmo, pode ser usado para diagnosticar uma afecção ou doença caracterizada por expressão aberrante (por exemplo, superexpressão, subexpressão, falta de expressão, etc.) de CD28 ou MUC16. Os ensaios de diagnóstico exemplificativos para CD28 ou MUC16 podem compreender, por exemplo, colocar uma amostra, obtida de um paciente, em contato com um anticorpo da invenção, em que o anticorpo é etiquetado com uma etiqueta detectável ou molécula repórter. Alternativamente, um anticorpo não etiquetado pode ser usado em

aplicações de diagnóstico em combinação com um anticorpo secundário que é, por si só, etiquetado de modo detectável. A etiqueta detectável ou molécula repórter pode ser um radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I ; uma porção química fluorescente ou quimioluminescente, como isotiocianato de fluoresceína ou rodamina; ou uma enzima, como alcalino fosfatase, beta-galactosidase, peroxidase de raiz forte ou luciferase. Os ensaios exemplificativos específicos que podem ser usados para detectar ou medir CD28 ou MUC16 em uma amostra incluem ensaio imunoabsorvente aglutinado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e separação celular ativada por fluorescência (FACS). As amostras que podem ser usadas em ensaios de diagnóstico de CD28 ou MUC16 de acordo com a presente invenção incluem qualquer tecido ou amostra de fluido obtível a partir de um paciente que contém quantidades detectáveis de proteína de CD28 ou MUC16, ou fragmentos da mesma, sob condições normais ou patológicas. Em geral, os níveis de CD28 ou MUC16 em uma amostra particular obtida a partir de um paciente saudável (por exemplo, um paciente não afetado por uma doença ou afecção associada aos níveis ou atividade anormal de CD28 ou MUC16) serão medidos para estabelecer inicialmente um nível de linha de base, ou padrão, de CD28 ou MUC16. Esse nível de linha de base de CD28 ou MUC16, então, pode ser comparado com os níveis de CD28 ou MUC16 medidos em amostras obtidas a partir de indivíduos com suspeita de terem uma doença ou afecção relacionada a CD28 ou MUC16.

EXEMPLOS

[0179] Os seguintes exemplos são apresentados de modo a fornecer àqueles versados na técnica uma divulgação e descrição completas de como produzir e usar os métodos e composições da invenção, e não se destinam a limitar o escopo daquilo que os inventores consideram sua invenção. Foram realizados esforços para assegurar a precisão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura,

etc.), porém, alguns erros e desvios experimentais devem ser considerados. Exceto se indicado de outro modo, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura é em graus Centígrados e a pressão é à pressão atmosférica ou próxima à mesma.

ANTECEDENTES

[0180] A ativação das células T é iniciada após a ligação do complexo receptor de células T (TCR)/CD3 a complexos de peptídeo-MHC ("sinal 1"); a ativação é, então, aumentada pelo envolvimento de um segundo receptor "coestimulador", como o receptor CD28 nas células T que se ligam ao seu ligante (ou ligantes) cognato na célula alvo ("sinal 2"). "Anticorpos biespecíficos" à base de CD3 recentemente descritos atuam substituindo o sinal convencional 1, aglutinando células T a células tumorais por meio da ligação de um antígeno específico de tumor (TSA) com um braço do anticorpo biespecífico e fazendo a ponte para TCR/CD3 com o outro. Embora alguns desses chamados biespecíficos TSAxCD3 tenham demonstrado eficácia antitumoral promissora em pacientes com câncer, sua atividade ainda precisa ser otimizada. Conforme descrito em outro lugar neste documento, é introduzida na presente invenção uma nova classe de anticorpos biespecíficos que imitam o sinal 2, ligando um segundo TSA ao receptor coestimulador de CD28 em células T. Esses anticorpos biespecíficos foram denominados TSA-xCD28 biespecíficos. Conforme descrito neste documento, um anticorpo exemplificativo da presente invenção é específico para antígenos de câncer de ovário (por exemplo, MUC16). Ao contrário dos superagonistas CD28, que ativam amplamente as células T e, em certos casos, resultam em profunda toxicidade nos primeiros ensaios clínicos, esses biespecíficos TSAxCD28 mostram atividade limitada e nenhuma toxicidade quando usados sozinhos em modelos de camundongos imunocompetentes geneticamente humanizados ou em primatas. No en-

tanto, quando combinado com anticorpos biespecíficos TSAxCD3, o anticorpo exemplificativo da invenção aumentou a sinapse artificial entre uma célula T e sua célula alvo, potencializou a ativação de células T e melhorou marcadamente a atividade antitumoral de CD3-biespecíficos em uma variedade de modelos de tumor xenogênicos e singênicos. A combinação dessa nova classe de anticorpos biespecíficos coestimuladores de CD28 com a classe emergente de biespecíficos TSAxCD3 pode fornecer terapias de anticorpos "prontas para uso" bem toleradas com eficácia antitumoral potencialmente aumentada.

[0181] A capacidade das células T de reconhecer e matar seus alvos celulares - como células infectadas por vírus ou células tumorais - depende de um conjunto coordenado de interações. O mais importante entre os mesmos é o reconhecimento e a ligação da célula alvo pelo complexo TCR (que inclui as cadeias CD3 γ , δ , ϵ , ζ associadas); essa interação foi denominada como "sinal 1" para ativação de células T. O TCR pode reconhecer o peptídeo viral ou tumoral apresentado no sulco de uma proteína MHC expressa na superfície das células alvo. Essa ligação é tipicamente de baixa afinidade; portanto, para o desencadeamento bem-sucedido do sinal 1, é importante ter o agrupamento de muitos complexos de TCR ao longo da interface entre uma célula T e sua célula alvo, e essa interface foi denominada como a sinapse imunológica (J. B. Huppa, M. M. Davis, T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003)). A ativação e proliferação de células T são, então, promovidas por interações adicionais com receptores coestimuladores, como CD28 ("sinal 2") (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). Quando uma célula T reconhece uma célula alvo através do complexo TCR, e envolve o sinal 2 através da ligação de CD28 ao seu ligante (ou

ligantes) cognato (CD80/B7.1 e/ou CD86/B7.2) em uma célula que apresenta antígeno profissional ou a célula alvo, a ativação de células T é aumentada. Tal como acontece com o sinal 1, acredita-se que o sinal 2 mediado por CD28 ocorra via coagrupamento na sinapse imunológica.

[0182] Anticorpos monoclonais convencionais alvejados contra antígenos específicos de tumor (TSAs) têm sido usados como terapêutica antitumoral nas últimas duas décadas (G. Salles *et al.*, Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther* **34**, 2232-2273 (2017); M. V. Mateos *et al.*, Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med* **378**, 518-528 (2018); W. Eiermann, G. International Herceptin Study, Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trial data. *Ann Oncol* **12 Suppl 1**, S57-62 (2001); J. M. Connors *et al.*, Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* **378**, 331-344 (2018); V. Dieras *et al.*, Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**, 732-742 (2017)). No entanto, essa classe de anticorpos tinha capacidade limitada para induzir citotoxicidade mediada por células T e, em vez disso, agia promovendo citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ou entregando uma toxina às células tumorais. Recentemente, surgiu uma nova classe de anticorpos biespecíficos (TSAxCD3) que pode desencadear com eficiência a morte de células tumorais mediada por células T, aglutinando uma célula T a uma célula tumoral e ativando o complexo CD3/TCR (geralmente através da cadeia e de CD3) por meio de um mecanismo substituto, imitando, assim, o sinal 1. Uma versão inicial de tal biespecífico (um braço ligando-

se ao CD19 nas células de leucemia, enquanto o outro se liga ao CD3) recebeu recentemente aprovação regulatória para leucemia linfoblástica aguda de células B (R. Bargou *et al.*, Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody. *Science* **321**, 974-977 (2008); H. Kantarjian *et al.*, Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **376**, 836-847 (2017)). Recentemente, versões mais avançadas de biespecíficos mostraram ter boa atividade contra Linfomas não-Hodgkin, visando CD20 nesses linfomas (E. J. Smith *et al.*, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015); L. L. Sun *et al.*, Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Sci Transl Med* **7**, 287ra270 (2015); M. Bacac *et al.*, CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* **24**, 4785-4797 (2018); R. Bannerji *et al.*, Emerging Clinical Activity of REGN1979, an Anti-CD20 x Anti-CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma (FL), Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), and Other B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) Subtypes. *American Society of Hematology*, (2018); L. Budde *et al.*, Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study. *American Society of Hematology*, (2018)). No entanto, embora os biespecíficos TSAxCD3 estejam emergindo como uma nova classe importante de imunoterapia em doenças hematológicas, comparações entre estudos (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016)) sugerem que, em alguns casos, os mesmos podem não estar atingindo o nível de eficácia visto com

as terapias personalizadas de células T do receptor de antígeno quimérico (CAR-T).

[0183] Uma das razões para a forte eficácia das terapias CAR-T é que o receptor de antígeno quimérico (CAR) é geneticamente modificado para fornecer o sinal 1 (por meio de uma porção do citodomínio de CD3z) e o sinal 2 (por exemplo, via uma porção do citodomínio de CD28) ao se ligar ao seu alvo em uma célula tumoral. Duas terapias com células CAR-T receberam recentemente a aprovação da FDA para neoplasias de células B, ambas atuando ligando-se e tendo como alvo o antígeno CD19 (S. S. Neelapu *et al.*, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster *et al.*, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017)). As abordagens de células CAR-T podem ser associadas a efeitos adversos graves, como síndrome de liberação de citocinas (SRC) e neurotoxicidade (S. S. Neelapu *et al.*, Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 47-62 (2018); J. Gust *et al.*, Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov* **7**, 1404-1419 (2017); A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018)); e devido aos processos de fabricação altamente personalizados e à necessidade de regimes quimioterápicos de pré-condicionamento (S. S. Neelapu *et al.*, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster *et al.*, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017); P. Salmikangas, N. Kinsella, P. Chamberlain, Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CART-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for In-

dustry? *Pharm Res* **35**, 152 (2018)), muitos pacientes não são considerados candidatos adequados.

[0184] As vantagens dos biespecíficos TSAxCD3 como soluções terapêuticas relativamente bem toleradas e "disponíveis no mercado" para populações mais amplas de pacientes seriam aumentadas se sua atividade antitumoral pudesse ser otimizada ainda mais, especialmente se isso pudesse ser feito sem sacrificar a tolerabilidade, ou talvez até aumentar a especificidade para células tumorais em oposição às células normais. Para este fim, foi levantada a hipótese de que emparelhar biespecíficos TSAxCD3 com uma nova classe de biespecíficos que ativa independentemente o sinal 2 poderia fornecer potencial aumento de eficácia, bem como uma oportunidade para maior especificidade. Portanto, uma segunda classe de biespecíficos foi projetada. Esses biespecíficos podem envolver um segundo epitopo no mesmo antígeno específico de tumor ou um segundo antígeno tumoral separado, com o receptor coestimulador CD28 (TSAxCD28 Biespecífico) expressado em células T. Foi argumentado que a combinação de TSA1xCD3 com um TSA2xCD28 deve permitir a ativação indireta direcionada e intensificada de células T, alvejando-se o sinal 1 e o sinal 2, com especificidade alvejada apenas contra células tumorais que expressam ambos os epitopos ou ambos os antígenos, permitindo maior atividade antitumoral em combinação com uma oportunidade para maior especificidade.

[0185] São descritos aqui a geração e o teste de anticorpos biespecíficos coestimuladores TSAxCD28 direcionados ao câncer de ovário (MUC16xCD28, que se liga a MUC16, uma grande glicoproteína de membrana integral expressa em altos níveis em cânceres de ceratina (H. Suh, K. Pillai, D. L. Morris, Mucins in pancreatic cancer: biological role, implications in carcinogenesis and applications in diagnosis and therapy. *Am J Cancer Res* **7**, 1372-1383 (2017)), e que é clivada para liberar o biomarcador de tumor de ovário CA-125 (Immunohistochemical

expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Anticancer Res* **23**, 1075-1080 (2003)). Estudos de toxicologia em camundongos imunocompetentes geneticamente humanizados, bem como em macacos cynomolgus, demonstram que esses biespecíficos exibem atividade limitada e nenhuma toxicidade como agentes únicos. No entanto, esses novos biespecíficos coestimuladores podem ser combinados de forma eficaz com a classe emergente de biespecíficos TSAxCD3 para potencializar respostas antitumorais em modelos de tumor singênico. Coletivamente, esses dados sugerem que a combinação dessa nova classe de biespecíficos à base de CD28 (TSAxCD28) com os biespecíficos à base de CD3 (TSAxCD3) pode fornecer soluções biológicas bem toleradas "disponíveis no mercado" com atividade antitumoral marcadamente aprimorada e sinérgica.

EXEMPLO 1. CONSTRUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MUC16XCD28 GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD28

[0186] Os anticorpos anti-CD28 foram obtidos imunizando-se um camundongo VELOCIMMUNE® (por exemplo, um camundongo geneticamente modificado que compreende DNA que codifica regiões variáveis de cadeia pesada e leve kapa de imunoglobulina humana) com proteína de CD28 humano fundidas à porção de Fc de IgG2a de camundongo ou com células que expressam CD28 ou com DNA que codifica CD28. A resposta imune de anticorpo foi monitorada por um imunoenensaio específico de CD28. Quando uma resposta imune desejada foi alcançada, os esplenócitos foram colhidos e fundidos com células de mieloma de camundongos para preservar a sua viabilidade e formar linhagens celulares de hibridoma. As linhagens celulares de hibridoma foram triadas e selecionadas para identificar linhagens celulares que produzem anticorpos específicos de CD28. Com o uso dessa técnica, vários anticorpos quiméricos anti-CD28 (isto é, anticorpos que possuem domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongo) foram

obtidos. Além disso, vários anticorpos anti-CD28 totalmente humanos foram isolados diretamente das células B positivas para antígeno sem fusão às células de mieloma, como descrito no documento U.S. 2007/0280945A1.

[0187] Certas propriedades biológicas dos anticorpos exemplificativos anti-CD28 gerados de acordo com os métodos desse Exemplo são descritos em detalhes nos Exemplos apresentados abaixo.

GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MUC16

[0188] Os anticorpos anti-MUC16 foram obtidos imunizando-se um camundongo geneticamente modificado com um antígeno de MUC16 humana ou imunizando-se um camundongo modificado que compreende DNA que codifica regiões variáveis de cadeia leve kapa e pesada de imunoglobulina humana com um antígeno de MUC16 humana.

[0189] Os camundongos geneticamente modificados foram imunizados com hMUC16.nub (um formato truncado que engloba os últimos cinco domínios de SEA de Mucin-16 (SEQ ID: 49)), ou imunizados com uma linhagem celular que expressa hMUC16, como células tipo OVCAR-3. Após a imunização, os esplenócitos foram coletados a partir de cada camundongo e (1) fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar sua viabilidade e formaram células de hibridoma e examinados quanto à especificidade de MUC16, ou (2) classificados por célula B (como descrito no documento nº U.S. 2007/0280945A1) com o uso de um fragmento de MUC16 humana como o reagente de classificação que se liga e identifica os anticorpos reativos (células B positivas para antígeno).

[0190] Os anticorpos quiméricos para MUC16 foram inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Os anticorpos foram caracterizados e selecionados para as características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, etc. Se necessário, as regiões constantes de camundongo foram substituídas

por uma região constante humana desejada, por exemplo, região constante de IgG1 ou IgG4 de tipo selvagem ou modificada, para gerar um anticorpo anti-MUC16 totalmente humano. Embora a região constante selecionada possa variar de acordo com o uso específico, características de ligação a antígeno de alta afinidade e de especificidade-alvo permanecem na região variável.

[0191] Certas propriedades biológicas dos anticorpos exemplificativos anti-MUC16 gerados de acordo com os métodos desse Exemplo são descritos em detalhes nos Exemplos apresentados abaixo.

GERAÇÃO DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS QUE LIGAM CD28 E MUC16

[0192] Os anticorpos biespecíficos que compreendem um domínio de ligação específico anti-MUC16 e um domínio de ligação específico anti-CD28 foram construídos com o uso de metodologias-padrão, em que o domínio de ligação ao antígeno anti-MUC16 e o domínio de ligação ao antígeno anti-CD28, cada um, compreendem diferentes HCVRs distintas emparelhadas com uma LCVR comum. Em alguns casos, os anticorpos biespecíficos foram construídos utilizando uma cadeia pesada de um anticorpo anti-CD28, uma cadeia pesada de um anticorpo anti-MUC16 e uma cadeia leve comum (consultar a **Tabela 5**).

[0193] Os anticorpos biespecíficos criados de acordo com o presente Exemplo compreendem dois domínios separados de ligação ao antígeno (isto é, braços de ligação). O primeiro domínio de ligação ao antígeno compreende uma região variável da cadeia pesada derivada de um anticorpo anti-CD28 ("CD28-VH"), e o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende uma região variável da cadeia pesada derivada de um anticorpo anti-MUC16 ("MUC16-VH"). Tanto o anti-MUC16 quanto o anti-CD28 compartilham uma cadeia leve comum. O emparelhamento de CD28-VH/MUC16-VH cria domínios de ligação ao antígeno

que reconhecem especificamente CD28 em células T e MUC16 em células tumorais.

EXEMPLO 2. AMINOÁCIDOS DE REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA E LEVE E SEQUÊNCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

[0194] A **Tabela 1** apresenta os identificadores de sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-MUC16 selecionados da invenção. Os identificadores de sequência de ácido nucleico correspondentes são apresentados na **Tabela 2**.

TABELA 1: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DE ANTICORPOS MUC 16

Designação de Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb8799P2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb8794P2	26	28	30	32	34	36	38	40

TABELA 2: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DE ANTICORPOS MUC16

Designação de Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb8799P2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb8794P2	25	27	29	31	33	35	37	39

[0195] A **Tabela 3** apresenta os identificadores de sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-CD28 selecionados. Os identificadores de sequência de ácido nucleico correspondentes são apresentados na **Tabela 4**.

TABELA 3: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DE ANTICORPOS CD28

Designação de Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	18	20	22	24	10	12	14	16
mAb14216P2	42	44	46	48	34	36	38	40

TABELA 4: IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DE ANTICORPOS CD28

Designação de Anticorpo	SEQ ID NOS:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	17	19	21	23	9	11	13	15
mAb14216P2	41	43	45	47	33	35	37	39

[0196] Um sumário das partes componentes dos domínios de ligação ao antígeno dos vários anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD3 construídos é apresentado na **Tabela 5**. As **Tabelas 6 e 7** listam o HCVR, LCVR, CDRs e identificadores de sequência da cadeia pesada e da cadeia leve dos anticorpos biespecíficos.

TABELA 5: SUMÁRIO DE PARTES DE COMPONENTES DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI-CD28

Identificador de Anticorpo Biespecífico	Anti-MUC16	Anti-CD28	Região Variável de Cadeia Leve Comum
	Domínio de ligação ao antígeno	Domínio de ligação ao antígeno	
	<i>Região Variável de Cadeia Pesada</i>	<i>Região Variável de Cadeia Pesada</i>	
bs24963D	mAb8799P2	mAb14226P2	ULC3-20
bs32897D	mAb8794P2	mAb14216P2	ULC1-39

[0197] A **Tabela 6** mostra os identificadores de sequência de aminoácidos para os anticorpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD28 exemplificados neste documento. Os identificadores de sequência de ácido nucleico correspondentes são apresentados na **Tabela 7**.

TABELA 6: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI-CD28

Identificador de Anticorpo Biespecífico	Anti-CD28 Primeiro Domínio de Ligação ao Antígeno (D1)				Anti-MUC16 Segundo Domínio de Ligação ao Antígeno (D2)				Região Variável de Cadeia Leve Comum			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bs24963D	18	20	22	24	2	4	6	8	10	12	14	16
bs32897D	42	44	46	48	26	28	30	32	34	36	38	40

TABELA 7: SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI-CD28

Identificador de Anticorpo Biespecífico	Anti-CD28 Primeiro Domínio de Ligação ao Antígeno (D1)				Anti-MUC16 Segundo Domínio de Ligação ao Antígeno (D2)				Região Variável de Cadeia Leve Comum			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bs24963D	17	19	21	23	1	3	5	7	9	11	13	15
bs32897D	41	43	45	47	25	27	29	31	33	35	37	39

EXEMPLO 3. CD28 É UM RECEPTOR COESTIMULADOR POTENTE

[0198] Para determinar quais receptores coestimuladores são eficazes em fornecer o sinal de coestimulação que é importante para a ativação de células T, uma triagem cega de vias coestimuladoras conduzida por expressão forçada de ligantes coestimuladores em um painel de tumores singênicos (**Tabela 8 e Figura 1**) novamente estabeleceu CD28 como um dos receptores coestimuladores mais potentes juntamente com 4-1BB. A **Tabela 8** resume o número de camundongos sem tumor na triagem às cegas. Os ensaios foram conduzidos em três linhagens celulares tumorais diferentes que foram geneticamente modificadas para expressar sete ligantes coestimuladores diferentes. O número em cada célula representa o número de camundongos sem tumor de um total de 5 camundongos.

TABELA 8: INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR EM LINHAGENS CELULARES MODIFICADAS COM LIGANTE COESTIMULADOR INTRODUZIDO

Ligante Coestim.	Receptor Coestim.	Linfoma (EL4)	Carcinoma (MC38)	Melanoma (B16F10.9)
4-1BBL	4-BB	3	4	1
CD80 (B7.1)	CD28	2	2	2
CD86 (B7.2)	CD28	1	0	2
CD70	CD27	5	0	
OX40L	OX40	0	0	2
CD40	CD40L	0	1	0
ICOSL	ICOS	0	0	0
Vetor Vazio		0	0	0
Células parentais não transfectadas		0	0	

EXEMPLO 4. AFINIDADES DE LIGAÇÃO DERIVADAS DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE E CONSTANTES CINÉTICAS DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16xCD28

[0199] A fim de determinar a cinética de ligação de anticorpos monoclonais biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da invenção, foram determinadas afinidades de ligação derivadas de ressonân-

cia plasmônica de superfície e constantes cinéticas de anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 para MUC16 e/ou CD28.

[0200] Constantes de dissociação de equilíbrio (valores K_D) para hMUC16.mmh (SEQ ID NO: 51), hCD28.mmh (SEQ ID NO: 53) e mCD28.mmh (murino CD28.mmh; SEQ ID NO: 54) ligando-se ao anticorpo monoclonal biespecífico anti-MUC16xCD28 exemplificativo purificado da invenção foi determinado usando um biossensor de ressonância de plasmon de superfície em tempo real usando um instrumento Biacore T-200. A superfície do sensor CM5 Biacore foi derivatizada por acoplamento de amina com um anticorpo monoclonal de camundongo de Fc anti-humano para capturar anticorpos anti-MUC16xCD28 biespecíficos exemplificadores purificados da invenção. Dois anticorpos biespecíficos exemplificativos foram testados, bs24963D e REGN4615. REGN4615 é um anticorpo/scFv que reconhece MUC16 humano e CD28 murino e às vezes é referido como um anticorpo anti-MUC16xmsCD28. O braço MUC16 no REGN4615 utiliza as sequências VH e VK-ULC 1-39 conforme mostrado acima na **Tabela 1** para mAb8794P2. O mCD28 (PV-1) é descrito no documento US2004/0116675, com uma cadeia leve de SEQ ID NO: 11 (Consultar também a Figura 15A no documento US2004/0116675) e uma cadeia pesada de SEQ ID NO: 13 (Consultar Figura 15), que foi reformatado como um scFv para as experiências aqui descritas.

[0201] Este estudo de ligação a SPR foi realizado em um tampão composto de HEPES a 0,01 M, pH a 7,4, NaCl a 0,15 M, 0,05% em v/v de tensoativo P20 a pH 7,4 (tampão de execução HBS-ET). Diferentes concentrações de hMUC16 com etiqueta C-term myc-myc-6xHis (hMUC16.mmh), hCD28 com etiqueta C-term myc-myc-6xHis (hCD28.mmh) e etiqueta mCD28 C-term myc-myc-6xHis (mCD28.mmh) foram preparados em tampão de execução HBS-ET, variando de 3,33 nM a 90 nM (para hMuc16) ou 22,2 nM a 600 nM (para hCD28 ou

mCD28) como diluições de 3 vezes em série, para determinação de afinidade sobre anti-MUC16xCD28 biespecífico e anticorpos biespecíficos anti-MUC16xmCD28.

[0202] A superfície do sensor de amina de alta capacidade MASS-2 foi primeiro derivatizada por acoplamento de amina com um anticorpo monoclonal de camundongo Fc anti-humano para capturar aproximadamente 500 a 900 RUs anti-MUC16xCD28 ou anticorpos monoclonais biespecíficos anti-MUC16xmCD28. Uma (1) RU (unidade de resposta) representa 1 pg de proteína por mm², conforme definido pelo fabricante. Diferentes concentrações de hMUC16 com etiqueta C-term myc-myc-6xHis (hMUC16.mmh), hCD28 com etiqueta C-term myc-myc-6xHis (hCD28.mmh) e etiqueta mCD28 C-term myc-myc-6xHis (mCD28.mmh) foram preparados em tampão de execução HBS-ET, variando de 3,33 nM a 90 nM (para hMuc16) ou 22,2 nM a 600 nM (para hCD28 ou mCD28) como diluições de 3 vezes em série e injetados sobre superfícies de anticorpos monoclonais biespecíficos anti-MUC16xCD28 ou anti-MUC16xmCD28 Fc anti-humanos capturados por 5 minutos a uma taxa de fluxo de 50 µl/minuto. A dissociação dos reagentes hMUC16, hCD28 e mCD28 ligados foi monitorada durante 10 minutos em tampão de corrida HBS-ET. As constantes de taxa de associação (k_a) e a taxa de dissociação (k_d) foram determinadas ajustando-se os sensogramas de ligação em tempo real a um modelo de ligação 1:1 com limitação de transporte de massa com o uso do software de ajuste à curva Scrubber 2.0c. As constantes de equilíbrio de dissociação de ligação (K_d) e meias vidas dissociativas ($t_{1/2}$) foram calculadas a partir das constantes de taxa de cinética como:

$$K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}, \text{ e } t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0203] Parâmetros cinéticos de ligação para os anticorpos biespecíficos exemplificativos que se ligam a proteínas recombinantes hMUC16, hCD28, mCD28 purificadas a 37 °C são mostrados abaixo nas

Tabelas 9 a 12.**TABELA 9: AFINIDADES DE LIGAÇÃO BIACORE DE ANTICORPOS ANTI-MUC16XCD28 PARA HMUC16**

AbPID	Captura de mAb (RU)	Ligação de hMUC16.mmh a 90 nM (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Ko (M)	T½ (min)
bs24963D (Experimento 1)	987,1 ± 9,9	365,0	4,41E+05	4,12E-04	9,33E-10	28,0
bs24963D (Experiência 2)	211,7 ± 1,2	120,0	2,38E + 05	2,18E-04	9,12E-10	53,1

TABELA 10: AFINIDADES DE LIGAÇÃO BIACORE DE ANTICORPOS ANTI-MUC16XCD28 PARA HCD28

AbPID	Captura de mAb (RU)	Ligação de hCD28.mmh a 600 nM (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Ko (M)	T½ (min)
bs24963D	985,4 ± 2,7	88,9	3,27E + 04	5,38E-03	1,65E-07	2,1

TABELA 11: AFINIDADES DE LIGAÇÃO BIACORE DE ANTICORPOS ANTI-MUC16XMSCD28 PARA HMUC16

AbPID	Captura de mAb (RU)	Ligação de hMUC16.mmh a 90 nM (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Ko (M)	T½ (min)
REGN4615	1041,0 ± 10,0	513,3	6,29E + 05	4,72E-04	7,49E-10	24,5

TABELA 12: AFINIDADES DE LIGAÇÃO BIACORE DE ANTICORPOS ANTI-MUC16XMSCD28 PARA MCD28

AbPID	Captura de mAb (RU)	Ligação de hMUC16.mmh a 90 nM (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Ko (M)	T½ (min)
REGN4615	1021,8 ± 4,0	25,8	2,07E + 04	7,77E-05	3,76E-09	148,6

EXEMPLO 5. LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16XCD28 A CÉLULAS T E CÉLULAS-ALVO

[0204] A fim de determinar a ligação dos anticorpos biespecíficos exemplificativos da presente invenção em células T humanas e Cynomolgus e células alvo, a análise de citometria de fluxo foi utilizada para determinar a ligação de anticorpos biespecíficos MUC16xCD28 a OVACR-3, PEO1, células Raji de controle negativo, humano e células T Cynomolgus, seguida pela detecção com um anticorpo IgG anti-humano marcado com ficoeritrina (PE) ou marcado com Alexa-647. Resumidamente, 1×10^5 células/poço foram incubadas por 30 minutos a 4°C com uma diluição em série de anticorpos biespecíficos MUC16xCD28 ou um

controle de isótipo IgG4 que se liga a um antígeno humano sem reatividade cruzada com CD28 humano ou de cynomolgus, que está na faixa de 133 nM a 32,6 pM para células T humanas e de cynomolgus e que está na faixa de 133 nM a 8,14 pM para células que expressam Muc16 e células Raji de controle negativo. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado contendo FBS filtrado a 1% e um anticorpo secundário anti-humano conjugado por PE ou conjugado por Alexa647 foi adicionado às células que expressam MUC16 ou células humanas/cyno, respectivamente, e incubado por 30 minutos adicionais. Corante LIVE/DEAD foi adicionado às incubações de células T humanas e cynomolgus. Os poços que não continham anticorpo ou apenas secundário também foram usados como controles.

[0205] Após a incubação com células que expressam MUC16, as células foram lavadas, novamente suspensas em 200 µl de PBS frio que contém FBS filtrado a 1% e analisadas por citometria de fluxo em um BD FACS Canto II.

[0206] Após a incubação com células T humanas ou de Cynomolgus, as células foram lavadas e coradas com um coquetel de anticorpos anti-CD2, anti-CD16, anti-CD4 e anti-CD8 em tampão de coloração brilhante por mais 20 minutos de incubação a 4 °C. Após a lavagem, as células foram novamente suspensas em 200 µl de PBS frio contendo FBS filtrado a 1%, bloqueadas em uma porta Live/CD2+/CD4+/CD16- ou Live/CD2+/CD8+/CD16- e analisadas por citometria de fluxo em um BD FACS LSR -Fortessa-X20.

[0207] A ligação dos anticorpos biespecíficos MUC16xCD28 exemplificativos à superfície de células T humanas foi testada por citometria de fluxo. bs24963D ligado a células T CD4+ com um valor EC₅₀ de 2,61 x 10⁻⁷ M. Ligou-se às células T CD8+ com um valor de EC₅₀ de 2,53 x 10⁻⁷ M. bs32897D ligou-se fracamente às células T CD4+ com um valor de EC₅₀ de 9,16 x 10⁻⁶ M. Também se ligou fracamente às células T

CD8+, com um valor de EC₅₀ de 7,58 x 10⁻⁶ M. Os resultados foram resumidos na **Tabela 13**.

TABELA 13: LIGAÇÃO DO ANTI-MUC16XCD28 A CÉLULAS T HUMANAS

Anticorpo PiD	EC ₅₀ FACS de células T CD4+ humanas [M]	EC ₅₀ FACS de células T CD8+ humanas [M]
bs24963D	2,61E-07M	2,53E-07M
bs32897D	9,16E-06M	7,58E-06M
Controle de Isótipo	Sem ligação	Sem ligação

[0208] A ligação de anticorpos biespecíficos MUC16xCD28 exemplificativos à superfície de células T de Cynomolgus foi testada por citometria de fluxo. O bs24963D exemplificativo se ligou a células T CD4+ com um valor de EC₅₀ de 2,03 x 10⁻⁷ M. Ligou-se às células T CD8+ com um valor de EC₅₀ de 1,22 x 10⁻⁷ M. O bs32897D exemplificativo se ligou a células OVCAR-3 e PEO1 com valores de EC₅₀ de 2,87 x 10⁻¹⁰M e 5,96 x 10⁻¹⁰ M, respectivamente. O bs24963D exemplificativo não exibiu qualquer ligação a células RAJI de controle negativo para MUC16. Os resultados foram resumidos na **Tabela 14**.

TABELA 14: LIGAÇÃO DO ANTI-MUC16XCD28 ÀS CÉLULAS T DE CYNOMOLGUS

Anticorpo PiD	EC ₅₀ FACS de Células T CD4+ de Cynomolgo [M]	EC ₅₀ FACS de Células T CD8+ de Cynomolgo [M]
bs24963D	2,03E-07M	1,22E-07M
bs32897D	5,70E-06M	3,02E-06M
Controle de Isótipo	Sem ligação	Sem ligação

[0209] A ligação dos anticorpos biespecíficos MUC16xCD28 exemplificativos à superfície de linhas celulares que expressam MUC16 foi testada por citometria de fluxo. bs24963D ligado a células OVCAR-3 e PEO1 com valores de EC₅₀ de 6,09 x 10⁻¹⁰ M e 4,67 x 10⁻¹⁰ M, respectivamente. bs32897D não exibiu qualquer ligação a células RAJI de controle negativo para MUC16. bs24963D se ligou a células OVCAR-3 e PEO1 com valores de EC₅₀ de 2,87 x 10⁻¹⁰ M e 5,96 x 10⁻¹⁰ M, respectivamente. bs24963D não exibiu qualquer ligação a células RAJI de controle negativo para MUC16. O anticorpo de controle de isótipo não exibiu

qualquer ligação a células T humanas ou de cynomolgus, nem se ligou a linhas celulares que expressam MUC16. Os resultados foram resumidos na **Tabela 15**.

TABELA 15: LIGAÇÃO DO ANTI-MUC16XCD28 ÀS CÉLULAS QUE EXPRESSAM MUC16

Anticorpo PID	EC ₅₀ FACS de Células OVCAR-3 [M]	EC ₅₀ FACS de Células PEO1 [M]	EC ₅₀ FACS de Células Raji [M]
bs24963D	6,09E-10M	4,67E-10M	Sem ligação
bs32897D	2,87E-10M	5,96E-10M	Sem ligação
Controle de Isótipo	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação

EXEMPLO 6. BIOENSAIO PRIMÁRIO PARA ANTICORPOS BIESPECÍFICOS MUC16XCD28

[0210] A ativação das células T é alcançada através da estimulação de receptores de células T (TCR) que reconhecem peptídeos específicos apresentados pelas principais proteínas do complexo de histocompatibilidade de classe I ou II (MHC I ou MHC II) nas células que apresentam antígenos (APC) (Goldrath *et al.* Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire, *Nature* 402, 255 a 262 (1999)). Um TCR ativado, por sua vez, inicia uma cascata de eventos de sinalização, que podem ser monitorados por genes repórteres, conduzidos por vários fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1), fator nuclear de células T ativadas (NFAT) ou fator nuclear intensificador da cadeia capa de células B ativadas (NFκB). A resposta das células T é, então, refinada ainda mais através do envolvimento de correceptores expressados ou constitutivamente ou induzíveis em células T, como CD28, CTLA-4 (proteína citotóxica associada a linfócitos T 4), PD-1 (proteína para morte celular programada 1), LAG-3 (gene de ativação de linfócitos 3) ou outras moléculas (Sharpe *et al.*, The B7–CD28 Superfamily, *Nat. Rev. Immunol.*, 2(2): 116-126 (2002)). A molécula coestimuladora, CD28, é ativada por seus ligantes endógenos CD80 ou CD86 expressados em APCs. O CD28 potencializa os sinais celulares, como as vias controladas pelo fator de transcrição NFκB após a ativação do TCR. O cossinal

de CD28 é importante para a ativação eficaz de células T, como diferenciação de células T, proliferação, liberação de citocinas e morte celular (Smeets *et al.*, NFκB activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-θ, PNAS, 97(7):3394-3399 (2012).

[0211] A fim de identificar anticorpos que aumentam a atividade das células T na presença de estimulação primária e expressão do alvo MUC16, anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da invenção foram caracterizados em ensaios baseados em células usando células T primárias humanas. Os ensaios avaliam o comportamento do anticorpo biespecífico anti-MUC16/CD28 na presença e na ausência de estimulação primária e na presença e na ausência de expressão alvo.

ENSAIO FUNCIONAL DE IL-2 COM O USO DE CÉLULAS T CD4⁺ HUMANAS PRIMÁRIAS:

[0212] Um ensaio funcional de células T CD4⁺/APC primárias foi desenvolvido para avaliar o efeito da ativação de CD28 na produção de IL-2 após engajamento com anticorpos biespecíficos anti-MUC16 x CD28.

A) ISOLAMENTO DE CÉLULAS T CD4⁺ HUMANAS PRIMÁRIAS:

[0213] Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) foram isoladas de um aglomerado de leucócitos de um doador saudável. O isolamento de PBMC foi realizado por centrifugação em gradiente de densidade com o uso de tubos SepMate™ de 50 ml seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, 15 ml de FicollPaque PLUS foram colocados em tubos SepMate de 50 ml, seguido pela adição de 30 ml de leucócitos diluídos 1:2 com D-PBS. As etapas subsequentes foram seguidas de acordo com o protocolo do fabricante do SepMate. As células T CD4⁺ foram subsequentemente isoladas de PBMC com o uso de kits de Microbead CD4 humano da Miltenyi Biotec seguindo as instruções do fabricante. Células T CD4⁺ isoladas foram

congeladas em FBS contendo DMSO a 10% a uma concentração de 5×10^6 células por frasco.

B) LIBERAÇÃO DE IL-2 DE CÉLULAS T CD4⁺ PRIMÁRIAS TRATADAS COM ANTICORPOS CD28:

[0214] Neste ensaio, as células T CD4⁺ primárias humanas são ativadas via reticulação de moléculas CD3, em complexo com receptores de células T (TCR), usando anticorpo biespecífico α Muc16 x α CD3 (REGN4018) incubado com células-alvo humanas, OVCAR3 ou PEO-1, expressando Muc16 na superfície celular. A ligação do braço Muc16 de REGN4018 às células alvo que expressam Muc16 conduz o agrupamento das moléculas CD3 e fornece o primeiro sinal, necessário para a estimulação de células T na ausência ou para uma adição de uma resposta alogênica. No entanto, neste ensaio, para completar a ativação das células T e aumentar os níveis de liberação de IL-2, é necessária a coestimulação fornecida pela reticulação de moléculas de CD28. Aqui, os anticorpos biespecíficos CD28 interagem com CD28 em células T CD4⁺ e Muc16 em células OVCAR3 ou PEO-1 e conduzem o agrupamento - ativação da molécula coestimuladora, CD28. O envolvimento combinado de TCR e CD28 leva a uma produção aumentada de IL-2, que é liberada em meios de cultura de células. IL-2 é detectada e quantificada a partir do sobrenadante celular com o uso de um kit AlphaLisa homogêneo, sem lavagem, da PerkinElmer.

[0215] Células T CD4⁺ humanas previamente isoladas e congeladas do Doador 104 foram descongeladas no dia do ensaio em meio de estimulação (meio de cultura de células X-VIVO 15 suplementado com FBS a 10%, HEPES, NaPyr, NEAA e BME a 0,01 mM) contendo 50 U/ml de nuclease de benzonase. As células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos, foram novamente suspensas em meio de estimulação e colocadas em placas em placas de fundo redondo de 96 cavidades em uma concentração de 1×10^5 células/cavidade. As células

OVCAR3 e PEO-1 foram tratadas com Mitomicina C em meio de estimulação primária usando 25 µg/ml de Mitomicina C para OVCAR3 e 10 µg/ml para células PEO-1. Após incubação por 1 hora a 37 °C, CO₂ a 5%, as células alvo foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS + FBS a 2%) e adicionadas aos poços contendo células T CD4⁺ em uma concentração final de 1 × 10⁴ células OVCAR3 ou 2,5 × 10⁴ células PEO-1 por poço. Subsequentemente, anticorpos biespecíficos ou de controle de CD28 diluídos em série a 1:4, variando de 3 pM a 200 nM, foram adicionados aos poços na presença de constante de REGN4018 a 5 nM (αMuc16 x αCD3) ou um anticorpo de controle negativo (controle de isótipo hlgG4 = H4sH). O ponto final da diluição de 10 pontos não continha nenhum anticorpo CD28, que é o sinal de fundo. Depois as placas foram incubadas durante 72 horas a 37 °C, CO₂ a 5% que foram centrifugadas para peletizar as células e 20 µl de sobrenadante de meio foram recolhidos. A partir disso, 5 µl foram testados em um ensaio de IL-2 AlphaLISA humano de acordo com o protocolo do fabricante. As medições foram adquiridas no leitor de placas multirrótulo Envision e os valores brutos de RLU (unidades de luz relativa) foram plotados. Todas as diluições em série foram testadas em duplicata.

[0216] Os valores de EC₅₀ dos anticorpos foram determinados ajustando-se os dados a uma equação logística de quatro parâmetros em uma curva de dose-resposta de 10 pontos com o uso do software GraphPad Prism™. A indução de dobra máxima é calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Indução de dobra} = \frac{\text{Valor médio de RLU mais alta dentro da faixa de dose testada}}{\text{Valores médios de IL-2 (fundo)}}$$

[0217] A ativação de células T CD4 + (conforme medido pela liberação de IL-2) foi aumentada por hMUC16xhCD28 na presença de estimulação primária (anti-MUC16xCD3) e MUC16 expresso em células

alvo.

C) RESULTADO DO ENSAIO FUNCIONAL DE IL-2 COM O USO DE CÉLULAS T CD4⁺ HUMANAS PRIMÁRIAS:

[0218] A capacidade dos anticorpos biespecíficos anti-Muc16 x anti-CD28 de fornecer coestimulação através de CD28 em células T CD4⁺ isoladas na ausência ou presença de um anticorpo biespecífico estimulador de TCR (REGN4018 = anti-Muc16 x anti-CD3) foi avaliada em um ensaio de liberação de IL-2 funcional usando células T CD4⁺ humanas isoladas incubadas com células alvo que expressam endogenamente Muc16 (células OVAR3 e PEO-1) na superfície celular.

[0219] Os valores de indução de dobra estão resumidos nas **Tabelas 16 e 17** para células T CD4⁺ coincubadas com células OVCAR3 ou PEO-1, além de 5 nM de controle de isótipo constante de hIgG4 H4sH ou REGN4018 anti-Muc16 x anti-CD3.

[0220] Quando as células T CD4⁺ isoladas são incubadas com células alvo OVCAR3 ou PEO-1 na ausência de uma estimulação TCR direcionada via REGN4018 usando uma quantidade constante de controle do isótipo H4sH, as quantidades detectadas de IL-2 são semelhantes entre os anticorpos parentais CD28, anticorpos anti-Muc16 x anti-CD28 (bs32897D e bs24963D) e o anticorpo de controle do isótipo H4sH negativo. (**Tabela 16**)

[0221] Em contrapartida, níveis aumentados de IL-2 são detectados em amostras tratadas com anti-Muc16 x anti-CD3 (REGN4018). Nessas condições, se as células T CD4⁺ humanas forem coincubadas com células OVCAR3 ou PEO-1, ambos os anticorpos biespecíficos CD28 aumentam os níveis de IL-2 mais do que seus respectivos anticorpos CD28 parentais. Como esperado, nenhuma liberação mínima de IL-2 é observada com o controle de isótipo. (**Tabela 17**)

[0222] Se OVCAR3 são utilizados como células alvo, uma liberação semelhante dependente da dose de IL-2 é medida tanto para CD28

anticorpos biespecíficos (bs32897D: 5,63x e $EC_{50} = 606$ pM) e bs24963D: 5,32x e $EC_{50} = 401$ pM). Enquanto com células PEO-1, uma diferença na indução dos níveis de IL-2 pode ser observada entre ambas as moléculas biespecíficas. Aqui, bs24963D (10,94x e $CE_{50} = 996$ pM) dá origem a valores mais elevados de IL-2 do que bs32897D (5,22x e EC_{50} não pôde ser determinada, porque a curva de dose-resposta não atingiu a saturação).

[0223] Na ausência de estimulação de TCR, seja através de uma resposta alogênica ou conduzida por anti-MUC16xCD3, nenhuma liberação mensurável de IL-2 é observada com anticorpos CD28 em poços contendo quantidades constantes de controle de isótipo na presença de células OVCAR3 ou PEO-1 (**Tabela 16**). **A Tabela 16** resume os valores de EC_{50} e a indução de dobra da liberação de IL-2 a partir de células T CD4⁺ coincubadas com OVCAR3 ou PEO-1 e constante de 5 nM controle de isótipos.

TABELA 16: EC_{50} E RESULTADOS DE INDUÇÃO DE DOBRA PARA A LIBERAÇÃO DE IL-2 A PARTIR DE CÉLULAS T CD4⁺ HUMANAS PRIMÁRIAS NA PRESENÇA DE CONTROLE DE ISÓTIPO IGG4 HUMANO A 5 NM:

Anticorpos	OVCAR3		PEO-1	
	EC_{50} [M]	Indução de dobra	EC_{50} [M]	Indução de dobra
bs32897D	N/C	1,06	N/C	1,12
bs24963D	N/C	1,33	N/C	1,12
Parental 1 hCD28 (para bs32897D)	N/C	1,10	N/C	1,30
Parental 2 hCD28 (para bs24963D)	N/C	1,12	N/C	1,03
Controle de Isótipo H4sH	N/C	1,12	N/C	1,48

Tabela 16. Valores tabulados de EC_{50} e a indução de dobra máxima de IL-2 de libertação ao longo do sinal de fundo a partir de células CD4⁺ T coincubadas com ou OVCAR3 PEO-1 e 5 nM constante de controle de isótipo H4sH.

N/C = Não Calculado

[0224] Em contrapartida, os níveis mensuráveis de IL-2 (RLU) são

detectados em amostras tratadas com anti-MUC16xCD3. Nessas condições, se as células T CD4⁺ humanas forem coincubadas com células OVCAR3 ou PEO-1, ambos os anticorpos biespecíficos CD28 aumentam os níveis de IL-2 mais do que seu anticorpo CD28 parental. Como esperado, nenhuma liberação de IL-2 é observada com o controle de isótipo (**Tabela 17**). A **Tabela 17** resume os valores de EC₅₀ e a indução de dobra da liberação de IL-2 a partir de células T CD4⁺ coincubadas com OVCAR3 ou PEO-1 e constante de 5 nM de anti-MUC16xCD3 a 5 nM.

TABELA 17: EC₅₀ E RESULTADOS DE INDUÇÃO DE DOBRA PARA LIBERAÇÃO DE IL-2 DE CÉLULAS T CD4⁺ HUMANAS PRIMÁRIAS NA PRESENÇA DE REGN4018 A 5 NM (ANTI-MUC16 X ANTI-CD3):

Anticorpos	OVCAR3		PEO-1	
	EC ₅₀ [M]	Indução de dobra	EC ₅₀ [M]	Indução de dobra
bs32897D	6,07E-10	5,63	N/D	5,22
bs24963D	4,01E-10	5,32	9,96E-10	10,94
Parental 1 hCD28 (para bs32897D)	N/D	1,58	N/D	1,42
Parental 2 hCD28 (para bs24963D)	N/D	2,46	1,07E-10	2,05
Controle de Isótipo H4sH	N/C	1,09	N/C	1,11

Tabela 17. Valores tabulados de EC₅₀ e a indução de dobra máxima de IL-2 de liberação ao longo do sinal de fundo a partir de células CD4⁺ T coincubadas com OVCAR3 ou PEO-1 e constante de 5 nM de REGN4018 (anti-MUC16 x anti-CD3). Abreviaturas: N/D = Não Determinado, porque a curva dose-resposta não atingiu a saturação ou apresentou formato de sino; N/C = Não Calculado

EXEMPLO 7. ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16XCD28 POTENCIALIZAM A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS DE OVÁRIO NA PRESENÇA DE ESTIMULAÇÃO DE TCR POR ANTI-MUC16XCD3

[0225] Para examinar se os anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da invenção poderiam aumentar a ativa-

ção de células T mediada por anti-MUC16xCD3 e citotoxicidade em células tumorais ovarianas, FACS foi usado para examinar a viabilidade de células tumorais e células T fenótipo após cocultura *in vitro* com uma titulação da dose de MUC16xCD3 sozinho ou em combinação com MUC16xCD28 (**Figura 2A**). Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) contendo células T foram cocultivadas com células de câncer de ovário PEO-1 expressando níveis endógenos de MUC16 (Coscia, F. *et al*, Nat. Commun. (2016), 26 de agosto; 7: 12645).

[0226] Dois estudos de citotoxicidade à base de FACS foram conduzidos. No primeiro estudo, a citotoxicidade baseada em FACS foi conduzida em células MUC16 + na presença de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) e anti-MUC16xCD3 na presença ou ausência de estimulação anti-MUC16 x CD28 (citotoxicidade baseada em FACS em células MUC16 + PBMC humana +/- estimulação de MUC16xCD28 (configuração da matriz MUC16xCD28 x Muc16xCD3)). O segundo estudo é idêntico ao primeiro estudo, exceto que PBMCs de *Cynomolgus* são usadas em vez de PBMCs humanas (Citotoxicidade baseada em FACS em células MUC16 + PBMC de *Cynomolgus* +/- estimulação de MUC16xCD28 (configuração da matriz MUC16xCD28 x MUC16xCD3)).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

[0227] A fim de monitorar o extermínio de células MUC16+ na presença de uma combinação de um anticorpo anti-MUC16xCD3 e um anticorpo anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção, as linhas celulares que expressam endogenamente MUC16 (PEO1, MUC16+) foram marcadas com 1 μ M de Rastreador de Célula Violeta e colocadas em placa durante a noite a 37 °C. Separadamente, PBMCs humanos (New York Blood Center) ou PBMCs de macacos *cynomolgus* (Covance, Cranford NJ) foram dispostos em placas em meios de RPMI suplementados em 1 x 10⁶ células/ml e incubados de um dia para o outro a 37 °C

para enriquecer para linfócitos esgotando-se os macrófagos aderentes, células dendríticas e alguns monócitos. No dia seguinte, as células alvo foram coincubadas com PBMC humana virgem depletada de células aderentes (razão Célula Efetora/Alvo a 4:1) e uma diluição em série de anti-MUC16xCD3 ou biespecífico não direcionado à base de CD3 (bs17664D), sozinho ou em combinação com uma concentração fixa (2,5 µg/ml) de um anti-MUC16xCD28 biespecífico exemplificativo por 96 horas a 37 °C. Após a incubação, as células foram removidas das placas de cultura de células usando tampão de dissociação Tripsina-EDTA e analisadas por Citometria de Fluxo (FACS).

[0228] Para a análise de FACS, as células foram manchadas com um rastreador de células vermelhas distantes de viabilidade (Invitrogen) e anticorpos diretamente conjugados para CD2, CD4, CD8 e CD25 (BD). As amostras foram executadas com microesferas de calibração para contagem de células. Para a avaliação da especificidade da morte, as células alvo foram classificadas como populações positivas do rastreador celular Violet. A porcentagem de células alvo vivas foi calculada da seguinte forma: porcentagem (%) de células viáveis = $(R1/R2) \times 100$, em que R1 = porcentagem (%) de células alvo vivas na presença de anticorpo, e R2 = porcentagem (%) de células alvo vivas na ausência de anticorpos de teste. A ativação das células T foi medida pela porcentagem de células T ativadas (CD25⁺) fora das células T CD2⁺/CD4⁺ ou CD2⁺/CD8⁺. A regulação crescente do marcador PD-1 foi avaliada incubando-se células com anticorpos diretamente conjugados para CD2, CD4, CD8, CD25 e PD-1, e relatando-se a porcentagem de células T PD-1⁺ do total de células T (CD2⁺). A contagem de células T foi medida calculando-se o número de células CD4⁺ ou CD8⁺ vivas por microesfera de calibração. Os níveis de citocinas acumuladas no meio foram analisados com o uso do kit Citocina humana (CBA) Th1/Th2/Th17 de Aranjo de Microesfera citométrica BD, seguindo o protocolo do fabricante.

RESULTADOS, SUMÁRIO E CONCLUSÕES:

[0229] O anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD3 foi testado quanto à sua capacidade de induzir células T humanas virgens a exterminar células alvo PEO1 que expressam MUC16 humano como um único agente, ou na presença de um anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD28 coestimulador. O anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD3 ativou e direcionou as células T humanas para esgotar as células PEO1. Além disso, MUC16xCD3 sozinho induziu o extermínio moderado de células T de células cancerosas PEO-1, reduzindo sua viabilidade para aproximadamente 60% de uma maneira dependente da dose (**Figura 2B** e **Tabela 18**). O extermínio das células alvo foi observado na presença do anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD3 e as células PEO1 foram exterminadas de uma maneira dependente da dose com EC_{50} s no nível picomolar (pM) (**Figura 2B**). O extermínio das células alvo não foi observado quando o anti-MUC16xCD3 não estava presente (**Figura 2B**). A lise de células alvo observada foi associada à regulação crescente de células CD25+ e PD-1+ em células T CD2+, novamente com EC_{50} s picomolares (pM) (**Tabela 18**).

[0230] O anti-MUC16xCD3 induziu a liberação de citocinas humanas. A atividade citotóxica observada com anti-MUC16xCD3 como um único agente foi aumentada na presença de moléculas coestimuladoras anti-MUC16xCD28 exemplificativas da presente invenção, bs24963D e bs32897D.

[0231] Verificou-se que a adição do anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção aumentou a potência e a profundidade da citotoxicidade induzida por MUC16xCD3, resultando em redução adicional da viabilidade das células cancerosas PEO-1 em menos de 20% (aumento maior do que 3 vezes no extermínio de células T) (**Figura 2B**). Além disso, o anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção aumentou os níveis de liberação de IFN γ induzida por MUC16xCD3 em mais de 10

vezes (**Figura 2C**). A combinação de MUC16xCD28 e MUC16xCD3 expandiu as células T CD4 e CD8 e aumentou o nível de expressão do marcador de ativação CD25 (**Figuras 2D-E**). Notavelmente, MUC16xCD28 em combinação com um CD3 biespecífico não direcionado não induziu citotoxicidade ou ativação de células T (**Figura 2B**).

[0232] Em suma, a coestimulação aumentou a ativação de células T, a regulação crescente de PD-1 e a liberação de citocinas em comparação com o que foi observado com MUC16xCD3 como um agente único. As **Tabelas 18 e 19** e as **Figuras 2A-2E**) resumem os resultados experimentais usando PBMCs humanas.

TABELA 18: EFEITOS DE ANTI-MUC16XCD28 NA CITOTOXICIDADE DE ANTI-MUC16XCD3 PARA CÉLULAS PEO1 NA PRESENÇA DE PBMCs HUMANAS

PiD	EC ₅₀ de extermínio de PEO1 [M]	% de Viabilidade mínima de PEO1	EC ₅₀ de ativação de células T [M] (CD8+/CD25+)	% de regulação crescente de PD-1 (CD4+/PD1+)
MUC16xCD3	1,27E-10	57%	2,94E-10	27,2%
MUC16xCD3 + bs24963D	1,07E-10 a 5,31E-11	9,8%	1,86E-10 a 3,94E-11	65,7%
MUC16xCD3 + bs32897D	2,6E-10 a 7,40E-11	17,7%	4,82E-10 a 4,42E-11	58,4%

[0233] O anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD3 também foi testado quanto à sua capacidade de induzir células T de cynomolgus virgens para exterminar células alvo que expressam MUC16 humano como um único agente, ou na presença de um anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD28 coestimulador. Os mesmos ensaios foram realizados e resultados semelhantes foram obtidos usando PBMC de macacos cynomolgus (**Figuras 2F a 2H**). A **Figura 2I** mostra que o anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD28 exemplificativo se liga a alvos celulares, conforme medido por citometria de fluxo. Esses resultados demonstraram que os anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 da invenção podem potentemente aumentar a ativação de células T mediada por MUC16xCD3 não apenas por meio de proliferação e liberação de cito-

cinas, mas também citotoxicidade. Na titulação do anticorpo selecionado, o anticorpo biespecífico anti-MUC16xCD3 ativou as células T humanas, mas não direcionou as células T para realizar depleção das células PEO1 (**Tabela 19**). A coestimulação com um anticorpo anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção resultou em aumento da ativação de células T, um aumento da atividade citotóxica e regulação crescente do marcador PD-1 nas células T (**Tabela 19**).

TABELA 19: EFEITOS DE ANTI-MUC16XCD28 NA CITOTOXICIDADE DE ANTI-MUC16XCD3 PARA CÉLULAS PEO1 NA PRESENÇA DE PBMCS DE CYNOMOLGUS

PID	EC50 de extermínio de PEO1 [M]	% de Viabilidade mínima de PEO1	EC50 de ativação de células T [M] (CD8+/CD25+)	% de regulação crescente máxima de PD-1 (CD4+/PD1+)
MUC16xCD3	2,09E-10	69%	1,59E-10	24,4%
MUC16xCD3 + bs24963D	1,29E-10 a 3,34E-11	18,1%	1,04E-10 a 9,07E11	44,3%
MUC16xCD3 + bs32897D	3,92E-10 a 1,09E-10	29,7%	2,81E-10 a 7,67E-11	40,3%

EXEMPLO 8. ESTUDO *IN VIVO* DO ANTICORPO ANTI-MUC16XCD28

[0234] A combinação de anticorpos biespecíficos anti-CD3xMUC16 e anti-CD28xMUC16 direcionados ao antígeno tumoral intensificou a eliminação do tumor em um modelo de camundongo. Conforme mostrado em detalhes abaixo, o crescimento do tumor OVCAR-3 foi significativamente inibido em camundongos administrados com anti-CD3xMUC16 e anti-CD28xMUC16 exemplificativos da invenção em comparação com camundongos administrados com anti-CD3xMUC16 sozinho ou isótipo de controle.

[0235] Para examinar se MUC16xCD28 poderia intensificar a eficácia antitumoral de MUC16xCD3 *in vivo*, dois modelos de tumor distintos, um modelo de ascite xenogênica tumoral e um modelo de camundongo tumoral singênico, foram usados conforme descrito em detalhes abaixo.

MODELO DE ASCITE XENOGENICA TUMORAL

[0236] Em um modelo de ascite xenogênica tumoral, células de câncer de ovário de alto grau OVCAR-3 de carcinoma seroso de origem

humana, expressando altos níveis endógenos de MUC16, são implantadas intraperitonealmente em camundongos NSG pré-enxertados com PBMC humana (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. *Science Translational Medicine* 19 de junho de 2019: Vol. 11, Edição 497, eaau7534). As células OVCAR-3 foram projetadas com repórter de luciferase para rastrear o crescimento do tumor ao longo do tempo usando bioluminescência *in vivo* (BLI).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

[0237] Os experimentos foram realizados conforme descrito em (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. *Science Translational Medicine* 19 de junho de 2019: Vol. 11, Edição 497, eaau7534). Os camundongos foram injetados IP com 150 mg/kg do substrato de luciferase D-luciferina suspenso em PBS. Dez minutos após a dosagem, o imageamento de BLI dos camundongos foi realizado sob anestesia de isoflurano com o uso do sistema de Xenogen IVIS (Perfin Elmer). A aquisição de imagem foi executada com o campo de vista em D, altura de indivíduo de 1,5 cm, e nível de ligação de meio para tempo de exposição de 0,5 min. Os sinais de BLI foram extraídos com o uso do software de Living Image (Xenogen; Alameda, CA). As regiões de interesse foram desenhadas em torno de cada massa tumoral e as intensidades dos

fótons foram registradas como p/s/cm²/sr (fótons por segundo por centímetro quadrado por esteroidiano). Os camundongos que não receberam células OVCAR-3/Luc serviram como uma leitura de linha de base para a atividade de BLI. Esses camundongos da linha de base (N = 3) sem tumores foram fotografados em cada dia e o limite inferior de detecção (LOD) foi calculado como a leitura de BLI média em todos os camundongos livres de tumor com imagem.

[0238] Camundongos NSG de oito a dez (8-10) semanas de idade (knock-out de cadeia gama NOD SCID) (Jackson Laboratory, MD) foram injetados com 5×10^6 PBMCs humanas (ReachBio, Seattle, WA). Dez a quatorze (10-14) dias depois, os camundongos foram sangrados através da veia da cauda para determinar o enxerto de células T humanas. Dentro de duas semanas de PBMCs sendo transferidas, 2×10^6 células ascíticas da linha celular OVCAR-3/Luc, previamente passadas *in vivo*, foram administradas intraperitonealmente (IP) dentro de duas semanas (Dia 0). Os camundongos foram verificados quanto ao enxerto de células T por citometria de fluxo, em seguida, atribuídos a grupos usando BLI para garantir carga tumoral semelhante. Quatro dias após a implantação do tumor, os camundongos foram divididos em grupos de 5 animais cada com uma BLI média de $1,49 \times 10^5$ ou $3,03 \times 10^5$ p/s/cm²/sr para os dois estudos. Os camundongos foram tratados com os anticorpos biespecíficos ou de controle indicados no dia 5 e 8. Os camundongos foram administrados com anti-MUC16xCD3 ou um controle de ligação de CD3 com ou sem anti-MUC16xCD28 exemplificativo (bs24963D) da invenção duas vezes por meio de injeção intravenosa (IV). A imagem ocorreu várias vezes ao longo do estudo para rastrear o crescimento do tumor.

[0239] Os níveis de citocinas séricas do sangue também foram obtidos no ponto de tempo indicado. Nos pontos de tempo indicados, o

sangue foi coletado por punção submandibular em tubos de soro microtainer (BD 365967). Os níveis de citocinas foram analisados usando o kit V-plex Human ProInflammatory-10 Plex seguindo as instruções do fabricante (Diagnóstico de mesoescala, Rockville, MA).

[0240] Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do NIH. Os protocolos foram aprovados pelo Regeneron Pharmaceuticals Institutional Animal Care and Use Committee. Um total de 2 estudos com 5 camundongos por grupo foram concluídos.

RESULTADOS, SUMÁRIO E CONCLUSÕES

[0241] Para estudos de tumor xenogênico, dois modelos foram usados. Para o primeiro modelo xenogênico, os camundongos NSG foram injetados intraperitonealmente (IP) com células de OVCAR-3/Luc passadas anteriormente *in vivo* (Dia 0) treze dias após o enxerto com PBMCs humanas. Os camundongos foram tratados por IV nos dias 5 e 8. Os camundongos receberam 12,5 µg de anti-MUC16xCD3 ou 12,5 µg de controle de ligação a CD3 (isótipo hIgG4^{P-PVA}). Alguns dos camundongos também receberam o anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção (bs24963D) a 100 µg. O fardo de tumor foi avaliado por BLI nos Dias 4, 8, 12, 15, 20 e 25 após a implantação de tumor. Tumores evidentes por BLI reduzidos não foram observados quando o bs24963D exemplificativo foi administrado sem anti-MUC16xCD3. Em contrapartida, enquanto o tratamento com 12,5 µg de anti-MUC16xCD3 reduziu significativamente os tumores evidentes de BLI, o anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção aumentou significativamente a eficácia sobre o anti-MUC16xCD3 sozinho (**Tabelas 20 a 22**).

[0242] A **Tabela 20** resume o nível de bioluminescência no dia 4 após a implantação do tumor no primeiro modelo xenogênico OVCAR-3/Luc.

TABELA 20: MODELO OVCAR-3/LUC. NÍVEL DE BIOLUMINESCÊNCIA NO DIA 4 PÓS-IMPLANTAÇÃO DE TUMOR

Anticorpo (μg)	Radiância Média [$\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$] 4 dias pós-implantação (média \pm SEM)
controle de ligação ao CD3 (12,5)	$1,51 \times 10^5 \pm 2,81 \times 10^4$
Anti-MUC16xCD3 (12,5)	$1,5 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^4$
Controle de ligação a CD3 (12,5) + anti-MUC16xCD28 (100)	$1,53 \times 10^5 \pm 2,01 \times 10^4$
Anti-MUC16xCD3 (12,5) + anti-MUC16xCD28 (100)	$1,27 \times 10^5 \pm 2,29 \times 10^4$

[0243] A **Tabela 21** resume o nível de bioluminescência no dia 25 após a implantação do tumor no primeiro modelo xenogênico OVCAR-3/Luc.

TABELA 21: MODELO OVCAR-3/LUC. NÍVEL DE BIOLUMINESCÊNCIA NO DIA 25 APÓS IMPLANTAÇÃO DE TUMOR

Anticorpo (μg)	Radiância Média [$\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$] 25 dias pós-implantação (média \pm SEM)
controle de ligação ao CD3 (12,5)	$7,71 \times 10^6 \pm 1,07 \times 10^6$
Anti-MUC16xCD3 (12,5)	$7,44 \times 10^3 \pm 3,11 \times 10^3$
Controle de ligação a CD3 (12,5) + anti-MUC16xCD28 (100)	$6,04 \times 10^6 \pm 8,32 \times 10^5$
Anti-MUC16xCD3 (12,5) + anti-MUC16xCD28 (100)	$1,31 \times 10^5 \pm 3,05 \times 10^1$

[0244] A **Tabela 22** resume a Fold Change em BLI entre o Dia 4 e o Dia 25 após a implantação de tumor no primeiro modelo xenogênico OVCAR-3/Luc.

TABELA 22: MODELO OVCAR-3/LUC. FOLD CHANGE EM BLI ENTRE O DIA 4 E O DIA 25 APÓS A IMPLANTAÇÃO DE TUMOR

Anticorpo (μg)	Fold Change na Radiância Média [$\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$] do Dia 4 ao D25 pós-implantação (média \pm SD)
controle de ligação ao CD3 (12,5)	$50,72 \pm 29,67$
Anti-MUC16xCD3 (12,5)	$-0,94 \pm 0,05$
Controle de ligação a CD3 (12,5) + anti-MUC16xCD28 (100)	$35,38 \pm 8,18$
Anti-MUC16xCD3 (12,5) + anti-MUC16xCD28 (100)	$-0,99 \pm 0,00$

[0245] Para o segundo modelo xenogênico, os camundongos NSG foram injetados intraperitonealmente (IP) com células de OVCAR-3/Luc passadas anteriormente *in vivo* (Dia 0) dez dias após o enxerto com PBMCs humanas. Os camundongos foram tratados IV com 0,5 mg/kg de anti-MUC16xCD3 ou administrados 0,5 mg/kg de controle de ligação de CD3 nos Dias 5 e 8. O fardo de tumor foi avaliado por BLI nos Dias 4, 8, 11, 14, 21, 28 e 34. Alguns dos camundongos também receberam

o anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção (bs24963D) a 0,2 mg/kg, 1 mg/kg ou 5 mg/kg. O bs24963D exemplificativo não diminuiu a carga tumoral quando administrado sem anti-MUC16xCD3. Em contrapartida, enquanto o tratamento com 0,5 mg/kg de anti-MUC16xCD3 reduziu significativamente os tumores evidentes por BLI, o anti-MUC16xCD28 exemplificativo aumentou a eficácia sobre o anti-MUC16xCD3 sozinho (**Tabelas 23 a 25 e Figura 4A**).

[0246] A **Tabela 23** resume o nível de bioluminescência no dia 4 após a implantação do tumor no segundo modelo xenogênico OVCAR-3/Luc.

TABELA 23: MODELO OVCAR-3/LUC. NÍVEL DE BIOLUMINESCÊNCIA NO DIA 4 APÓS IMPLANTAÇÃO DE TUMOR

Anticorpo (mg/kg)	Radiância Média [p/s/cm ² /sr] 4 dias pós-implantação (média ± SEM)
controle de ligação ao CD3 (0,5)	3,65 x 10 ⁵ ± 5,50 x 10 ⁴
Anti-MUC16xCD3 (0,5)	3,76 x 10 ⁵ ± 2,40 x 10 ⁴
Controle de ligação a CD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (5)	2,71 x 10 ⁵ ± 2,65 x 10 ⁴
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (5)	3,18 x 10 ⁵ ± 4,45x 10 ⁴
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (1)	3,07 x 10 ⁵ ± 4,37x 10 ⁴
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (0,2)	2,86 x 10 ⁵ ± 4,95x 10 ⁴

[0247] A **Tabela 24** resume o nível de bioluminescência no dia 25 após a implantação do tumor no segundo modelo xenogênico OVCAR-3/Luc

TABELA 24: MODELO OVCAR-3/LUC. NÍVEL DE BIOLUMINESCÊNCIA NO DIA 34 APÓS IMPLANTAÇÃO DE TUMOR

Anticorpo (mg/kg)	Radiância Média [p/s/cm ² /sr] 34 dias pós-implantação (média ± SEM)
controle de ligação ao CD3 (0,5)	1,79 x 10 ⁷ ± 2,17 x 10 ⁶
Anti-MUC16xCD3 (0,5)	9,60 x 10 ⁴ ± 4,55 x 10 ⁴
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (5)	2,34 x 10 ⁷ ± 1,12 x 10 ⁶
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (5)	2,45 x 10 ³ ± 4,49 x 10 ³
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (1)	1,62 x 10 ³ ± 2,32 x 10 ³
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (0,2)	1,29 x 10 ³ ± 4,77 x 10 ¹

[0248] A **Tabela 25** resume a Fold Change em BLI entre o Dia 4 e o Dia 34 após a implantação de tumor no primeiro modelo xenogênico OVCAR-3/Luc.

TABELA 25: MODELO OVCAR-3/LUC. FOLD CHANGE EM BLI ENTRE O DIA 4 E O DIA 34 APÓS A IMPLANTAÇÃO DE TUMOR

Anticorpo (mg/kg)	Fold Change na Radiância Média [p/s/cm ² /sr] do Dia 4 ao D34 pós-implantação (média ± SD)
controle de ligação ao CD3 (0,5)	51,35 ± 27,59
Anti-MUC16xCD3 (0,5)	-0,64 ± 0,31
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (5)	64,62 ± 36,38
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (5)	-0,97 ± 0,04
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (1)	-0,99 ± 0,02
Anti-MUC16xCD3 (0,5) + anti-MUC16xCD28 (0,2)	-1,00 ± 0,00

[0249] Outros resultados do segundo modelo xenogênico usando diferentes dosagens são mostrados na **Figura 3A**. Os camundongos tratados com MUC16xCD3 a 2,5 µg no dia 5 e 8 após o implante do tumor reduziram significativamente a carga do tumor em comparação com os camundongos tratados com um anticorpo de controle de ligação a CD3 (EGFRvIIIxCD3), mas não limpavam completamente as células tumorais OVCAR-3/Luc (**Figura 3A**). A combinação de MUC16xCD3 a 2,5 µg com MUC16xCD28 a 100 µg inibiu ainda mais o crescimento do tumor com rejeição mais durável de células tumorais ao longo do tempo (**Figura 3A**). No mesmo experimento, os níveis séricos de citocinas também foram obtidos. A **Figura 3B** mostra os níveis de citocinas (pg/ml) em camundongos tratados com diferentes anticorpos e/ou combinações de anticorpos. A **Figura 3C** mostra a carga tumoral e a correlação com os níveis de CA-125 no soro no dia 26.

[0250] Para testar a capacidade dos biespecíficos de CD28 e CD3 de promover o extermínio do tumor *in vivo*, foi utilizado o modelo de tumor OVCAR-3 ovariano intraperitoneal xenogênico bem estabelecido. Nesse modelo, as células tumorais são introduzidas em camundongos imunodeficientes que são reconstituídos com PBMCs humanas. Como outras linhas de células de câncer de ovário, as células OVCAR-3 expressam MUC16. Antes da implantação, as células OVCAR-3 foram projetadas com um repórter de luciferase para permitir o rastreamento

in vivo do crescimento do tumor ao longo do tempo usando bioluminescência (BLI). Os tumores OVCAR-3 implantados cresceram ininterruptamente em camundongos tratados com EGFRvIIIxCD3 biespecífico, um controle CD3-biespecífico que não se ligou a essas células, e em camundongos tratados apenas com o MUC16xCD28 biespecífico (**Figura 3A**). Embora o biespecífico MUC16xCD3 sozinho tenha demonstrado atividade antitumoral significativa, não eliminou completamente os tumores OVCAR-3 (**Figura 3A**), enquanto a adição do biespecífico MUC16xCD28 ao biespecífico MUC16xCD3 aumentou o efeito antitumoral *in vivo* (**Figura 3A**) em relação ao MUC16xCD3 sozinho. Consistente com a atividade antitumoral aumentada, a combinação de ambos os biespecíficos também aumentou a secreção de citocinas circulantes (**Figura 3B**).

[0251] Os biespecíficos MUC16 se ligam ao "nó" remanescente de MUC16 (o remanescente da superfície celular após a clivagem e liberação de CA-125) na superfície da célula de câncer de ovário após a clivagem proteolítica ter liberado o biomarcador de câncer de ovário prognóstico CA-125 (I. Mylonas *et al.*, Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Anticancer Res* **23**, 1075-1080 (2003)), mas não se liga ao CA-125 solúvel (**Figuras 9A e 9B**). Para determinar se o biespecífico MUC16xCD28 perturbou a capacidade de usar CA-125 como um biomarcador para carga de tumor ovariano, os níveis de CA-125 nos camundongos foram medidos. Os níveis de CA-125 estão correlacionados com a carga tumoral, independentemente do tratamento. Os níveis mais baixos de CA-125 foram observados nos camundongos tratados com a combinação de biespecíficos (**Figura 3C**), conforme demonstrado anteriormente para MUC16xCD3 biespecífico.

MODELO DE CAMUNDONGO SINGÊNICO

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

[0252] Estudos singênicos foram realizados em camundongos geneticamente modificados para expressar CD3 humano e uma porção de MUC16 humano para os estudos MC38 usando a tecnologia VelociGene®, conforme descrito anteriormente (Valenzuela et al., (2003) Nat. Biotechnol. Junho; 21(6):652-9), (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 de junho de 2019: Vol. 11, Edição 497, eaau7534). Camundongos que expressam CD3 humano, CD28 humano e uma porção de MUC16 humano foram usados para os estudos ID8-VEGF. Para a humanização de CD3, um vetor de direcionamento foi projetado para substituir as porções extracelulares dos genes CD3 de camundongo ($\gamma\delta\epsilon$) com a região humana correspondente dos genes. Para a humanização de CD28, um vetor de direcionamento foi projetado para substituir as porções extracelulares do gene CD28 de camundongo com a região humana correspondente do gene. Para MUC16, as repetições de SEA 13-17 do camundongo foram substituídas pelas repetições de SEA 12-16 humanas. Para cada camundongo humanizado, o alvejamento correto do gene em clones de células estaminais embrionárias (ES) F1H4 (híbrido C57BL/6 x 129) foi identificado por um ensaio de perda de alelo conforme descrito anteriormente (Poueymirou et al (2007), Nat Biotechnol, jan;25(1):91-9). Células ES alvejadas foram injetadas em embriões Swiss Webster em estágio de 8 células para produzir camundongos heterozigotos de geração totalmente F0 para reprodução com camundongos C57BL/6N (Taconic, Rensselaer, NY) até homozigose. Os camundongos que expressam a

porção extracelular humana de CD3 ($\gamma\delta\epsilon$), a porção extracelular humana de CD28 e uma porção de MUC16 humano foram então criados para homozigose (referido como hCD3/hMuc16 ou camundongos humanizados hCD3/hCD28/hMUC16).

[0253] Para examinar a eficácia em um modelo imunocompetente, um camundongo knock-in foi gerado. As células T desse camundongo expressam CD3 humano, e no lugar de MUC16 murino, uma molécula quimérica é expressa que contém uma porção de MUC16 humano à qual o anticorpo biespecífico exemplificativo da invenção se liga. Assim, a molécula anti-MUC16xCD3 pode ser usada neste estudo. Para investigar se a adição de uma molécula biespecífica de CD28 de direcionamento pode aumentar a eficácia nesses camundongos, um anticorpo biespecífico substituto também foi gerado. O anticorpo substituto reconheceu MUC16 humano, mas CD28 murino, para examinar os efeitos da coestimulação de CD28 e às vezes é referido como anti-MUC16xmCD28. Para o modelo de tumor singênico, foi usada a linha de células MC38 projetada para expressar uma porção de MUC16 humano. Os camundongos foram implantados com as células MC38/huMUC16 por via subcutânea (SC) e tratados com 0,01 mg/kg de anti-MUC16xCD3 no dia da implantação, duas vezes por semana até o dia 21. O tratamento com 0,01 mg/kg de anti-MUC16xCD3 resultou em eficácia antitumoral significativa e a adição de MUC16xmCD28 aumentou esse efeito. (Consultar as **Figuras 6A, 6B, 6C e 6D**). *Implantação e medição de tumores singênicos*

[0254] Camundongos que expressam CD3 humano e uma quimera humana-murina de MUC16 nos loci de camundongo correspondentes foram implantados com 1×10^6 células MC38/huMUC16 subcutaneamente. Os camundongos foram administrados com anti-MUC16xCD3 ou um controle de isótipo intraperitonealmente (IP) com ou sem um anticorpo biespecífico substituto que reconhece MUC16 humano e CD28

de camundongo, duas vezes por semana ao longo do estudo até o dia 21. O tratamento começou no dia da implantação. O crescimento de tumor foi medido com compassos duas vezes por semana. Os camundongos foram sacrificados 50 dias após a implantação de tumor.

CÁLCULO DO CRESCIMENTO E INIBIÇÃO DO TUMOR SINGÊNICO

[0255] A fim de determinar o volume do tumor com um compasso externo, o maior diâmetro longitudinal (comprimento) e o maior diâmetro transversal (largura) foram determinados. O volume de tumor com base em medições de compasso foi calculado pela fórmula: $\text{Volume} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$. O crescimento do tumor foi monitorado ao longo do tempo com o uso de medidas de calibre de diâmetro X e Y. Os camundongos foram sacrificados quando o tamanho do tumor era maior que 2000 mm^3 . A significância estatística foi determinada utilizando um teste t de Mann-Whitney não paramétrico não emparelhado.

RESULTADOS

[0256] Os tamanhos de tumor no modelo MC38/huMUC16 sob diferentes tratamentos foram resumidos na **Tabela 26**.

TABELA 26: MODELO MC38/HUMUC16. TAMANHO DE TUMOR (MM³) NO DIA 21

Anticorpo (µg)	Tamanho do tumor (mm ³) (média ± SEM)
Controle de isótipo (0,5)	1191 ± 424
Anti-MUC16xCD3 (0,01)	639,5 ± 186,8
Anti-MUC16xmCD28 (0,5)	648,5 ± 129,7
Anti-MUC16xCD3 (0,01) + anti-MUC16xmCD28 (0,5)	167,3 ± 71,9

[0257] Foi testado se os anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da invenção poderiam aumentar a eficácia antitumoral de MUC16xCD3 em um modelo de camundongo singênico em camundongos com um sistema imunológico totalmente intacto. Os camundongos foram geneticamente modificados para expressar CD3 humano e MUC16 humano no lugar dos genes de camundongo usando a tecnologia Velocigene (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D,

Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. *Science Translational Medicine* 19 de junho de 2019: Vol. 11, Edição 497, eaau7534). A linha celular de carcinoma do cólon MC38 foi projetada para expressar MUC16 humano (pLVX.EF1a.MUC16, MC38/hMUC16) e implantada subcutaneamente. Os camundongos foram administrados por injeção intraperitoneal 2x por semana começando no dia do implante (dia 0) com controle de isótipo (Iso Ctrl), 0,01 mg/kg de MUC16xCD3, 0,5 mg/kg de MUC16xmCD28 ou combinação. O crescimento do tumor foi monitorado ao longo do tempo (**Figura 6A**). A monoterapia com MUC16xCD3 ou MUC16xCD28 inibiu significativamente o crescimento do tumor. O crescimento do tumor foi ainda significativamente inibido pelo tratamento de combinação de MUC16xCD3 e MUC16xCD28 (**Tabela 26**). No mesmo experimento, os níveis séricos de citocinas também foram obtidos. A **Figura 6B** mostra os níveis de citocinas em camundongos tratados com diferentes anticorpos e/ou combinações de anticorpos.

[0258] Camundongos humanizados adequados MC38/hMUC16 receberam células tumorais implantadas e foram tratados com controle, os biespecíficos CD3 ou CD28 individuais ou as combinações (**Figuras 6A, 6C e 6D**). No modelo de tumor MUC16, a combinação de biespecíficos CD3 e CD28 forneceu as melhores respostas antitumorais (**Figura 6A**), como também foi observado em ensaios de produção de citocinas (**Figuras 6C e 6D**).

[0259] Para investigar se a adição de um direcionamento do condutor MUC16xCD28 pode aumentar a eficácia em um modelo singênico, camundongos que expressam CD3 humano e no lugar de MUC16 murino, CD28 humano no lugar de CD28 murino e uma molécula quimérica

que contém uma porção de MUC16 humano na qual foram usados os anticorpos biespecíficos exemplificativos da invenção. A linha de células ID8-VEGF foi projetada para expressar MUC16 humano (ID8-VEGF/hMUC16) e implantada intraperitonealmente. Os camundongos foram doseados nos dias 3, 6 e 10 após a implantação do tumor com 1 mg/kg de EGFRvIIIxCD3 ou MUC16xCD3 sozinho ou em combinação com MUC16xCD28. O crescimento do tumor foi monitorado usando ganho de peso (**Figura 5**). O crescimento do tumor foi inibido por MUC16xCD3 e a combinação com MUC16xCD28 atrasou ainda mais o crescimento do tumor.

[0260] Notavelmente, diferente das análises *in vitro* anteriores em que os biespecíficos de CD28 tinham atividade de agente único muito limitada (consultar acima), os biespecíficos de CD28 nesses modelos MC38/hMUC16 singênicos tinham atividade mais notável como agentes únicos. Isso sugeriu que o “sinal 1” já estava sendo ativado em algum grau nesse modelo MC38. Consistente com isso, foi anteriormente demonstrado que as células tumorais MC38 expressam altos níveis de proteínas retrovirais endógenas reativadas, como p15E, e que camundongos C57BL6 podem gerar células T endógenas que reconhecem e respondem a esse neoepitopo (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3^a, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior *in vitro* and *in vivo* antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). Na verdade, foi confirmado que, nos modelos MC38, células T intratumorais responsivas a esse neoantígeno p15E poderiam ser facilmente detectadas. Assim, os CD28-biespecíficos nesse modelo de tumor singênico de MUC16 podem impulsionar as respostas de células T dependentes de TCR/CD3 endógenas, que podem, então, ser adicionalmente

intensificadas ao fornecer ativação de "sinal 1" adicional por meio de um anticorpo biespecífico CD3.

[0261] Há muito se reconhece que a ativação de células T por meio do complexo TCR ("sinal 1") pode ser acentuadamente aumentada por sinais coestimuladores, como aqueles mediados quando o receptor CD28 nas células T envolve seus ligantes (CD80/B7.1 e CD86/B7.2) em células alvo ("sinal 2") (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). De acordo com os dados divulgados no presente documento, o potencial para a coestimulação de CD28 para aumentar a atividade antitumoral de células T foi demonstrado pela primeira vez por estudos em que ligantes B7 foram superexpressados em células tumorais (R. H. Schwartz, Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068 (1992); L. Chen *et al.*, Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* **71**, 1093-1102 (1992)), which showed improved T cell rejection of such B7-expressing tumors. Esse potencial inspirou esforços para avaliar anticorpos ativadores de CD28 em testes em humanos. Tragicamente, o ensaio de 2006 de tal anticorpo (TGN1412) resultou em complicações com risco de vida em todos os seis voluntários humanos (G. Suntharalingam *et al.*, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)), devido à falência de múltiplos órgãos resultante da síndrome de liberação maciça de citocinas (CRS). Essa catástrofe levou à interrupção de qualquer teste adicional de anticorpos ativadores de CD28 em humanos.

[0262] Os anticorpos biespecíficos de CD28 que não ativariam diretamente o CD28, a menos que agrupados nas superfícies das células tumorais, ofereciam a possibilidade de promover a

coestimulação apenas no local do tumor, sem a toxicidade sistêmica dos anticorpos ativadores de CD28 convencionais. Versões iniciais de tais biespecíficos CD28 foram propostas e avaliadas na década de 1990 (C. Renner *et al.*, Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal anticorpos and human T cells. *Science* **264**, 833-835 (1994); G. Jung *et al.*, Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy. *Int J Cancer* **91**, 225-230 (2001); M. Brandl, L. Grosse-Hovest, E. Holler, H. J. Kolb, G. Jung, Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma. *Exp Hematol* **27**, 1264-1270 (1999)); no entanto, a tecnologia inicial disponível na época exigia reticulação química ou fusões de híbrido/hibridoma para criar os bioterapêuticos propostos, e resultou em reagentes subideais que tinham atividade profunda por conta própria, independente de seu agrupamento em células tumorais (uma reminiscência dos anticorpos convencionais CD28, presumivelmente devido à agregação não específica desses biespecíficos). Além disso, essas abordagens iniciais também exigiam a pré-ativação de células T *in vitro*, a fim de observar qualquer atividade antitumoral *in vivo*. Juntos, os resultados clínicos catastróficos com o anticorpo ativador de CD28 TGN1412, bem como as limitações dessas abordagens biespecíficas iniciais de CD28, dissuadiram a exploração adicional dessas abordagens.

[0263] É descrita no presente documento uma nova classe de anticorpos biespecíficos coestimuladores de CD28 que podem promover marcadamente e com segurança a atividade antitumoral, fornecendo um "sinal 2" coestimulador. Esses CD28-biespecíficos têm

atividade limitada por conta própria (na ausência de "sinal 1"), mas podem aumentar marcadamente a atividade antitumoral no cenário de "sinal 1", como pode ser fornecido pelo emparelhamento desses CD28-biespecíficos com a classe emergente de CD3-biespecíficos (ou se esses CD28-biespecíficos forem usados em ambientes em que já existem populações endógenas de células T tumorais específicas). A geração, teste e sucesso dessa nova abordagem biespecífica de CD28 dependeram (1) da utilização de uma plataforma inovadora biespecífica que foi inicialmente desenvolvida para produzir biespecíficos CD3 e que foi recentemente validada tecnologicamente (E. J. Smith *et al.*, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015)) e clinicamente (A. Crawford *et al.*, REGN4018, a novel MUC16xCD3 bispecific T-cell engager for the treatment of ovarian cancer. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018*, (2018)) (Clinicaltrials.gov: NCT02290951, Clinicaltrials.gov: NCT03564340) para esses biespecíficos CD3, e que foi então adaptado de modo a produzir com eficiência biespecíficos CD28 que exibem atividade mínima na ausência de um "sinal 1" específico; (2) do desenvolvimento de múltiplos xenogênicos e singênicos geneticamente humanizados (D. M. Valenzuela *et al.*, High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 652-659 (2003); W. T. Poueymirou *et al.*, F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* **25**, 91-99 (2007)) modelos de tumor animal para avaliar esses biespecíficos CD28 por conta própria e em combinação com biespecíficos CD3; e (3) juntamente com um conhecimento muito mais profundo da síndrome de liberação de citocina e seu desenvolvimento clínico (A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome.

J Immunother Cancer **6**, 56 (2018); D. W. Lee *et al.*, Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188-195 (2014); C. L. Bonifant, H. J. Jackson, R. J. Brentjens, K. J. Curran, Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* **3**, 16011 (2016)) a validação de um modelo de macaco no qual qualquer toxicidade potencial desses biespecíficos de CD28 poderia ser comparada à dos anticorpos ativadores de CD28 convencionais.

[0264] São descritos no presente documento a geração e o teste de anticorpos biespecíficos coestimuladores TSAxCD28 alvejados contra um TSAs para o câncer de ovário (MUC16xCD28). Foi demonstrado que, na ausência do "sinal 1", esses CD28-biespecíficos têm atividade mínima, *in vitro* ou *in vivo*. No entanto, esses biespecíficos CD28 podem ser emparelhados com biespecíficos CD3 para formar "sinapses imunes" artificiais contendo os antígenos tumorais, bem como os complexos TCR e CD28. Além disso, quando emparelhados com biespecíficos CD3 apropriados *in vitro*, esses biespecíficos de CD28 podem promover de maneira eficiente e específica a ativação de células T e a morte de células tumorais de uma maneira dependente de antígeno. Além disso, esses biespecíficos CD28 também intensificam de forma eficiente a atividade antitumoral de biespecíficos CD3 *in vivo*, de uma maneira específica para antígeno tumoral, em modelos de tumor singênico; em tais modelos, os biespecíficos CD28 têm atividade de agente único mínima, a menos que células T específicas de tumor já estejam presentes e, em tais configurações, as mesmas parecem aumentar essa atividade específica de uma maneira dependente de antígeno tumoral. Além disso, a terapia de combinação TSAxCD28 e TSAxCD3 impulsiona significativamente a expansão de um fenótipo de célula T ativada/memória intratumoral *in vivo*. Finalmente, estudos de toxicologia em camundongos imunocompetentes geneticamente

humanizados, bem como em macacos cynomolgus, demonstram que esses biespecíficos exibem atividade limitada e nenhuma toxicidade como agentes únicos, em comparação com os anticorpos ativadores de CD28 convencionais.

[0265] Frequentemente, a caracterização de candidatos clínicos específicos para seres humanos no campo da imuno-oncologia é limitada a testes em modelos de tumor xenogênico com células imunes humanas enxertadas. Embora esses modelos xenogênicos (como o modelo OVCAR3 utilizado) possam ser muito úteis, eles têm limitações. Os camundongos usados em tais modelos xenogênicos não expressam o tumor alvo humano em seus tecidos normais, impedindo, assim, a avaliação do agente de teste no contexto da expressão do alvo no tecido normal. Na verdade, se um alvo também for expressado normalmente em níveis elevados em tecidos normais, isso pode limitar a eficácia antitumoral, desviando o agente de teste do tumor, e pode resultar em toxicidade nesses tecidos normais - nada disso pode ser avaliado em um modelo xenogênico. Uma limitação adicional pode envolver a atividade das células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) enxertadas, transferidas para um camundongo imunodeficiente, que podem diferir das células T hospedeiras normais encontradas em um sistema imunodeficiente. Para superar essas limitações e fornecer melhores modelos para testar candidatos clínicos específicos para seres humanos, camundongos geneticamente humanizados duplos e triplos foram criados. Nesses modelos, os antígenos tumorais foram geneticamente humanizados para permitir sua expressão normal em tecidos hospedeiros apropriados (para MUC16), e os componentes CD3 e/ou CD28 foram geneticamente humanizados para permitir que células hospedeiras imunocompetentes respondessem aos candidatos clínicos específicos para seres humanos. Nesses modelos animais singênicos imunocompetentes

geneticamente humanizados, foi verificado que, assim como os modelos animais xenogênicos, os biespecíficos CD28 para o alvo tumoral MUC16 aumentaram a atividade antitumoral dos seus biespecíficos CD3 apropriados. O aumento semelhante da eficácia antitumoral pelos diferentes biespecíficos de TSAxCD28 (por exemplo, MUC16 e PSMA (dados não são mostrados)) em vários modelos pré-clínicos sugere que essa modalidade terapêutica é robusta e não limitada a um modelo de tumor específico e poderia ter uma utilidade mais ampla como uma nova classe alvo de combinação para imunoterapia. No geral, os resultados destacam que os biespecíficos TSAxCD28 podem realizar sinergia com os biespecíficos TSAxCD3 e podem fornecer uma solução biológica que poderia aumentar significativamente a eficácia dos biespecíficos TSAxCD3 bem estudados, de uma maneira razoavelmente segura e bem tolerada, justificando o teste em ensaios em humanos.

[0266] Os biespecíficos TSAxCD3 representam uma classe emergente promissora de imunoterapia, mas a otimização adicional da atividade antitumoral certamente será necessária em muitos casos. Assim como as abordagens de CAR-T empregaram receptores quiméricos que ativam artificialmente o "sinal 1" e o "sinal 2" para melhorar sua atividade antitumoral (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016); S. L. Maude *et al.*, Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448 (2018)), é mostrado agora o benefício potencial de combinar CD3-específicos (que fornecem "sinal 1") com CD28-biespecíficos (que fornecem "sinal 2") para melhorar a atividade antitumoral. Além dos benefícios práticos que tal abordagem pode ter em relação às terapias de CAR-T - em que não requer uma preparação de terapia celular laboriosa que deve ser

personalizada individualmente para cada paciente, nem requer que os pacientes sejam preventivamente "linfodepletados" via quimioterapia tóxica para que os mesmos possam aceitar essa terapia celular frequentemente associada a efeitos adversos (A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018); C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361-1365 (2018)) – a abordagem biespecífica de acordo com a invenção oferece o potencial para maior eficácia, bem como maior segurança e especificidade de ação. Ou seja, é possível tirar vantagem do “alvejamento combinatório”, emparelhando um CD3-biespecífico para um antígeno com um CD28-biespecífico específico para um segundo antígeno - a eficácia aumentada só ocorrerá em células tumorais que expressam ambos os antígenos - focando, assim, em morte de célula T apenas para células tumorais que expressam ambos os antígenos, enquanto limita a "toxicidade fora do alvo" em tecidos normais que expressam apenas um dos antígenos. Coletivamente, os dados divulgados neste documento sugerem que a combinação de biespecíficos à base de CD28 com biespecíficos à base de CD3 pode fornecer soluções biológicas “disponíveis no mercado” bem toleradas, com atividade antitumoral marcadamente aumentada e sinérgica. O teste inicial dessa possibilidade em humanos ocorrerá esse ano.

EXEMPLO 9. MUC16XCD28 SOZINHO OU EM TERAPIA DE COMBINAÇÃO NÃO INDUZ A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T SISTÊMICAS EM COMPARAÇÃO COM O SUPERAGONISTA CD28 EM MACACOS CYNOMOLGUS

[0267] Anticorpos MUC16xCD28 exemplificativos da invenção potencializam a ativação de MUC16xCD3 de células T de macacos cynomolgus (**Figuras 2F a 2H**). Para determinar a segurança e a tolerabilidade dos anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos

da invenção sozinhos ou em combinação com anti-MUC16xCD3, um estudo de toxicidade de dose única foi realizado em macacos cynomolgus. Macacos cynomolgus fêmeas ou machos foram atribuídos a grupos de tratamento conforme indicado na **Tabela 27**.

[0268] O estudo em macacos cynomolgus foi conduzido de acordo com as diretrizes do IACUC. Macacos cynomolgus machos (3 animais/grupo) receberam uma dose única de cada artigo de teste por meio de infusão intravenosa por aproximadamente 30 minutos (o tratamento de combinação foi administrado como infusão separada por um total de 1 hora). A avaliação da toxicidade foi baseada em observações clínicas, consumo alimentar qualitativo, peso corporal, exames neurológicos, sinais vitais (temperatura corporal, frequência cardíaca, oximetria de pulso e frequência respiratória) e patologia clínica e anatômica. Amostras de sangue e tecido foram coletadas para análise de citocinas, análise de imunofenotipagem, histopatologia e avaliação toxicocinética. Os níveis de PCR foram analisados em um sistema Roche Modular P 800. As citocinas foram medidas por Meso Scale Diagnostics (MSD, Rockville, MD). Para a citometria de fluxo sanguíneo periférico, o sangue foi coletado em tubos de EDTA de potássio, lisado, corado com anti-CD3, anti-Ki67 e anti-ICOS (BD Biosciences), e analisado com FACS Canto II.

[0269] Os animais receberam uma dose única de cada artigo de teste por meio de infusão intravenosa por aproximadamente 30 minutos (o tratamento de combinação foi administrado como infusão separada por um total de 1 hora). A avaliação da toxicidade foi baseada em observações clínicas, consumo alimentar qualitativo, peso corporal, exames neurológicos, sinais vitais (temperatura corporal, frequência cardíaca, oximetria de pulso e frequência respiratória) e patologia clínica e anatômica. Amostras de sangue e tecido foram coletadas para análise de citocinas, análise de imunofenotipagem de FACS, histopatologia e

avaliação toxicocinética. Nenhuma liberação significativa de citocina, marginalização de células T ou regulação crescente do marcador de ativação de células T foi observada após administração de dose única de anti-MUC16xCD28 exemplificativo da invenção a 1 ou 10 mg/kg, MUC16xCD3 a 1 ou 10 mg/kg ou tratamentos de combinação. A **Tabela 27** resume diferentes leituras, incluindo números absolutos de células T, marcador de ativação de células T (ki67), níveis de PCR e citocinas séricas do sangue obtido no ponto de tempo indicado de animais individuais. Além disso, esses resultados foram validados usando ensaios de proliferação de células T humanas com revestimento seco e úmido, que demonstraram que a ancoragem de MUC16xCD28 em placas de ensaio usando um método de revestimento seco ou úmido não induz a ativação de células T na ausência de estímulo CD3 em contraste com um anticorpo superagonista CD28 (**Figura 7**). Na verdade, verificou-se que os anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da invenção, bem como os anticorpos CD28 bivalentes parentais, não conseguiram induzir a proliferação de células T humanas em comparação com o anticorpo superagonista CD28. No geral, o estudo de toxicologia de dose única exploratório em ensaios baseados em células T de macacos e seres humanos *in vitro* sugerem que os anticorpos biespecíficos anti-MUC16xCD28 exemplificativos da invenção são seguros e bem tolerados.

TABELA 27: SUMÁRIO DO ESTUDO DE TOXICIDADE DO MACACO CINOMOLGO

Molécula	Descrição	Dose (mg/kg)	Nº de Animal	Dia 1 - Obs. clínica	Qualquer Obs.	E3(µl)		Células T Ki67+ (E3/µl)		PCR (mg/dl)	Citocina plasmática 5 horas após a dose (pg/ml)						
						Dias 2-4	Pré-teste	5 h	Pré-teste		72 h	24 h	IL-6	IL-8	IL-10	IFN-g	TNF-a
REGN4018	anti-Muc16 x CD3 (hlgG4)	1	1501	-	-	2,28	1,67	0,11	0,10	13,8	10	2	3	BLQ	BLQ	7	BLQ
			1502	-	-	3,12	1,71	0,25	0,29	7,9	24	2	4	BLQ	4	BLQ	BLQ
			1503	-	-	3,84	1,58	0,21	0,17	6	5	2	BLQ	BLQ	BLQ	3	BLQ
bs24963D	anti-Muc16 x CD28 (hlgG4)	1	2501	-	-	3,07	2,40	0,13	0,20	0,4	3	3	BLQ	BLQ	4	3	BLQ
			2502	-	-	1,97	2,73	0,10	0,15	0,1	4	3	3	BLQ	4	4	BLQ
			2503	-	-	1,64	3,05	0,10	0,19	0,2	7	3	4	46	6	4	BLQ
REGN4018 +	anti-Muc16 x CD3 + anti-	1 + 1	3501	-	-	2,89	1,98	0,19	0,10	13,3	24	3	4	47	4	13	BLQ

bs24963D	Muc16 x CD28		3502	-	-	1,62	1,18	0,10	0,06	13,3	22	3	BLQ	80	5	7	BLQ
			3503	-	-	1,80	1,37	0,10	0,09	9,8	7	BLQ	BLQ	BLQ	4	9	BLQ
REGN4018	anti-Muc16 x CD3 (hlgG4)	10	4501	-	-	2,48	0,89	0,13	0,12	14,2	11	4	4	28	4	3	BLQ
			4502	-	-	1,16	0,52	0,10	0,12	7,6	7	4	4	31	BLQ	6	BLQ
			4503	-	-	3,75	1,01	0,23	0,21	2,5	5	4	4	38	4	4	BLQ
bs24963D	anti-Muc16 x CD28 (hlgG4)	10	9501	-	-	1,86	2,91	0,09	0,17	0,1	4	4	4	BLQ	5	3	BLQ
			9502	-	-	0,57	0,96	0,04	0,07	0,2	9	4	4	BLQ	BLQ	4	BLQ
			9503	-	-	1,49	2,98	0,18	0,19	0,5	7	4	5	BLQ	4	3	BLQ
REGN4018 + bs24963D	anti-Muc16 x CD3 + anti-Muc16 x CD28	10 + 10	6501	-	-	3,58	0,75	0,21	0,09	14,3	31	5	3	BLQ	BLQ	7	BLQ
			6502	-	-	3,98	1,29	0,31	0,29	14,6	73	5	3	BLQ	BLQ	38	BLQ
			6503	-	-	2,01	0,79	0,17	0,10	5,3	7	3	3	BLQ	4	BLQ	BLQ
REGN4018 + bs24963D	anti-Muc16 x CD3 + anti-Muc16 x CD28	1 + 10	5501	-	-	1,70	1,37	0,14	0,23	14,2	6	4	4	36	BLQ	6	BLQ
			5502	-	-	3,11	3,24	0,18	0,17	5,5	7	5	4	BLQ	BLQ	4	BLQ
			5503	-	-	2,38	1,85	0,20	0,19	6,2	31	4	4	BLQ	BLQ	2	BLQ
REGN4018 + bs24963D	anti-Muc16 x CD3 + anti-Muc16 x CD28	1 + 1, repetir a dosagem	8501	-	-	3,36	1,04	0,26	0,05	14,4	12	4	4	BLQ	3	11	BLQ
			8502	-	-	2,49	2,09	0,14	0,06	11,7	9	4	5	BLQ	5	7	BLQ
			8503	-	-	5,93	4,73	0,31	0,15	14,6	25	4	4	BLQ	4	4	BLQ
BLQ: Abaixo do Limite de Quantificação																	
LLOQ (limite inferior de quantificação): IFN-g = 37 pg/ml; TNF-a = 3 pg/ml; IL-2 = 2,4 pg/ml; IL-6 = 2 pg/ml; IL-8 = 1,7 pg/ml; IL-4 = 1,8 pg/ml; IL-10 = 3 pg/ml																	

[0270] Amostras de sangue foram coletadas para análise de citocina e imunofenotipagem. Enquanto o CD28-SA administrado a macacos induziu liberação significativa de citocinas, marginação de linfócitos e ativação de células T, foi notável que nenhuma liberação de citocina, marginação de células T ou ativação de células T foi observada após a administração de MUC16xCD28 (**Figuras 8A a 8C e Tabela 27**). No geral, essas observações preliminares sugerem que os biespecíficos de TSAxCD28 são bem tolerados em primatas e não induzem a liberação de citocinas e ativação de células T como é visto com CD28-SA (dados não são mostrados). Deve-se notar que estudos anteriores com CD28-SA em macacos não conseguiram prever a liberação profunda de citocinas e ativação de células T observada em seres humanos (Tegenaro AG, www.circare.org/foia5/tgn1412investigatorbrochure.pdf), e isso foi atribuído a menor expressão de CD28 em macacos (D. Eastwood *et al.*, Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* **161**, 512-526 (2010)). Embora os estudos de tolerabilidade em macacos cynomolgus possam não ser preditivos de SRC em humanos, os fortes sinais observados com CD28-SA em macacos sugerem que

isso passou despercebido para Tegenaro et al. simplesmente porque eles não examinaram os primeiros momentos apropriados em que essas respostas podem ser observadas de maneira robusta.

EXEMPLO 10: LIGAÇÃO DE BS24963D(AB MUC16 X CD28, TAMBÉM REFERIDO COMO REGN5668) E REGN4018 (MUC16 X CD3) PARA LINHAS CELULARES QUE EXPRESSAM MUC16 HUMANO OU DE MACACO CYNOMOLGUS, PARA CÉLULAS PRIMÁRIAS DE PBMC HUMANA OU DE MACACO CYNOMOLGUS, E UMA LINHA DE CÉLULAS T

MATERIAIS E MÉTODOS - SUMÁRIO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

[0271] A análise de citometria de fluxo foi utilizada para determinar a ligação de bs24963D a linhas de células de câncer de ovário humano (OVCAR-3 e PEO1) que expressam endogenamente MUC16 humano e de bs24963D e REGN4018 a células ID8 de camundongo projetadas para expressar MUC16 humano ou de cynomolgus, a células 3T3 projetadas para expressar MUC16 humano, para células T humanas e de macaco cynomolgus e para a linha de células T repórter projetada.

[0272] Resumidamente, 1×10^5 células/poço foram incubadas por 30 minutos a 4°C com uma diluição em série de anticorpos, incluindo bs24963D, REGN4018 e anticorpos de controle (mAb de controle sem ligação de IgG^{P-PVA}, anticorpo biespecífico de controle sem ponte CD28, ou controles parentais de CD28 ou CD3).

[0273] As diluições de anticorpos variaram de 12,2 pM a 200 nM para células T primárias humanas e de macaco cynomolgus e células T repórter projetadas, enquanto 8,1 pM a 133 nM foram escolhidos para células alvo MUC16⁺.

[0274] Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS frio contendo FBS filtrado a 1%, seguido por detecção com um anti-IgG humano marcado com ficoeritrina (PE) (células MUC16⁺) ou IgG

anti-humano marcado com Alexa647 (células CD28⁺).

[0275] Corante LIVE/DEAD reativo a infravermelho próximo (IR) foi adicionado às incubações de células T humanas e de cynomolgus. Os poços que não continham anticorpo ou apenas anticorpo secundário também foram usados como controles.

[0276] Após a incubação com células MUC16⁺ ou a linha de células J.RT3.T3.5/NF-κB-Luc/1G4AB/hCD8αβ/hCD28, as células foram lavadas, ressuspensas em 200 µl de tampão FACS (PBS gelado contendo FBS filtrado a 1% e EDTA a 1 mM) e analisadas por citometria de fluxo em um BD FACS Canto II.

[0277] Após a incubação com células T humanas ou de macaco cynomolgus, as células foram lavadas e coradas com um coquetel de anti-CD2, anti-CD16, anti-CD4 e anti-CD8 em tampão FACS por 20 minutos a 4 °C. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em tampão FACS e bloqueadas em Live/CD2⁺/CD4⁺/CD16⁻ ou Live/CD2⁺/CD8⁺/CD16⁻ e analisadas por citometria de fluxo em um BD LSRFortessa X-20.

[0278] Para determinações de EC₅₀, os valores de MFI medidos foram analisados usando uma equação logística de quatro parâmetros em uma curva de resposta de 9 pontos usando GraphPad Prism. O aumento de dobra no MFI máximo foi determinado tomando a razão entre o MFI mais alto detectado e o MFI de poços contendo apenas anticorpo secundário.

[0279] A citometria de fluxo também foi usada para determinar a ligação de bs24963D e um anticorpo anti-PD-L1 comercial a células de câncer pancreático humano MUC16⁺, células SW1990 e SW1990/hPD-L1. Resumidamente, 2 x 10⁵ células foram incubadas com 5 µl (66,7 nM) bs24963D, anti-PD-L1 (2,5 µl) ou anticorpo de controle não vinculativo conjugado com AlexaFluor647 (bs24963D) ou APC (anti-PD-L1) e incubado em gelo por 30 minutos. As células foram lavadas uma vez com

tampão de coloração, centrifugadas e lavadas com D-PBS. As células foram coradas com 100 µl de diluição 1:1000 de corante de viabilidade violeta fixável LIVE/DEAD e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes em tampão de coloração e ressuspensas em 100 µl de tampão de coloração a 1:1 e solução de cytofix e analisadas por citometria de fluxo usando o citômetro Cytoflex. A ligação dobrada sobre a viabilidade foi calculada dividindo-se MFI de anticorpo de interesse sobre o MFI de viabilidade sozinho.

MATERIAIS E MÉTODOS

BIOENSAIO NF-κB LUCIFERASE REPÓRTER

[0280] A capacidade de bs24963D para aumentar a sinalização mediada por TCR foi avaliada em um ensaio repórter baseado em células T/células de apresentação de antígeno projetadas como mostrado na **Figura 10**. Os TCRs reconhecem complexos MHC/peptídeos específicos e ativam células T por meio de vários fatores de transcrição, como proteína ativadora 1 (AP-1), fator nuclear de células T ativadas (NFAT) ou intensificador de-cadeia-de fator nuclear kappa-light de células B ativadas (NF-κB) (Goldrath, 1999; Nature 402: 255-62) (Shapiro, 1998; J. Immunology; 161 (12): 6455-8). A resposta da célula T é ainda mais refinada por meio do engajamento de receptores coestimuladores, como o CD28, que por sua vez é ativado por seus ligantes endógenos, CD80 ou CD86 e, subsequentemente, potencializa os sinais celulares, como as vias controladas pela transcrição de NF-κB fator, após a ativação do TCR.

[0281] Nesse ensaio, as células T manipuladas são ativadas diretamente através do 1G4 TCR (IG4AB), que reconhece o peptídeo NY-ESO-1 157-165 (NYESO1p) em complexo com a molécula MHC de classe I humana, HLA-A2, e hβ2M exibida em células 3T3 de apresentação de antígeno geneticamente alteradas (Robbins, 2008; J. of Immunology; 180 (9): 6116-31). A ativação de TCR leva à produção de

luciferase, que é impulsionada pelo fator de transcrição NF- κ B nas células T repórter geneticamente alteradas. CD8 facilita a interação TCR/MHC e promove a ativação de células T recrutando-se a proteína tirosina quinase específica de linfócitos (Lck) para o complexo TCR/CD3, aumentando assim a sinalização de TCR por meio da fosforilação de motivos de ativação baseados em tirosina imunorreceptores intracelulares (ITAMs) (Cole, 2012; *Immunology*; 137 (2): 139-48) (Guirado, 2002; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 291 (3): 574-81).

[0282] Diluições em série em duas vezes de bs24963D, controle sem ponte (anticorpo biespecífico não TAAxCD28) ou um controle sem ligação (39 pM a 10 nM) foram adicionadas em duplicata a 5×10^4 células T repórter geneticamente alteradas (J.RT3.T3.5/NF- κ B-Luc/1G4AB/hCD8 $\alpha\beta$ /hCD28) por poço na presença de $1,5 \times 10^4$ células apresentadoras de antígeno que eram MUC16⁻ (3T3/h β 2M/HLA-A2/NYESO1p) ou MUC16⁺ (3T3/h β 2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16). As diluições de anticorpos e o bioensaio foram realizados em meio completo (RPMI suplementado com FBS a 10% e um coquetel de penicilina, estreptomicina e L-glutamina). Os poços sem anticorpos foram incluídos como controles adicionais e usados para calcular o aumento da atividade e os valores de EC₅₀. As placas foram incubadas a 37°C e CO₂ a 5% por 5 horas e, em seguida, o substrato de luciferase ONE-Glo (100 μ l) foi adicionado a cada poço. A atividade da luciferase foi registrada como um sinal de luminescência usando o leitor de placas ENVISION expresso como unidades de luz relativa (RLU). Os valores RLU detectados foram analisados por uma equação logística de 4 parâmetros em uma curva de resposta de 10 pontos usando GraphPad Prism.

[0283] O sinal de ativação máximo foi determinado como a resposta RLU máxima média detectada dentro da faixa de concentração de anticorpo testada. O aumento de dobra na atividade foi calculado como a

razão do valor médio de RLU mais alto registrado dentro da faixa de concentração de anticorpo testado sobre o valor médio de RLU registrado na ausência do anticorpo.

ENSAIOS DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T PARA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T E LIBERAÇÃO DE IL-2

[0284] A capacidade de bs24963D de mediar a liberação de IL-2 e a proliferação de células T na presença de uma concentração constante de REGN4018 (avaliada nas linhas de células de câncer de ovário humano OVCAR-3 e PEO1) ou na presença de uma concentração constante de cemiplimabe (avaliada em linhas de células de câncer pancreático humano [SW1990 e SW1990/hPD-L1]) foi determinado usando ensaios de ativação de células T com células T primárias humanas enriquecidas de 3 ou 2 doadores, respectivamente.

ISOLAMENTO DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS

[0285] PBMC humanas foram isoladas de 4 pacotes de leucócitos de doadores saudáveis. Para os doadores 555014 e 555109, PBMC foram isoladas de sangue periférico usando centrifugação em gradiente de densidade. Resumidamente, 15 ml de Ficoll Plaque Plus foram adicionados a tubos cônicos de 50 ml e, subsequentemente, 30 ml de sangue diluído a 1:1 com PBS contendo FBS a 2% foram colocados em camadas na parte superior. Após 30 minutos de centrifugação a 400 xg, sem o freio, a camada de células mononucleares foi transferida para um tubo novo, diluída 5x com PBS contendo FBS a 2% e centrifugada por 8 minutos a 300 x g. Para os doadores 555131 e 555129, PBMC foram isoladas de sangue periférico de um doador saudável usando EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit da Stem Cell Technologies e seguindo o protocolo do fabricante. PBMC isoladas foram congeladas em FBS contendo DMSO a 10%. Para o isolamento de células T CD3⁺, frascos congelados de PBMC foram descongelados em banho-maria a 37 °C e diluídos em meio de estimulação (meio de cultura de células X-VIVO 15

suplementado com FBS a 10%, HEPES, NaPyr, NEAA e 0,01 mM de β -mercaptoetanol [BME]) contendo 50 U/ml de Benzonase[®] Nuclease. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, ressuspensas em tampão EasySep e isoladas usando o kit StemCell Technologies EasySep T-Cell Isolation seguindo o protocolo do fabricante.

ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T COM CÉLULAS HUMANAS OVCAR-3, PEO1, SW1990, SW1990/HPD-L1 E CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS

[0286] Células T CD3⁺, ressuspensas em meio de estimulação (meio de cultura de células X-VIVO 15 suplementado com FBS a 10%, HEPES, NaPyr, NEAA e 0,01 mM de BME), foram colocadas em placas de fundo redondo de 96 poços a uma concentração de 1×10^5 células/poço. As células OVCAR-3, PEO1, SW1990 ou SW1990/hPD-L1 foram tratadas com 25 μ g/ml (OVCAR-3), 10 μ g/ml (PEO1) ou 30 μ g/ml (SW1990 e SW1990/hPD-L1) mitomicina C para interromper a proliferação. Após incubação durante 1 hora a 37 °C, de CO₂ a 5%, as células tratadas com mitomicina C foram lavadas 3 vezes com D-PBS contendo de FBS a 2%, seguido por um final de ressuspensão em meio de estimulação. As células OVCAR-3, PEO1, SW1990 e SW1990/hPD-L1 foram adicionadas aos poços contendo células T CD3⁺ a uma concentração final de 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ células ou 5×10^4 células, respectivamente, para OVCAR-3, PEO1 e ambas as células SW1990. Uma concentração constante de REGN4018 ou anticorpo biespecífico de controle sem ponte de CD3 (5 nM), ou cemiplimabe ou controle de IgG4^P sem ligação (20 nM), foi adicionada aos poços contendo células OVCAR-3, PEO1, SW1990 ou SW1990/hPD-L1. Subsequentemente, bs24963D, controle não TAAxCD28 ou controle de não ligação, os anticorpos foram titulados de 7,6 pM a 500 nM em uma série de diluição de 1:4 e adicionados aos poços. O ponto final da curva de concentração de 10 pontos não continha anticorpos e foi usado para calcular o aumento

da atividade. Após incubação das placas por 72 (OVCAR-3 e PEO1) ou 96 (SW1990 e SW1990/hPD-L1) horas a 37 °C, CO₂ a 5%, 50 µl de sobrenadante de meio foram coletados para medir a liberação de IL-2 antes de tratamento com [metil-³H]-timidina para quantificar a proliferação.

[0287] Para a liberação de IL-2, 5 µl (para ensaios usando células OVCAR-3 e PEO1) ou 20 µl (para ensaios usando células SW1990 e SW1990/hPD-L1) do sobrenadante foram testados usando o kit Alpha-LISA de IL-2 humana de acordo com o protocolo do fabricante. As medições de IL-2 foram adquiridas no leitor de placas multilabel da Perkin Elmer Envision e relatadas como unidades de fluorescência relativa (RFU).

[0288] Para os ensaios de proliferação, 50 µl de [Metil-³H]-Timidina diluída a 2mCi/ml em meio de estimulação foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por 6 horas (para ensaios usando células OVCAR-3 e PEO1) ou 16 horas (para ensaios usando células SW1990 e SW1990/hPD-L1). [Metil-³H]-timidina serão incorporados em maiores quantidades em células em divisão. Após a incubação, as células foram colhidas em placas de filtro e preparadas para a medição no instrumento Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount NXT.

[0289] Todas as diluições em série foram testadas em triplicado quanto à liberação e proliferação de IL-2. Os valores de EC₅₀ dos anticorpos foram determinados a partir de uma equação logística de quatro parâmetros em uma curva de dose-resposta de 10 pontos com o uso do software GraphPad Prism™. Os níveis máximos de liberação e proliferação de IL-2 são dados como a resposta máxima média detectada dentro da faixa de dosagem testada. O aumento de dobra da liberação máxima de IL-2 ou proliferação de células T mediada por bs24963D foi calculado em relação à liberação máxima de IL-2 ou proliferação mediada por nenhum anticorpo.

[0290] A capacidade de bs24963D para ativar células T foi avaliada em um ensaio no qual células apresentadoras de antígeno estimuladoras fornecem o sinal 1. Este ensaio usou células T repórter J.RT3.T3.5 projetadas para expressar CD8 humano, CD28 humano, um TCR descrito na literatura (1G4) que reconhece um peptídeo NY-ESO-1 (NYESO1p) em complexo com HLA-A2, e um repórter NF-κB-Luciferase. As células apresentadoras de antígeno estimuladoras que fornecem o sinal 1 eram células 3T3 projetadas para expressar HLA-A2, hβ2M e NYESO1p com ou sem MUC16 humano (hMUC16). Um anticorpo biespecífico de controle sem ponte de CD28 (não TAAxCD28) e um mAb de controle de não ligação (IgG4^{P-PVA}) foram testados em paralelo com bs24963D. A sinalização de NF-κB foi medida usando um reagente luminescente para detectar a atividade do repórter da luciferase. Os resultados são resumidos na **Tabela 28**.

[0291] Nesse sistema de teste, bs24963D mediou um aumento dependente da concentração na sinalização de NF-κB nas células T repórter na presença das células de apresentação de antígeno MUC16⁺; nenhuma atividade foi observada usando células sem expressão de MUC16 (**Figuras 11A e 11B**). Nenhum aumento na sinalização de NF-κB foi observado com o anticorpo biespecífico de controle sem ponte de CD28.

TABELA 28: SUMÁRIO DA ATIVAÇÃO DE NF-KB-LUCIFERASE MEDIADA POR BS24963D

Anticorpo	Células de apresentação de antígeno (+/- MUC16)					
	3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16			3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p		
	EC ₅₀ (M)	RLU Máx. ^a	Aumento de dobras	EC ₅₀ (M)	RLU Máx. ^a	Aumento de dobras
bs24963D	2,88 x 10 ⁻¹⁰	254.300	2,11	ND	65.920	1,00
Não TAAxCD28	ND	133.220	1,24	ND	64.740	1,02

^a A RLU máxima é o valor médio de RLU mais alto observado dentro da faixa de concentração de anticorpos testada (39 pM a 10 nM).

^b Aumento da dobra da RLU máxima mediado por bs24963D ou não TAAxCD28 foi calculado em relação à RLU máxima sem mediação de

nenhum anticorpo.

Abreviações: ND, não determinado porque não foi observado um aumento dependente da concentração na atividade da luciferase

EXEMPLO 11. AVALIAÇÃO DE BS24963D (ANTI-MUC16 X ANTI-CD28) - LIBERAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE IL-2 MEDIADA DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE REGN4018 (ANTI-MUC16 X ANTI-CD3) OU CEMLIPLIMABE (UM ANTICORPO ANTAGONISTA DE PD-1)

[0292] A capacidade de bs24963D para ativar células T primárias humanas, conforme determinado pela liberação de IL-2 e proliferação de células T, foi avaliada na presença de 2 diferentes linhas de células de câncer de ovário humano MUC16⁺ (OVCAR-3 e PEO1). Como essas células não fornecem sinal 1 suficiente de uma resposta alogênica, uma concentração fixa de REGN4018 (um anticorpo biespecífico MUC16 X CD3) foi incluída para fornecer o sinal 1. Os resultados para as células OVCAR-3 e PEO1 estão resumidos na **Tabela 29** para a liberação de IL-2 e na **Tabela 30** para a proliferação.

[0293] A capacidade de bs24963D para ativar células T primárias humanas, conforme determinado pela liberação de IL-2 e proliferação de células T, foi avaliada na presença de uma linha de células de câncer pancreático humano MUC16⁺ (SW1990) e SW1990 geneticamente alterada para superexpressar PD-L1 humano (SW1990/hPD-L1). Ambas as linhas celulares fornecem uma resposta alogênica que é suficiente para servir como sinal 1. Além disso, a capacidade de concentrações fixas de cemiplimabe (20 nM) para aumentar os efeitos de bs24963D também foi avaliada. Os resultados para as células SW1990 e SW1990/hPD-L1 estão resumidos na **Tabela 31** para a liberação de IL-2 e na **Tabela 32** para a proliferação.

CAPACIDADE DE BS24963D (REGN5668) PARA AUMENTAR A LIBERAÇÃO DE IL-2 E A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS

HUMANAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE REGN4018 COM CÉLULAS ALVO OVCAR-3 E PEO1

[0294] Quando incubado com células cancerosas OVCAR-3 e PEO1, bs24963D mediou o aumento dependente da concentração da liberação de IL-2 a partir de (**Figura 12**) e proliferação de (**Figura 13**) células T humanas apenas na presença de REGN4018. Os anticorpos biespecíficos de controle sem ponte CD3 e CD28 não aumentaram a liberação de IL-2 na presença ou ausência de REGN4018.

[0295] Neste ensaio, REGN4018 a 5 nM sozinho não aumentou a liberação de IL-2, mas mostrou um aumento moderado da proliferação de células T em relação ao controle de não ligação.

TABELA 29: SUMÁRIO DA INTENSIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE IL-2 MEDIADA POR BS24963D A PARTIR DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE REGN4018 COM CÉLULAS ALVO OVCAR-3 E PEO1

Linha de Célula Alvo	Doador	Ab em concentração fixa (5 nM)	Anticorpo testado em concentrações variáveis (7,6 pM a 500 nM)	Liberação de IL-2 de células T primárias humanas		
				EC ₅₀ (M)	IL-2 máx. ^a (RFU)	Aumento de dobras ^b (IL-2)
OVCAR-3	Doador 555014	REGN4018	bs24963D	7,07 x 10 ⁻¹⁰	46931	20,01
			Não TAAxCD28	NC	4741	1,89
		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	1361	2,75
			Não TAAxCD28	NC	3033	6,62
	Doador 555109	REGN4018	bs24963D	1,22 x 10 ⁻⁹	36725	32,10
			Não TAAxCD28	NC	1638	1,38
		Não TAAxCD3	bs24963D	ND	893	1,82
			Não TAAxCD28	NC	1403	2,84
	Doador 555131	REGN4018	bs24963D	5,90 x 10 ⁻¹⁰	46209	13,08
			Não TAAxCD28	NC	4443	1,33
		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	1814	2,71
			Não TAAxCD28	NC	3136	5,95
PEO1	Doador 555014	REGN4018	bs24963D	1,95 x 10 ⁻⁹	31024	30,30
			Não TAAxCD28	NC	2312	2,16
		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	2490	5,56
			Não TAAxCD28	NC	2776	6,12
	Doador 555109	REGN4018	bs24963D	3,10 x 10 ⁻⁹	16421	20,03

		Não TAAxCD3	Não TAAxCD28	ND	897	1,33
			bs24963D	NC	2039	4,36
			Não TAAxCD28	NC	1360	2,35
	Doador 555014	REGN4018	bs24963D	$2,42 \times 10^{-9}$	29217	25,70
			Não TAAxCD28	NC	2175	1,82
		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	2911	5,77
Não TAAxCD28	NC		2443	4,42		

^a A concentração máxima de IL-2 é o valor médio de concentração de IL-2 mais alto registrado dentro da faixa de concentração de anticorpo testado.

^b Aumento da liberação máxima de IL-2 mediada por bs24963D, na presença ou ausência de REGN4018, foi calculado em relação à liberação de IL-2 máxima mediada por nenhum anticorpo.

Abreviaturas: NC, Não calculado porque os dados não se ajustaram a uma equação logística de 4 parâmetros, não determinado porque não foi observado um aumento dependente da concentração na liberação de IL-2.

TABELA 30: SUMÁRIO DA INTENSIFICAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO MEDIADA POR BS24963D DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE REGN4018 COM CÉLULAS ALVO OVCAR-3 E PEO1

Linha de Célula Alvo	Doador	Ab em concentração fixa (5 nM)	Anticorpo testado em concentrações variáveis (7,6 µM a 500 nM)	Proliferação de células T		
				EC ₅₀ (M)	Proliferação máxima ^a (CPM)	Aumento de dobras ^b (proliferação)
OVCAR-3	Doador 555014	REGN4018	bs24963D	$8,89 \times 10^{-11}$	13968	2,03
			Não TAAxCD28	NC	11260	1,59
		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	336	1,38
			Não TAAxCD28	NC	579	1,60
	Doador 555109	REGN4018	bs24963D	$9,45 \times 10^{-11}$	14818	3,18
			Não TAAxCD28	$4,61 \times 10^{-8}$	8141	1,66
		Não TAAxCD3	bs24963D	ND	416	1,37
			Não TAAxCD28	ND	475	1,33
	Doador 555131	REGN4018	bs24963D	$2,47 \times 10^{-11}$	13607	1,66
			Não TAAxCD28	NC	10154	1,16
		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	622	1,82
			Não TAAxCD28	NC	562	1,68
PEO1	Doador 555014	REGN4018	bs24963D	$1,73 \times 10^{-10}$	9605	3,27
			Não TAAxCD28	NC	6953	2,26

		Não TAAxCD3	bs24963D	NC	603	2,58
			Não TAAxCD28	NC	551	3,09
Doador 555109	REGN4018		bs24963D	$4,04 \times 10^{-10}$	10304	8,42
			Não TAAxCD28	NC	4888	4,62
	Não TAAxCD3		bs24963D	NC	733	2,84
			Não TAAxCD28	NC	419	1,72
Doador 555014	REGN4018		bs24963D	$2,22 \times 10^{-10}$	10335	3,69
			Não TAAxCD28	$4,22 \times 10^{-9}$	5631	2,06
	Não TAAxCD3		bs24963D	NC	835	4,44
			Não TAAxCD28	NC	523	2,29

^aA proliferação máxima é o valor médio de CPM mais alto registrado dentro da faixa de concentração de anticorpo testada.

^bAumento da proliferação máxima de células T mediada por bs24963D, na presença ou ausência de REGN4018, foi calculado em relação à proliferação máxima mediada na ausência de bs24963D ou controle não TAAxCD28.

Abreviaturas: NC, não calculado porque os dados não se ajustam a uma equação logística de quatro parâmetros; ND, não determinado porque um aumento dependente da concentração na proliferação não foi observado

CAPACIDADE DE BS24963D (REGN5668) PARA AUMENTAR A LIBERAÇÃO DE IL-2 E A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CEMIPLIMABE COM CÉLULAS ALVO SW1990 E SW1990/HPD-L1

[0296] Quando incubado com células de câncer pancreático humano SW1990 e SW1990/hPD-L1 MUC16⁺, bs24963D mediou o aumento dependente da concentração da liberação de IL-2 de (**Figura 14**) e proliferação de (**Figura 15**) células T humanas na presença e ausência de cemiplimabe. A superexpressão de PD-L1 humano em células SW1990 suprimiu IL-2 e a proliferação de células T na presença de bs24963D e estas foram modestamente aumentadas pela adição de cemiplimabe. Em altas concentrações, o anticorpo biespecífico de controle sem ponte CD28 mediou alguma liberação de IL-2 na presença de células SW1990 e SW1990/hPD-L1. Na ausência de bs24963D,

cemiplimabe não aumentou a liberação de IL-2 ou a proliferação de células T em relação ao anticorpo biespecífico de controle sem ponte de CD28.

TABELA 31: SUMÁRIO DA INTENSIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE IL-2 MEDIADA POR BS24963D A PARTIR DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CEMIPLIMABE COM CÉLULAS ALVO SW1990 E SW1990/HPD-L1

Linha de Célula Alvo	Doador	Ab em concentração fixa (20 nM)	Anticorpo testado em concentrações variáveis (7,6 pM a 500 nM)	Liberação de IL-2 de células T primárias humanas		
				EC ₅₀ (M)	IL-2 máx. ^a (RFU)	Aumento de dobras ^b (IL-2)
SW1990	Doador 555109	cemiplimabe	bs24963D	2,98 x 10 ⁹	3773	3,31
			Não TAAxCD28	ND	1415	1,98
		Controle de IgG4 ^P	bs24963D	2,31 x 10 ⁹	2922	4,83
			Não TAAxCD28	ND	944	1,31
	Doador 555129	cemiplimabe	bs24963D	8,60 x 10 ⁻¹⁰	4833	3,39
			Não TAAxCD28	NC	2927	2,28
		Controle de IgG4 ^P	bs24963D	1,21 x 10 ⁹	3589	2,89
			Não TAAxCD28	NC	2027	1,51
SW1990/hPD-L1	Doador 555109	cemiplimabe	bs24963D	1,01 x 10 ⁹	1692	2,73
			Não TAAxCD28	NC	1102	1,60
		Controle de IgG4 ^P	bs24963D	2,55 x 10 ⁹	1053	1,70
			Não TAAxCD28	ND	616	1,23
	Doador 555129	cemiplimabe	bs24963D	1,41 x 10 ⁹	3391	2,33
			Não TAAxCD28	NC	1977	1,57
		Controle de IgG4 ^P	bs24963D	2,22 x 10 ⁹	2161	2,14
			Não TAAxCD28	ND	1459	1,49

^aA concentração máxima de IL-2 é o valor médio de concentração de IL-2 mais alto registrado dentro da faixa de concentração de anticorpo testado.

^bAumento da liberação máxima de IL-2 mediada por bs24963D, na presença ou ausência de cemiplimabe, foi calculado em relação à liberação máxima de IL-2 sem mediação de anticorpo.

Abreviaturas: NC, não calculado porque os dados não se ajustavam a uma equação logística de quatro parâmetros; ND, não determinado porque um aumento dependente da concentração na liberação de IL-2 não foi observado

TABELA 32: SUMÁRIO DA INTENSIFICAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO

**MEDIADA POR BS24963D DE CÉLULAS T PRIMÁRIAS HUMANAS
NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CEMIPLIMABE COM CÉLULAS
ALVO SW1990 E SW1990/HPD-L1**

Linha de Célula Alvo	Doador	Ab em concentração fixa (20 nM)	Anticorpo testado em concentrações variáveis (7,6 pM a 500 nM)	Proliferação de células T		
				EC ₅₀ (M)	Proliferação máxima ^a (CPM)	Aumento de dobras ^b (proliferação)
SW1990	Doador 555109	cemiplimabe	bs24963D	1,68 x 10 ⁻⁹	557	4,52
			Não TAAxCD28	ND	161	1,41
		Controle de IgG4 ⁺	bs24963D	2,86 x 10 ⁻⁹	421	4,36
			Não TAAxCD28	ND	123	1,46
	Doador 555129	cemiplimabe	bs24963D	4,59 x 10 ⁻¹⁰	545	2,47
			Não TAAxCD28	ND	279	1,66
		Controle de IgG4 ⁺	bs24963D	4,83 x 10 ⁻¹⁰	569	2,17
			Não TAAxCD28	ND	353	1,46
SW1990/HPD-L1	Doador 555109	cemiplimabe	bs24963D	1,40 x 10 ⁻⁹	279	4,70
			Não TAAxCD28	ND	151	1,98
		Controle de IgG4 ⁺	bs24963D	1,54 x 10 ⁻⁹	140	2,35
			Não TAAxCD28	ND	84,0	1,42
	Doador 555129	cemiplimabe	bs24963D	2,53 x 10 ⁻⁹	601	3,20
			Não TAAxCD28	NC	222	1,73
		Controle de IgG4 ⁺	bs24963D	1,66 x 10 ⁻⁹	333	2,74
			Não TAAxCD28	ND	146	1,62

^aA proliferação máxima é o valor médio de CPM mais alto registrado dentro da faixa de concentração de anticorpo testada.

^bAumento da proliferação máxima de células T mediada por bs24963D, na presença ou ausência de cemiplimabe, foi calculado em relação à proliferação máxima mediada na ausência de bs24963D ou controle não TAAxCD28.

Abreviaturas: NC, não calculado porque os dados não se ajustavam a uma equação logística de quatro parâmetros; ND, não determinado porque um aumento dependente da concentração na proliferação não foi observado

[0297] A presente invenção não deve ser limitada quanto ao escopo pelas modalidades específicas descritas no presente documento. De fato, várias modificações da invenção, além daquelas descritas no presente documento, irão se tornar evidentes para aqueles versados na

técnica a partir da descrição supracitada. Tais modificações devem estar dentro do escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro domínio de ligação ao antígeno (D1) que se liga ao CD28 humano com uma K_D inferior a cerca de 2×10^{-7} M, conforme medido pela ressonância plasmônica de superfície em 37°C ; e

b) um segundo domínio de ligação ao antígeno (D2) que se liga especificamente a um antígeno de membrana da mucina 16 humana (MUC16) em uma célula tumoral alvo, com uma K_D inferior a cerca de 10^{-9} M, conforme medido pela ressonância plasmônica de superfície em 37°C .

2. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica se liga à superfície de células T humanas com um EC_{50} inferior a cerca de 10^{-5} M, conforme medido por um ensaio de ligação FACS *in vitro*.

3. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica se liga à superfície de células T de cynomolgus com uma EC_{50} inferior a cerca de 6×10^{-6} M, conforme medido por um ensaio de ligação FACS *in vitro*.

4. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica se liga à superfície de linhas de células que expressam MUC16 com um EC_{50} inferior a cerca de 10^{-9} M, conforme medido por um ensaio de ligação FACS *in vitro*.

5. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica demonstra um efeito coestimulador

quando usada em combinação com um anticorpo biespecífico anti-MUC16 X CD3 e testada em células alvo que expressam MUC16.

6. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o efeito coestimulador é mostrado por um ou mais dos seguintes: (a) a capacidade de ativar e direcionar células T humanas para matar uma célula alvo que expressa MUC16; (b) a capacidade de regulação crescente de PD-1 em células T; (c) a capacidade de aumentar a liberação das citocinas IFN gama de PBMC; (d) a capacidade de esgotar as células tumorais; ou (f) a capacidade de aperfeiçoar a eliminação do tumor; e/ou (g) a falta de indução de ativação de célula T sistêmica.

7. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o efeito coestimulador é ainda mostrado (g) medindo-se a produção de citocina IL-2 usando um ensaio funcional de célula T CD4⁺ primária/APC.

8. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a célula tumoral alvo é uma célula de câncer de ovário.

9. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno (D1) compreende:

a) três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas em uma região variável de cadeia pesada (HCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18 e 42; e

b) três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas dentro de uma região variável de cadeia leve (LCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:

10 e 34.

10. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) uma HCDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 20 e 44, uma HCDR2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 22 e 46, e uma HCDR3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 24 e 48.

11. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) uma LCDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12 e 36, uma LCDR2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 14 e 38, e uma LCDR3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 16 e 40.

12. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compreende:

a) um conjunto de CDRs de HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), em que o conjunto compreende sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20, 22, 24 e 44, 46, 48, e um conjunto de CDRs de LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), em que o conjunto compreende sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 14, 16 e 36, 38, 40.

13. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de

acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compreende um par HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18/10; e 42/34.

14. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende:

a) três HCDRs contidas em uma HCVR que compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2 e 26; e

b) três LCDRs contidas em um LCVR que compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10 e 34.

15. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende:

a) uma HCDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 4 e 28;

b) uma HCDR2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 6 e 30 e

c) uma HCDR3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8 e 32.

16. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende:

a) uma LCDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:

12 e 36, uma LCDR2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 14 e 38, e uma LCDR3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 16 e 40.

17. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende:

a) um conjunto de CDRs de HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), em que o conjunto compreende sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8; e 28, 30, 32; e um conjunto de CDRs de LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), em que o conjunto compreende sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 14, 16; e 36, 38, 40.

18. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro domínio de ligação ao antígeno que compreende CDRs de HCVR que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 20, 22, 24, e CDRs de LCVR que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 12, 14, 16; e

b) um segundo domínio de ligação ao antígeno que compreende CDRs de HCVR que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 4, 6, 8, e CDRs de LCVR que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 12, 14, 16.

19. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro domínio de ligação ao antígeno que

compreende HCDRs que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 44, 46, 48, e LCDRs que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 36, 38, 40; e

b) um segundo domínio de ligação ao antígeno que compreende HCDRs que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 28, 30, 32, e LCDRs que compreendem sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 36, 38, 40.

20. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um primeiro domínio de ligação ao antígeno que compreende um par de HCVR/LCVR que compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18/10; e

b) um segundo domínio de ligação ao antígeno que compreende um par de HCVR/LCVR que compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2/10.

21. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que

a) o primeiro domínio de ligação ao antígeno compreende um par de HCVR/LCVR que compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 42/34; e

b) o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende um par de HCVR/LCVR que compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 26/34.

22. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada caracterizada pelo fato de que compete pela ligação a MUC16, ou se liga ao mesmo epitopo em MUC16, como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação ao antígeno que tem um par de HCVR/LCVR que compreende

as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18/10 ou 42/34 e um segundo domínio de ligação ao antígeno que tem um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2/10 ou 26/34.

23. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada caracterizada pelo fato de que compete pela ligação a CD28, ou se liga ao mesmo epitopo em CD28 humano, como um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende um primeiro domínio de ligação ao antígeno que tem um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18/10 ou 42/34 e um segundo domínio de ligação ao antígeno que tem um par de HCVR/LCVR que compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2/10 ou 26/34.

24. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ligação ao antígeno biespecífica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 23, e um diluente ou veículo farmacologicamente aceitável.

25. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo biespecífico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23.

26. Vetor de expressão caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico, como definido na reivindicação 25.

27. Célula hospedeira caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão, como definido na reivindicação 26.

28. Método para inibir o crescimento de um tumor de célula ovariana em um indivíduo caracterizado pelo fato de que compreende administrar um anticorpo biespecífico isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23, ou uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 24, ao indivíduo.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado

pelo fato de que compreende ainda a administração de um segundo agente terapêutico.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um agente antitumoral, radioterapia, um conjugado de fármaco-anticorpo, um anticorpo biespecífico conjugado a um agente antitumoral, um inibidor de via de sinalização ou combinações dos mesmos.

31. Método de tratamento de um paciente que sofre de câncer de ovário ou de outra malignidade celular que expressa MUC16 caracterizado pelo fato de que compreende administrar um anticorpo biespecífico isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23, ou uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 24, ao indivíduo.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a administração de um segundo agente terapêutico.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um agente antitumoral, radioterapia, um conjugado de fármaco-anticorpo, um anticorpo biespecífico conjugado com um agente antitumoral, um inibidor de via de sinalização ou combinações dos mesmos.

34. Método, de acordo com a reivindicação 29 ou 32, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é um anticorpo biespecífico diferente que compreende um primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga ao mesmo antígeno alvo de tumor e um segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga a CD3 nas células T.

35. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno induz citotoxicidade

mediada por células T de células ovarianas humanas.

36. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD28 humano, e um segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 humana.

37. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno se liga às células T humanas que expressam CD28 com um valor de EC_{50} entre 1×10^{-12} M a 10×10^{-6} M.

38. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno se liga a células T humanas que expressam CD28 com um valor de EC_{50} entre 1×10^{-9} M a 10×10^{-6} M.

39. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 38, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno se liga a células humanas que expressam CD28 humano e células de macaco cynomolgus que expressam CD28 de cynomolgus.

40. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 38, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno induz a liberação de citocina e a regulação positiva de CD25 no sangue total humano.

41. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 38, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno induz citotoxicidade mediada por células T de células ovarianas humanas.

42. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 41, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga

especificamente ao CD28 humano compreende as regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) de uma região variável de cadeia pesada (HCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18 e 42, e regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) de uma região variável de cadeia leve (LCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10 e 34.

43. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao MUC16 humano compreende as regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) de uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende SEQ ID NOs: 2 e 26, e as regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) de uma região variável da cadeia leve (LCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10 e 34.

44. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 humano compreende três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), em que HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20 e 44; em que HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do

grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22 e 46; em que HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24 e 48, em que LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 12 e 36 em que LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38 e em que LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 16 e 40.

45. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao MUC16 humano compreende três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três regiões determinantes da complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), em que HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4 e 28; em que HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6 e 30; em que HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8 e 32, em que LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 12 e 36, em que LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38 e em que LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16 e 40.

46. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato

de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD28 humano compreende três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), e em que o segundo domínio de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao MUC16 humano compreende três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3);

em que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compreende uma HCDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20 e 44; em que HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22 e 46; em que HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24 e 48, em que LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12 e 36, em que LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38 e em que LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16 e 40; e

em que o segundo domínio de ligação ao antígeno compreende uma HCDR1 que compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 4 e 28, em que HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 6 e 30, em que HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos selecionada a

partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8 e 32, em que LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 12 e 36, em que LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 14 e 38 e em que LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 16 e 40.

47. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD28 humano com uma proteína de ligação ao antígeno de referência que compreende três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), em que HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20 e 44; em que HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22 e 46; em que HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24 e 48, em que LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12 e 36, em que LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38 e em que LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16 e 40.

48. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compete por ligação a CD28 humano com uma proteína de ligação ao antígeno de referência

compreende uma região variável de cadeia pesa (HCDR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18 e 42, e uma região variável de cadeia leve (LCDR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 10 e 34.

49. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno compete pela ligação ao MUC16 humano com uma proteína de ligação ao antígeno de referência que compreende três regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três leves regiões determinantes de complementaridade da cadeia (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), em que HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4 e 28, em que HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6 e 30, em que HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8 e 32, em que LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12 e 36, em que LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14 e 38 e em que LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16 e 40.

50. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o segundo domínio de ligação ao antígeno compete por ligação a MUC16 humano com uma proteína de ligação ao antígeno de referência compreende uma região variável de cadeia pesa (HCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do

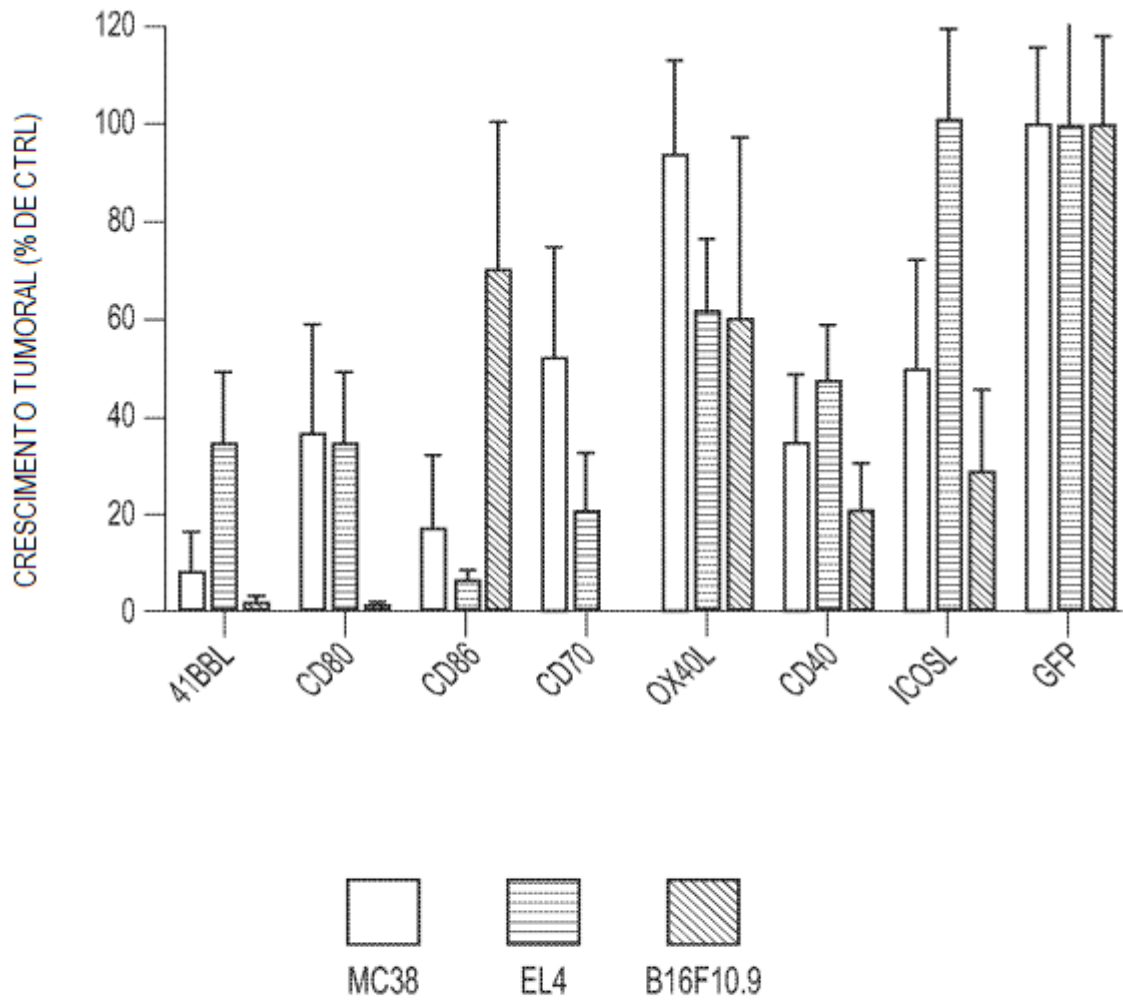
grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 e 26, e uma região variável de cadeia leve (LCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 10 e 34.

51. Molécula de ligação ao antígeno biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD28 humano com uma proteína de ligação ao antígeno de referência que compreende uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18 e 42, e uma região variável de cadeia leve (LCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10 e 34, e em que o segundo domínio de ligação ao antígeno compete pela ligação ao MUC16 humano com uma proteína de ligação ao antígeno de referência que compreende uma região variável da cadeia pesada (HCVR) que compreende a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 e 26, e uma região variável da cadeia leve (LCVR) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10 e 34.

52. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica, como definida em qualquer uma das reivindicações 36 a 51, e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

53. Método para tratar um câncer de ovário em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 52.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 34 e 53, caracterizado pelo fato de que a molécula de ligação ao antígeno biespecífica é administrada em uma dose fixa.

**FIG. 1**

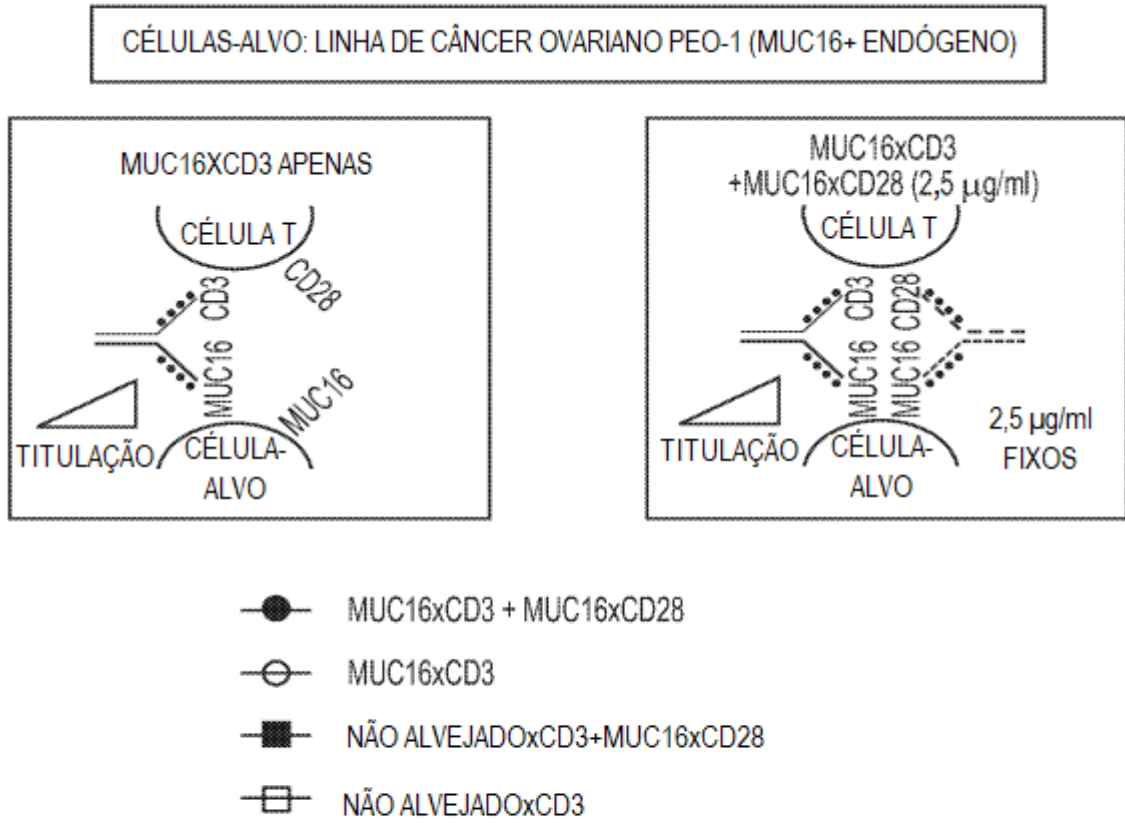
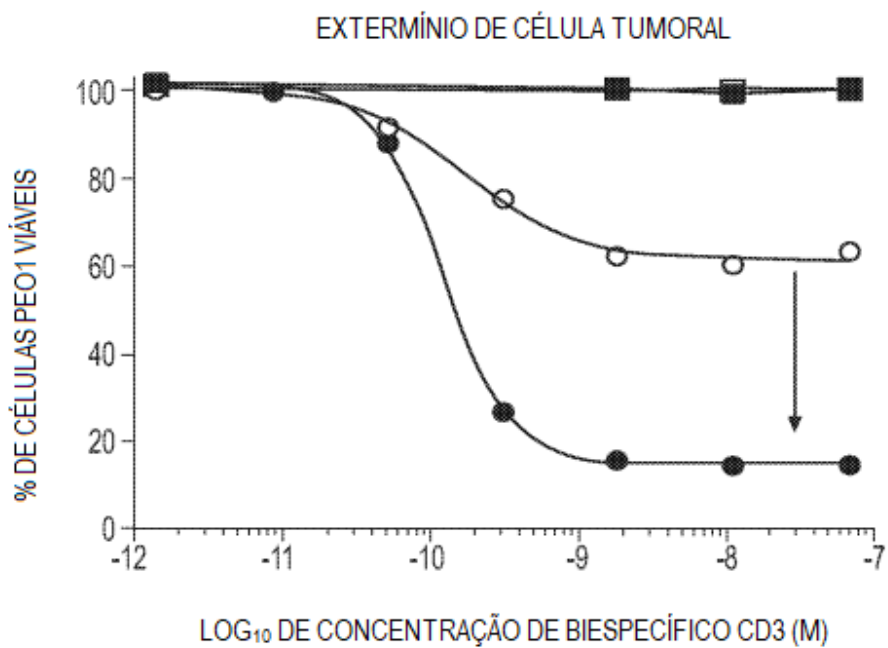
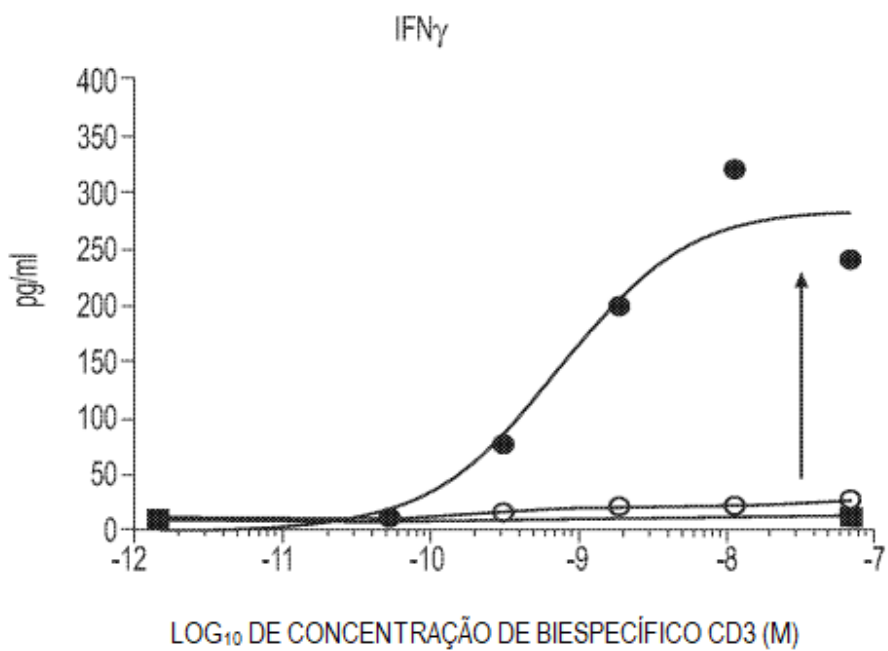
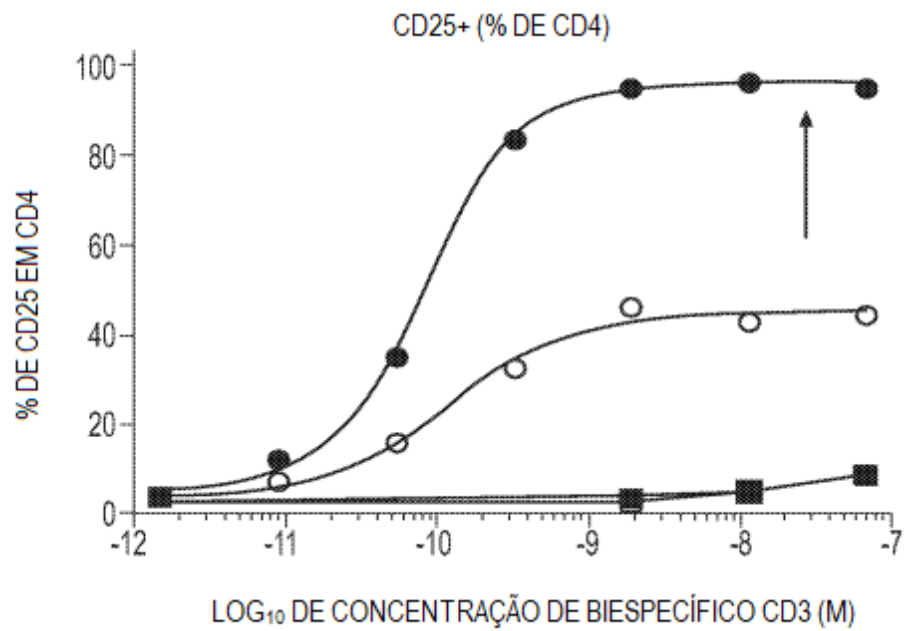
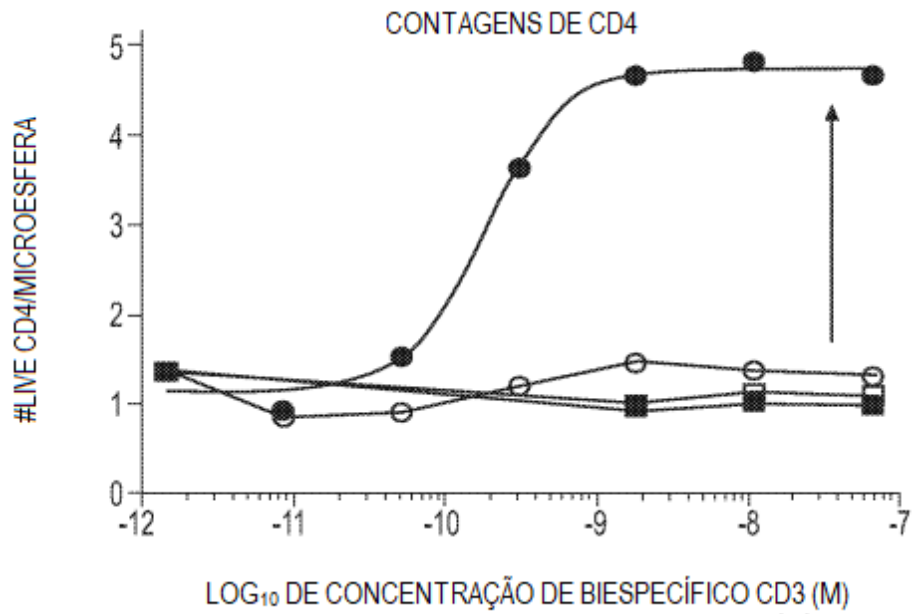
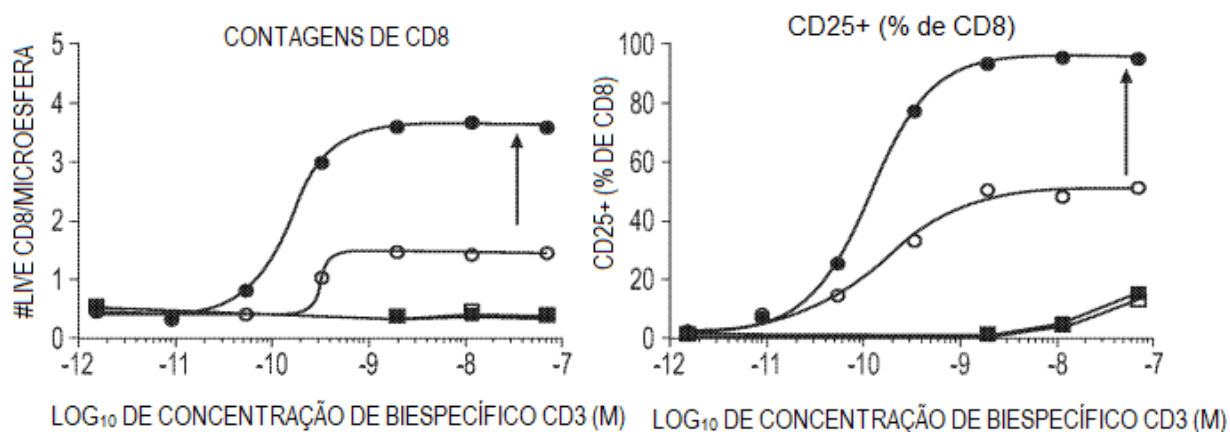


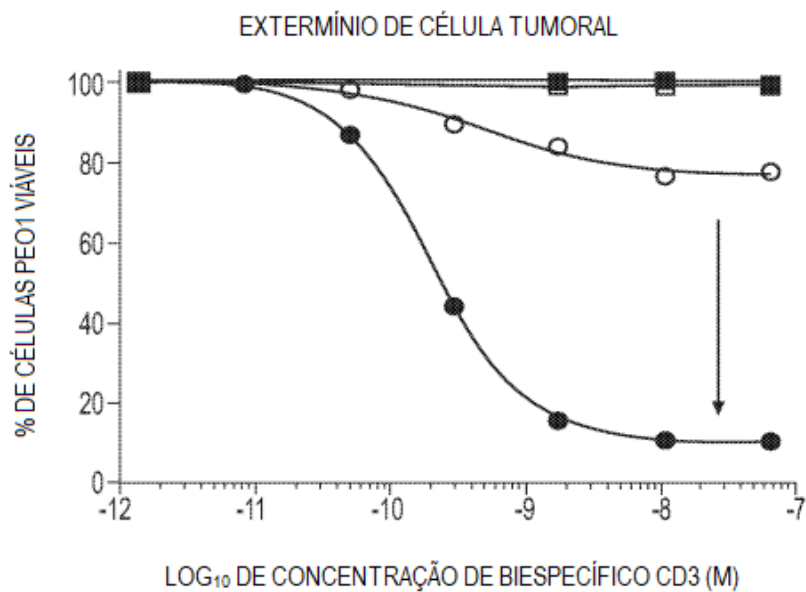
FIG. 2A

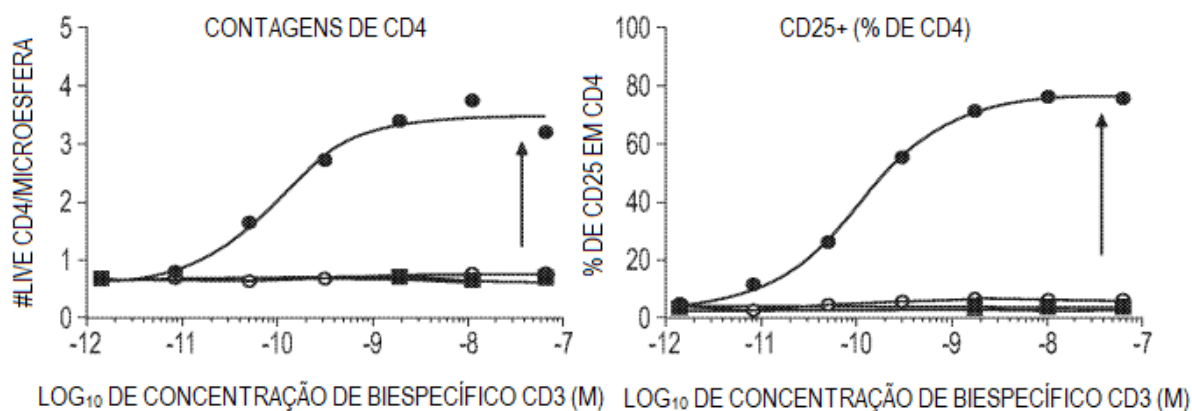
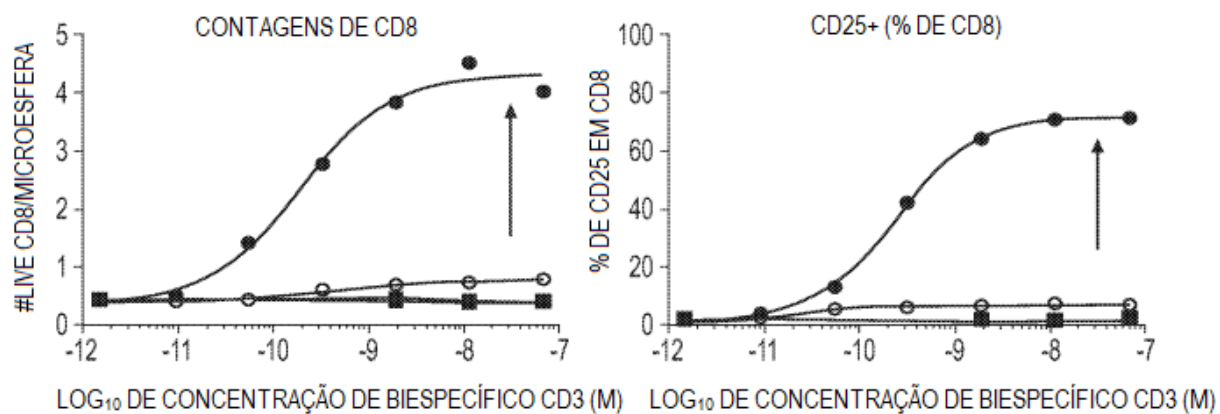
**FIG. 2B****FIG. 2C**

**FIG. 2D**

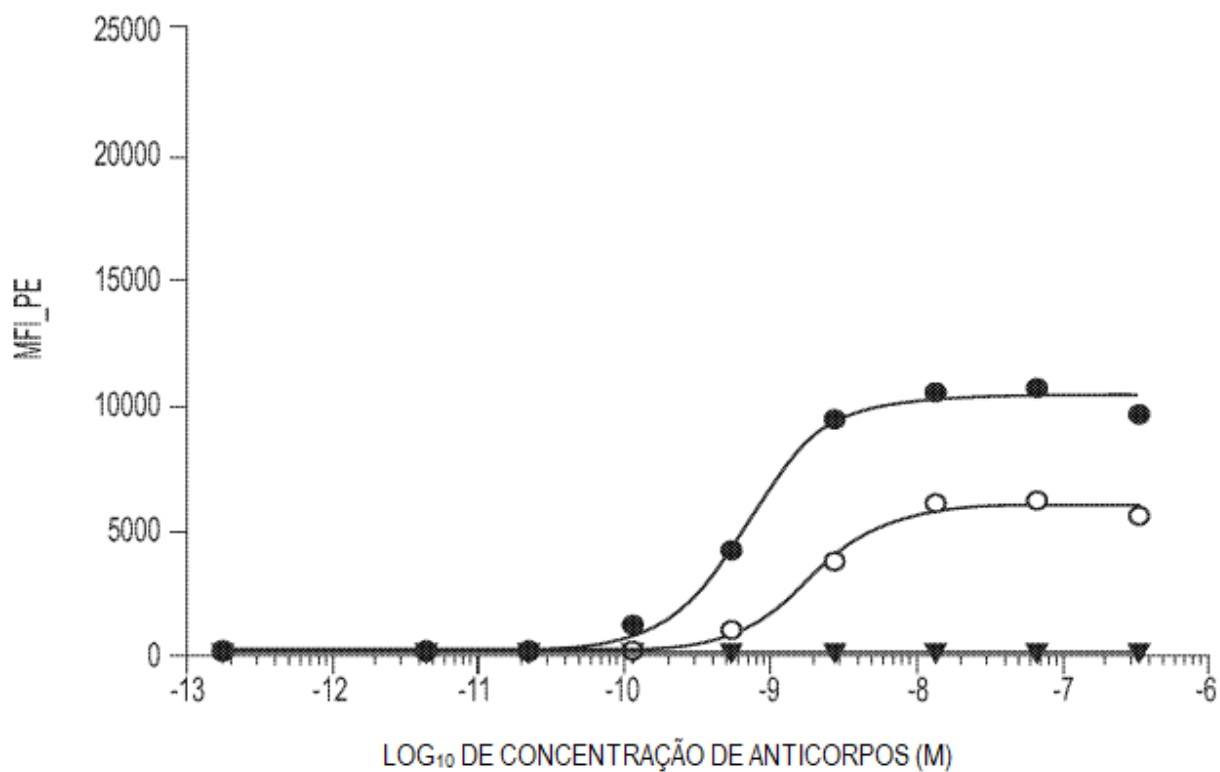
**FIG. 2E**

CÉLULAS-ALVO: PEO-1 DE LINHAS DE CÂNCER OVARIANO (MUC16+ ENDÓGENO)

**FIG. 2F**

**FIG. 2G****FIG. 2H**

ligação de FACS



- MUC16xCD28
- MUC16xCD3
- ▼ CONTROLE DE LIGAÇÃO DE CD3

	EC50
MUC16xCD28	6,789E-010
MUC16xCD3	1,843E-009
CONTROLE DE LIGAÇÃO DE CD3	~2,274E-009

FIG. 21

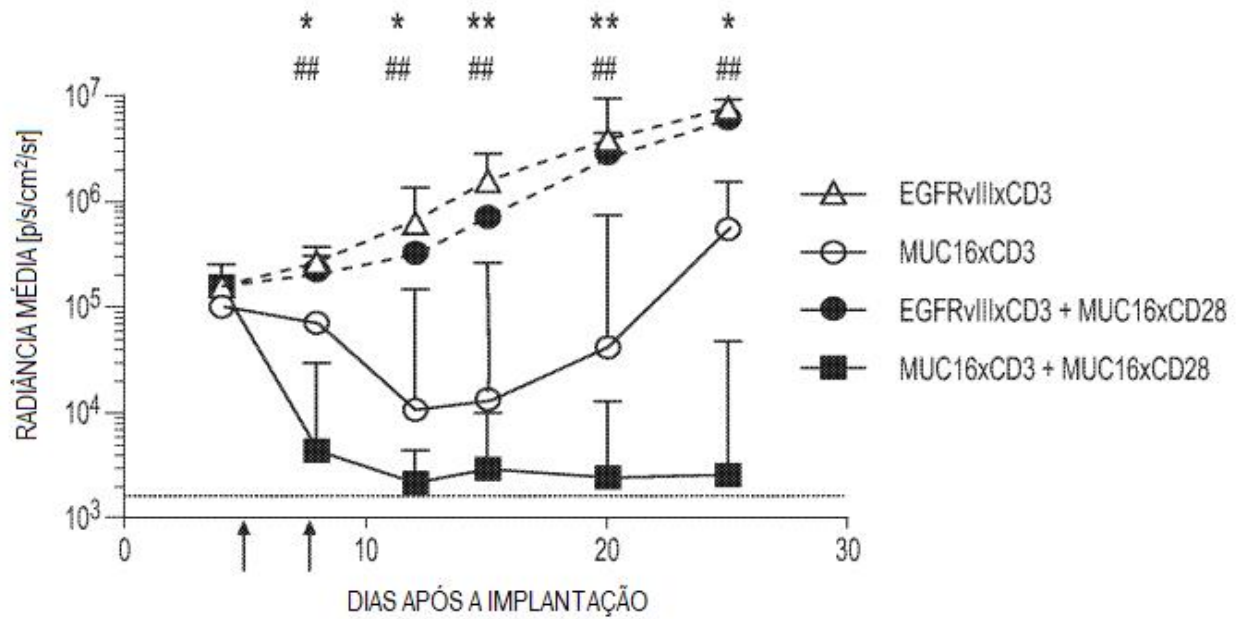


FIG. 3A

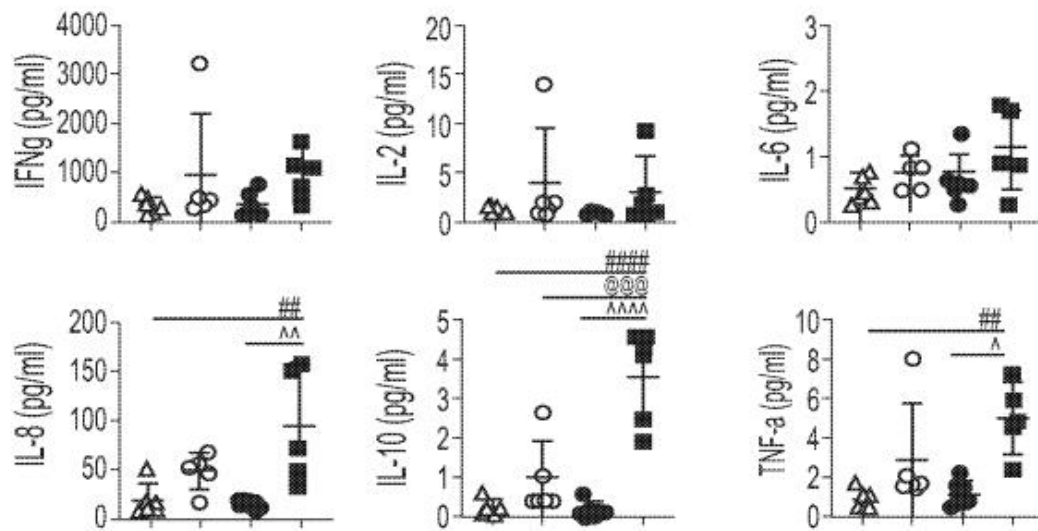
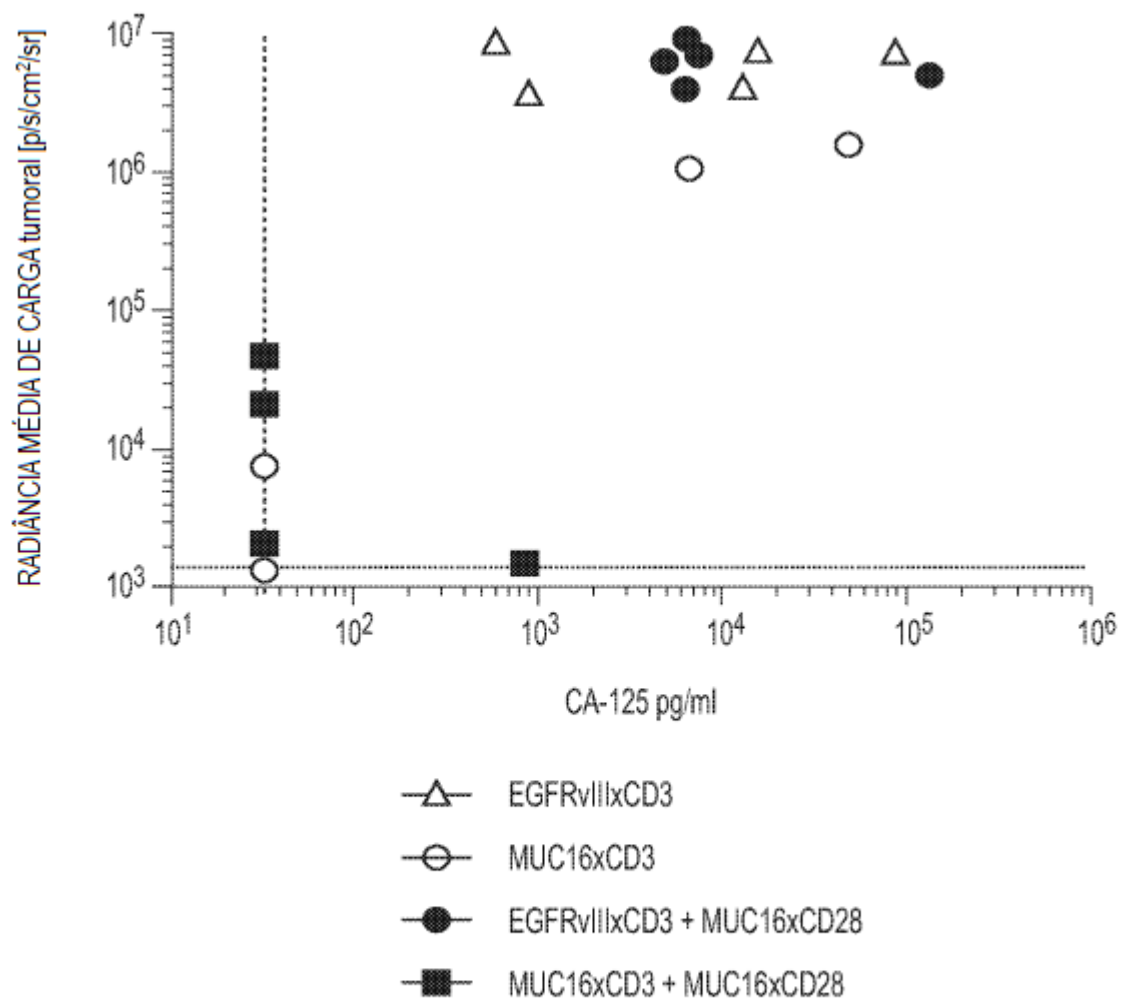


FIG. 3B



**FIG. 3C**

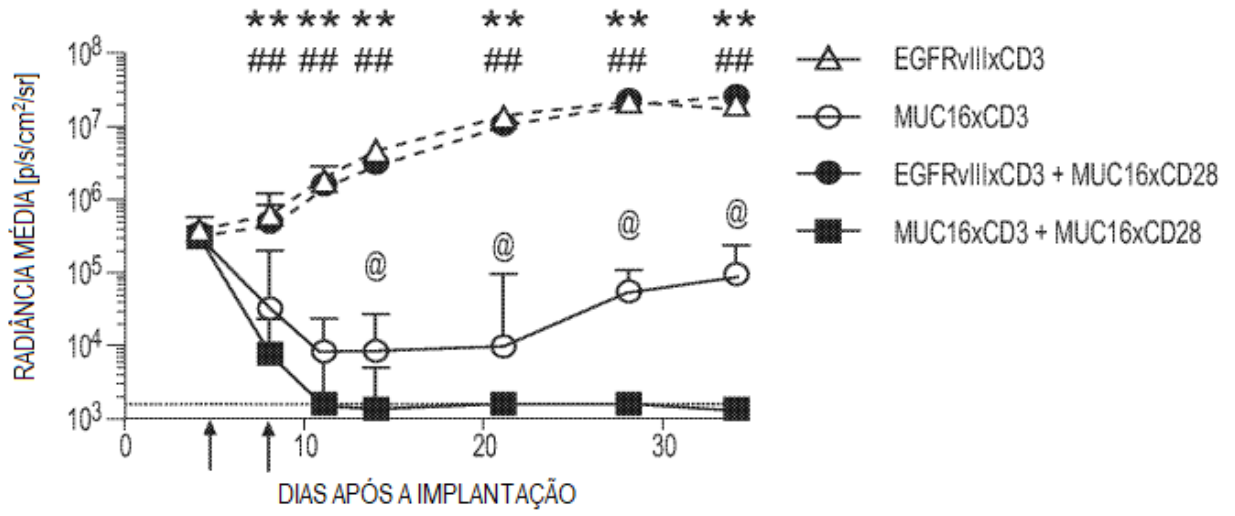


FIG. 4A

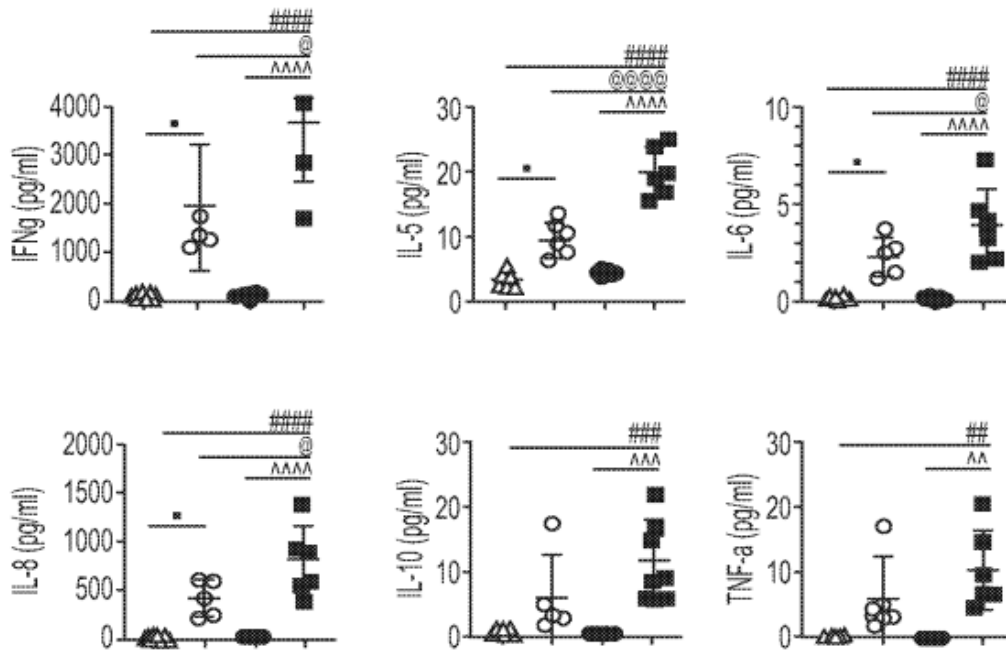


FIG. 4B

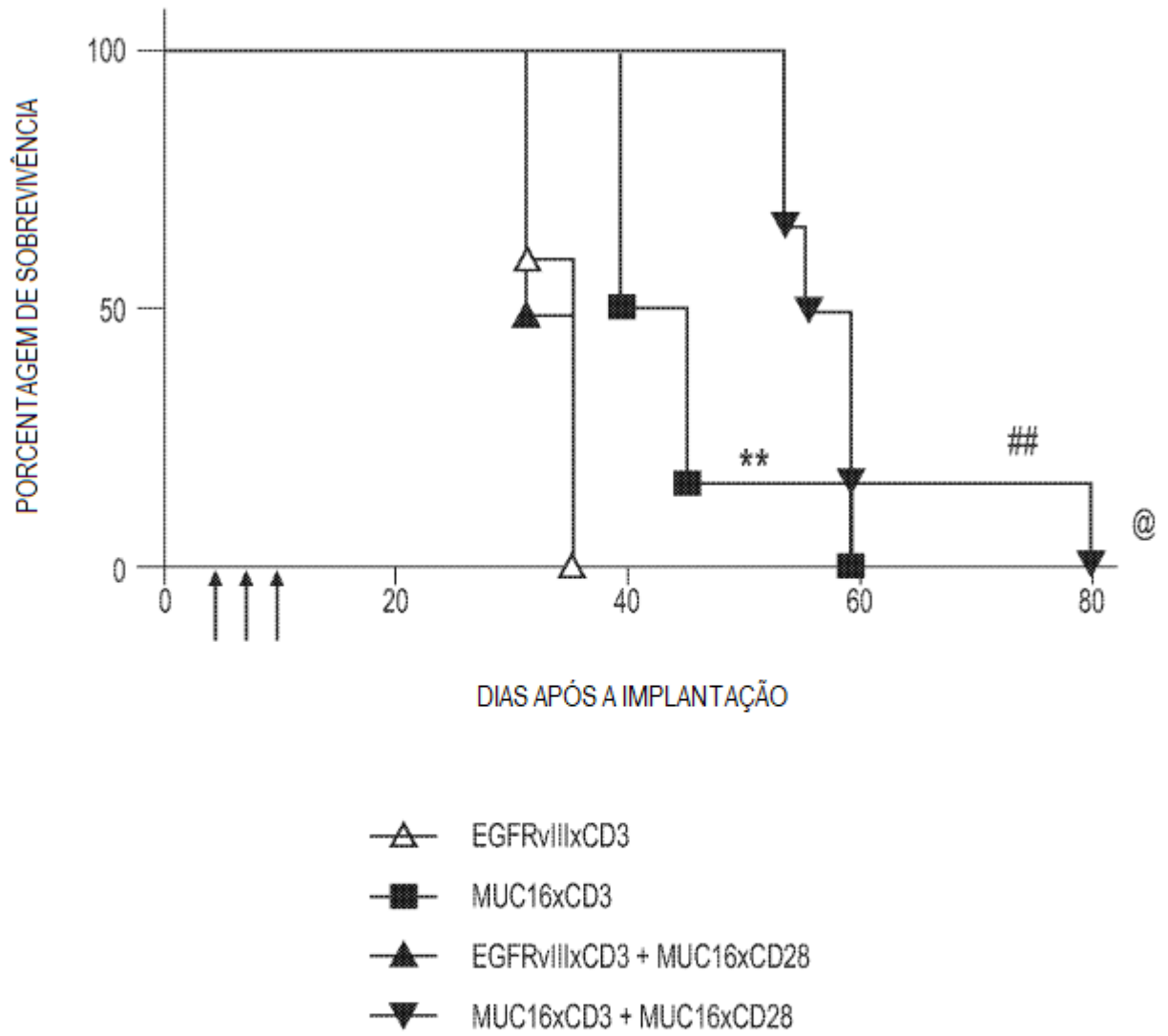
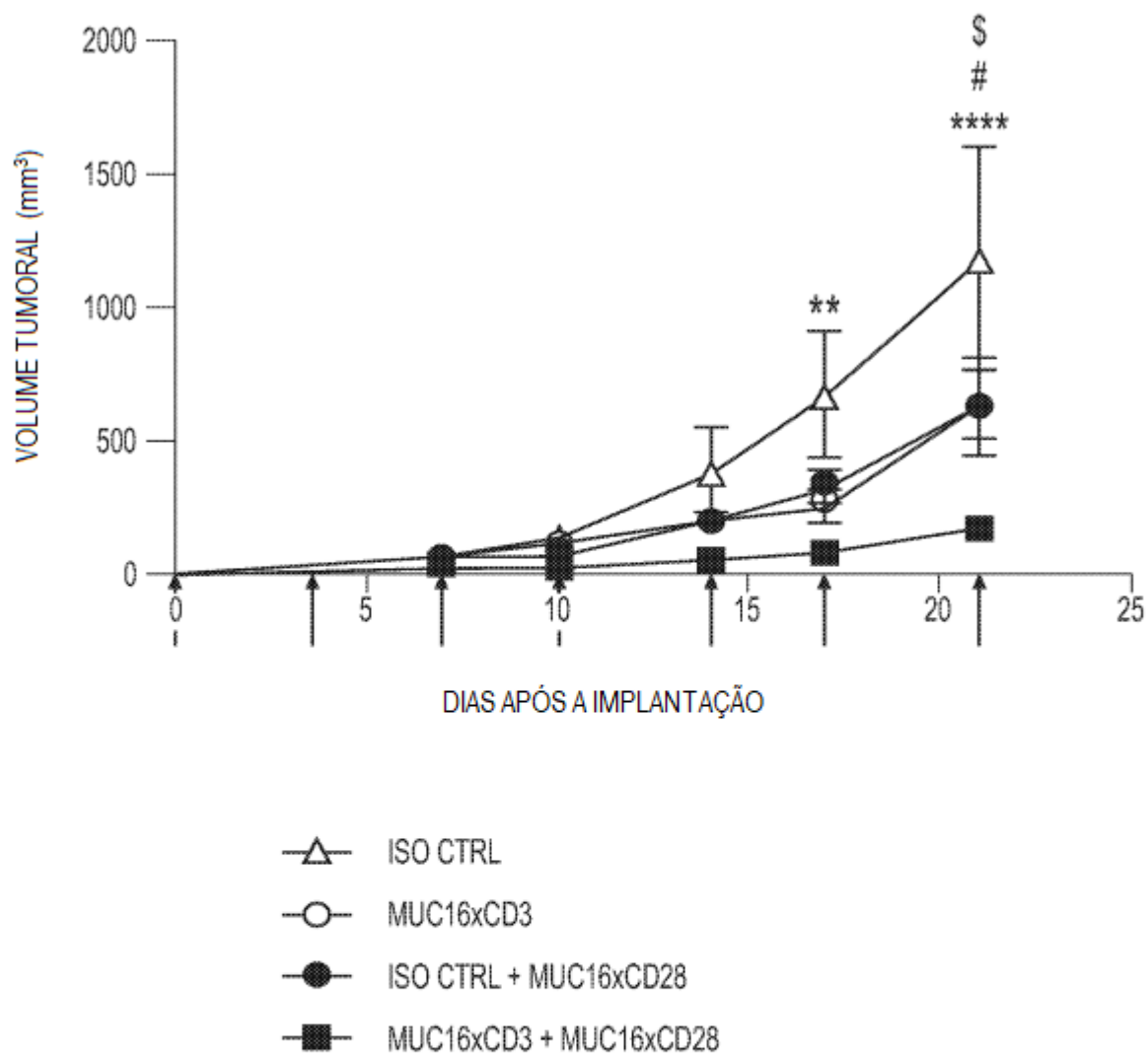
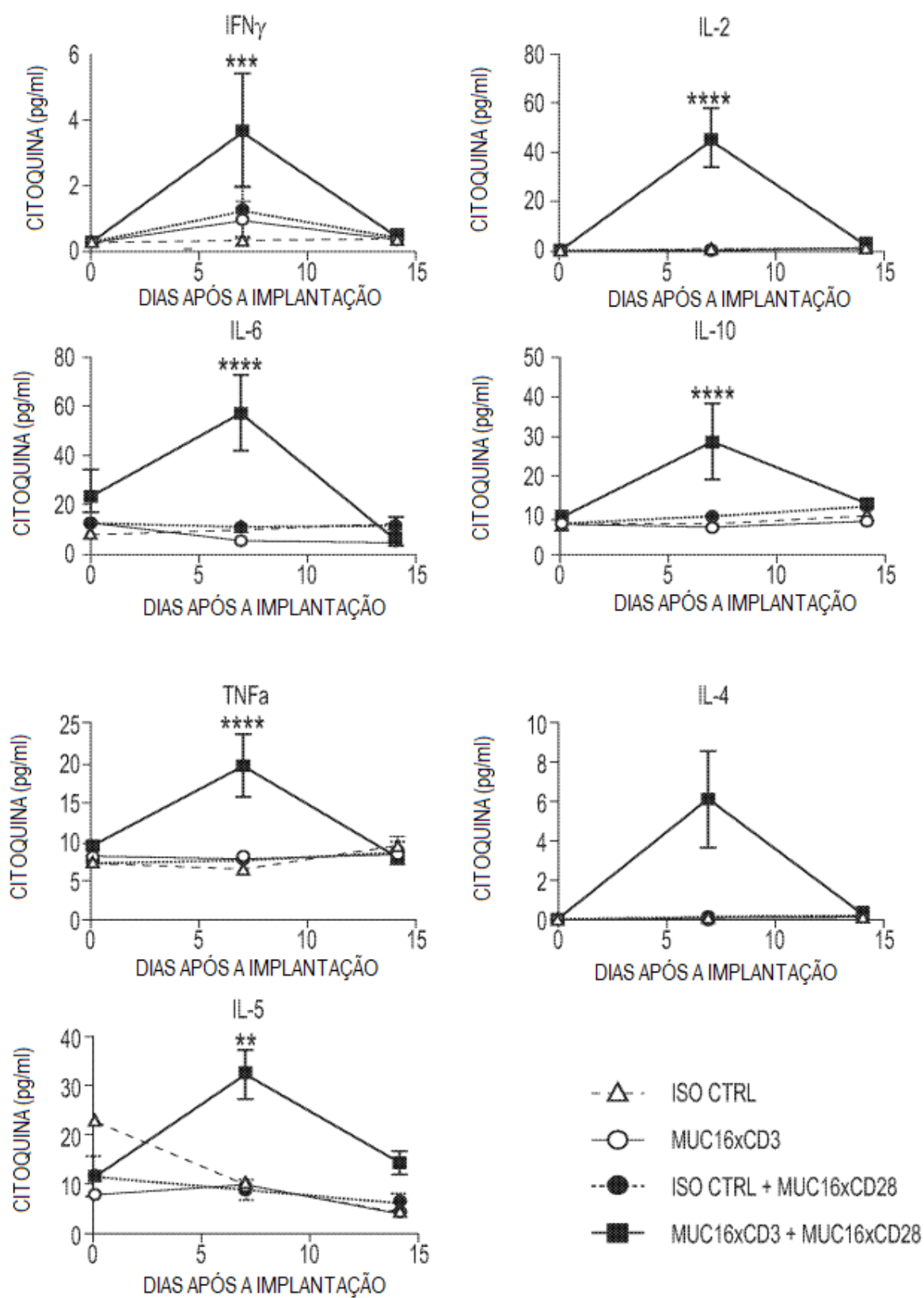
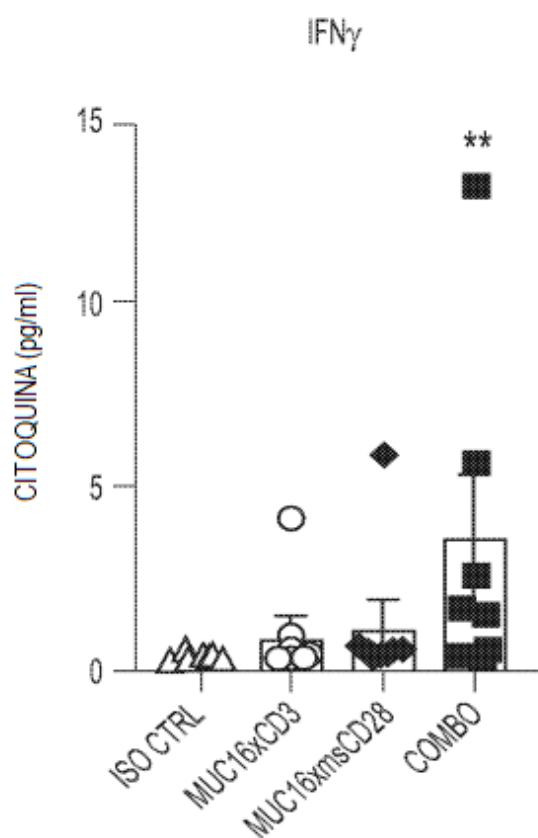
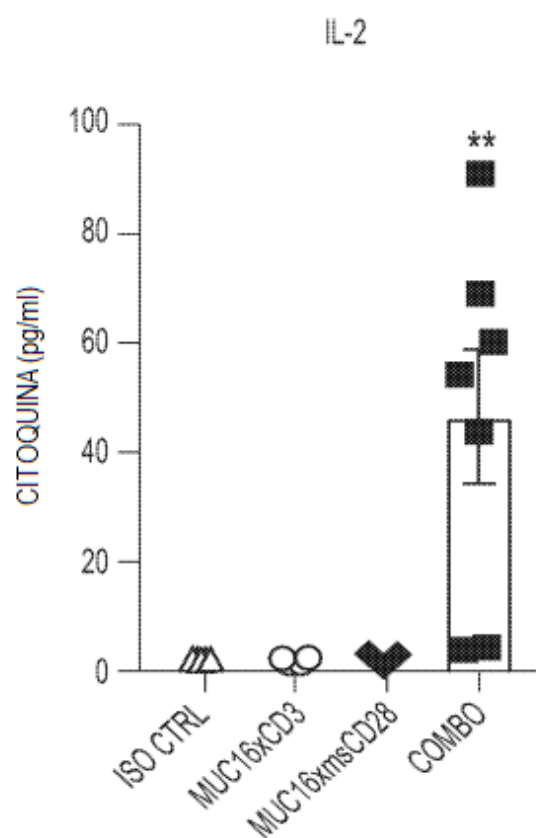


FIG. 5

**FIG. 6A**

**FIG. 6B**

**FIG. 6C****FIG. 6D**

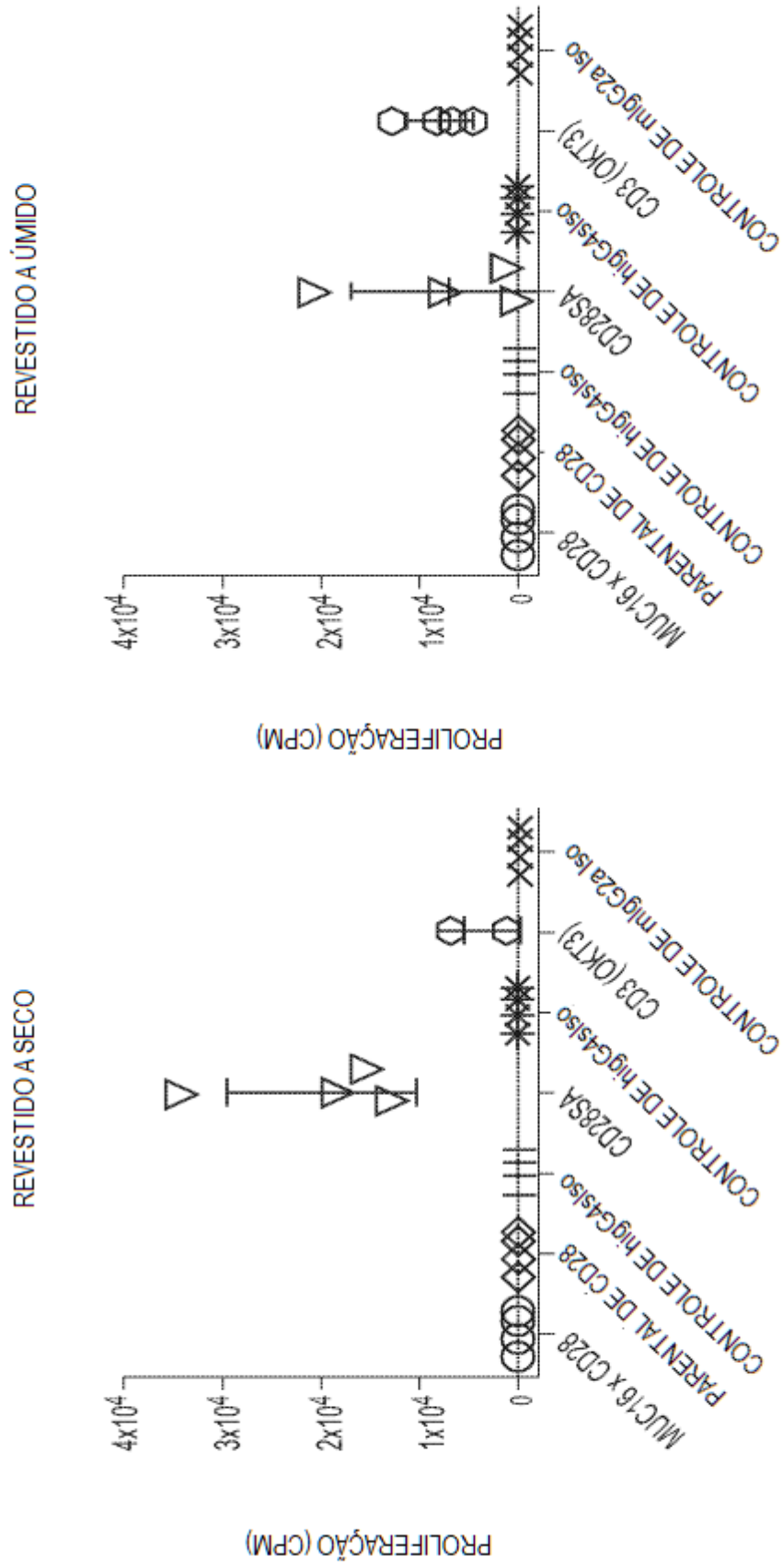


FIG. 7

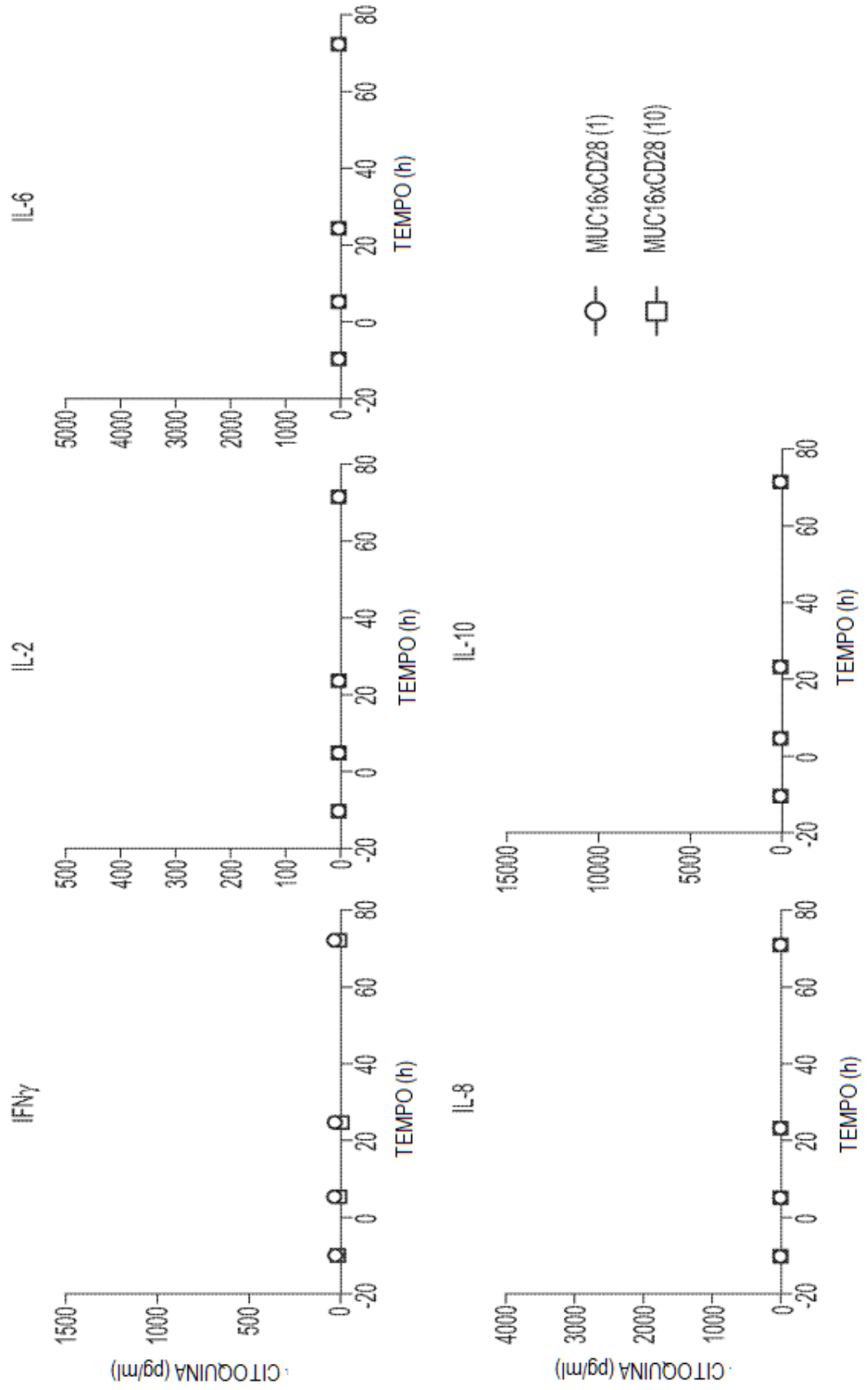
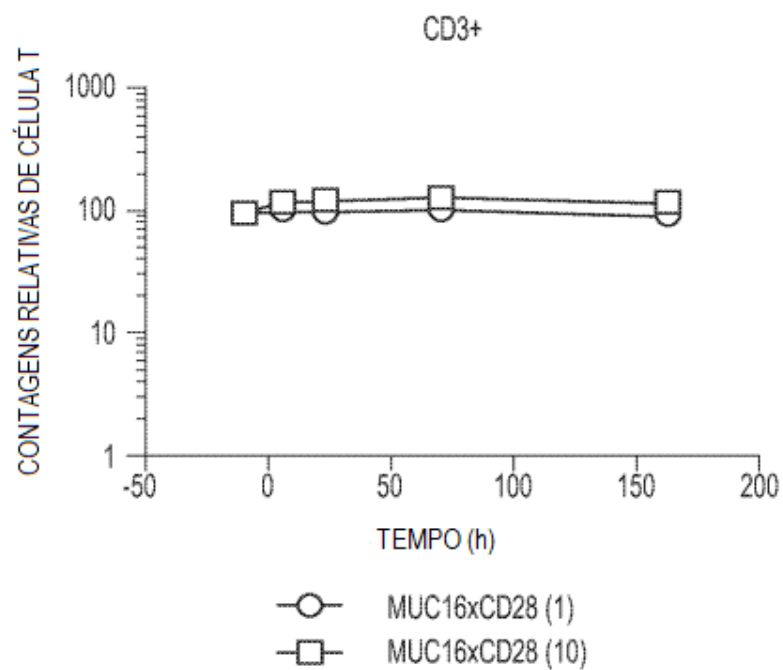
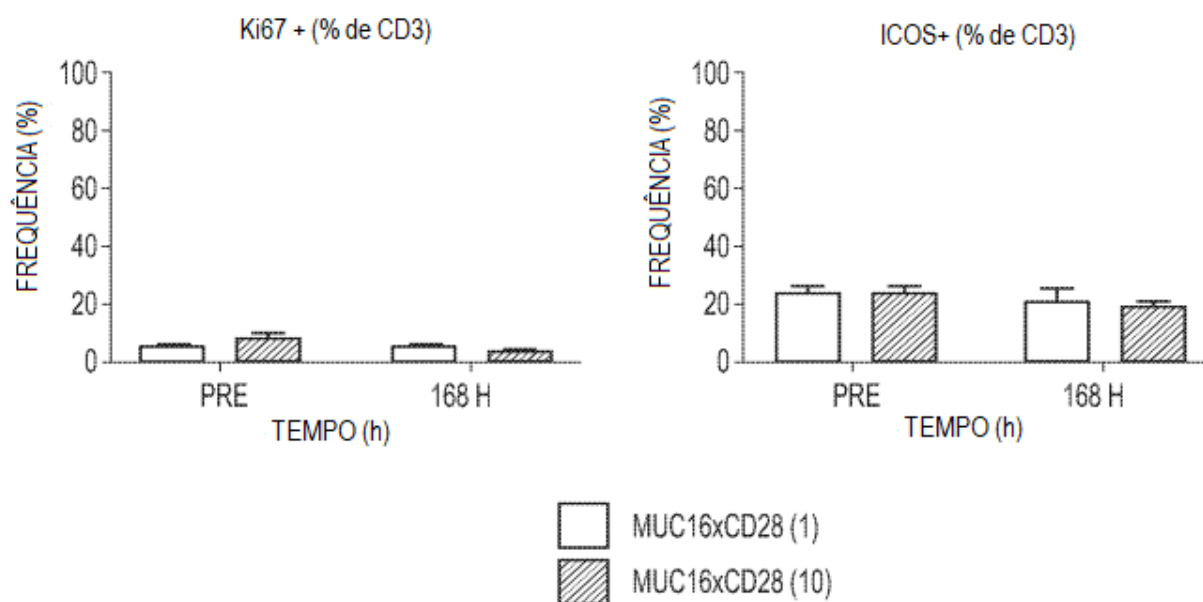
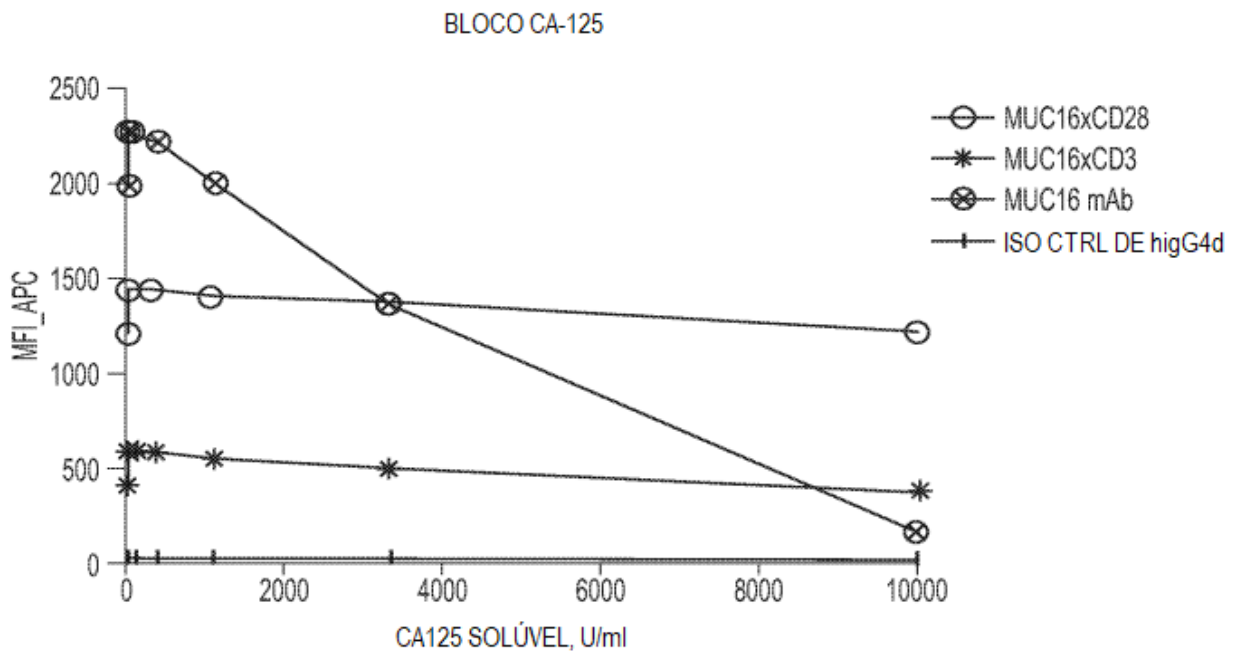
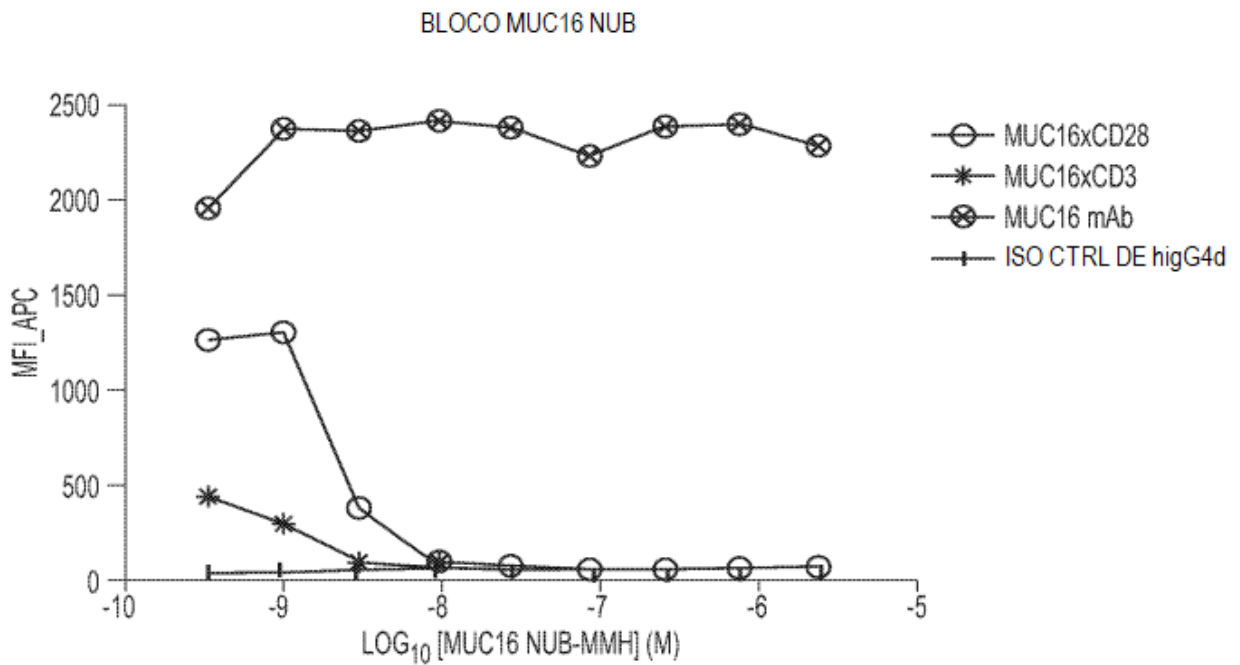
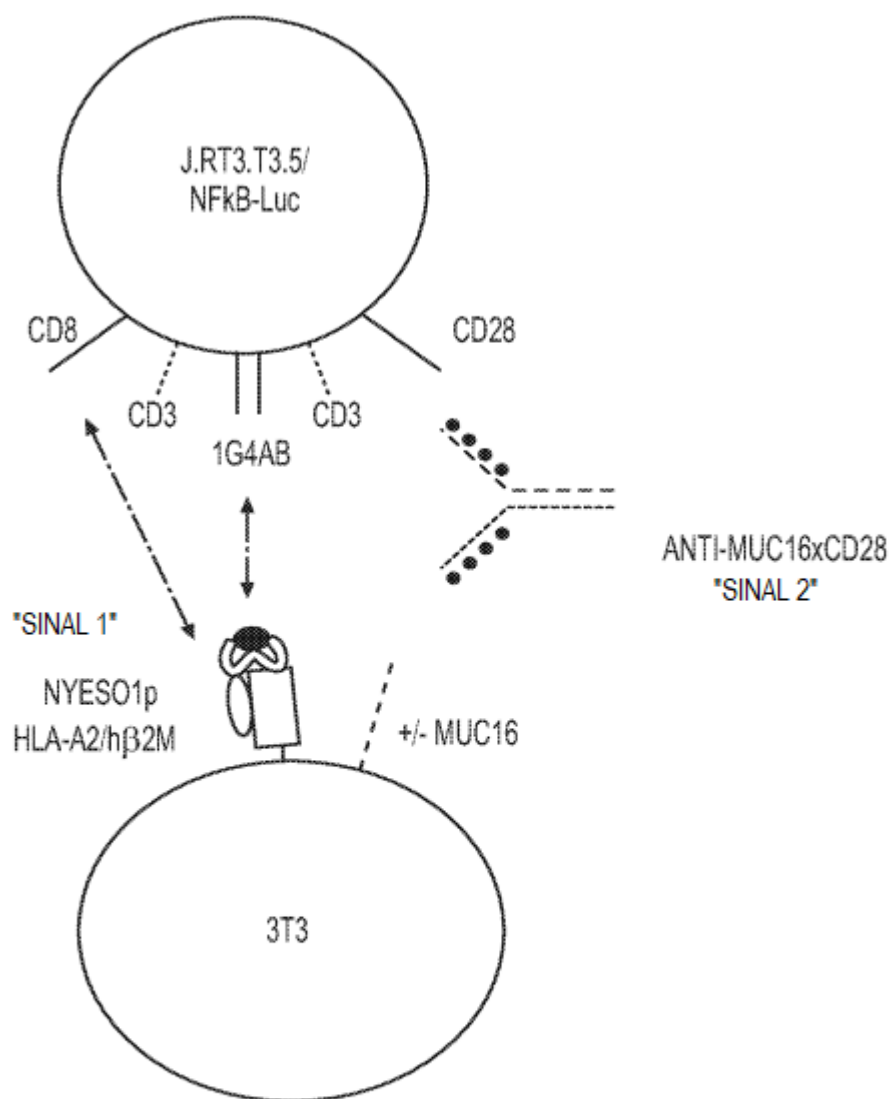


FIG. 8A

**FIG. 8B****FIG. 8C**

**FIG. 9A****FIG. 9B**

**FIG. 10**

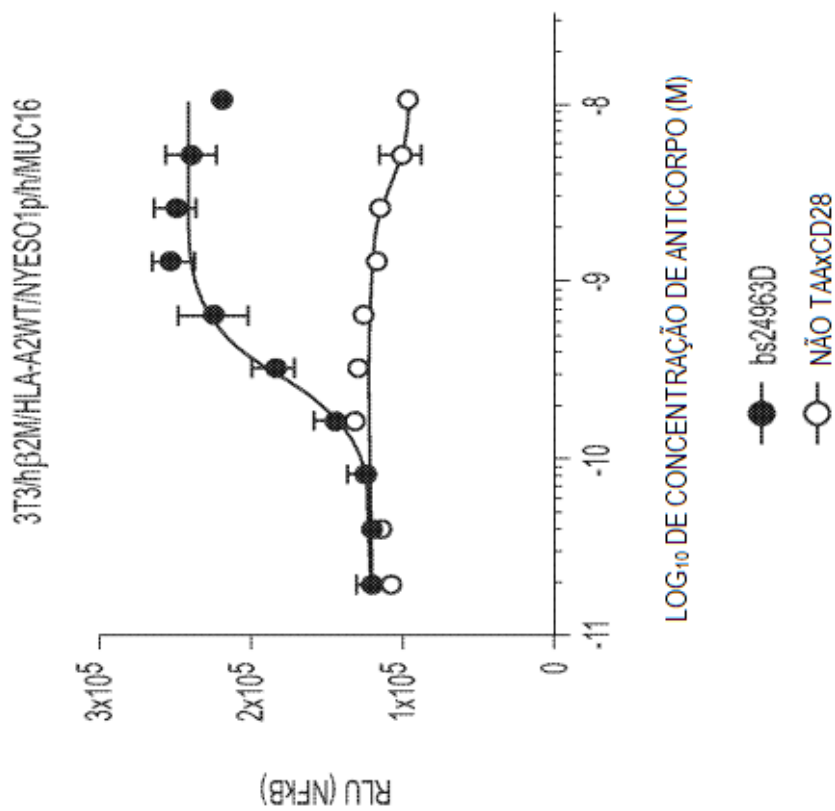
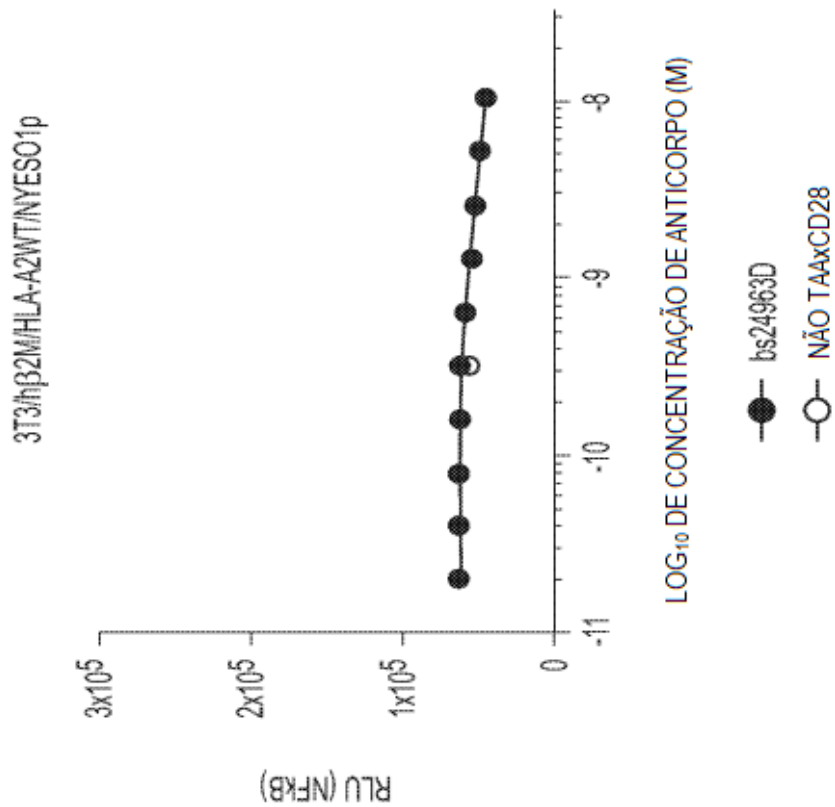
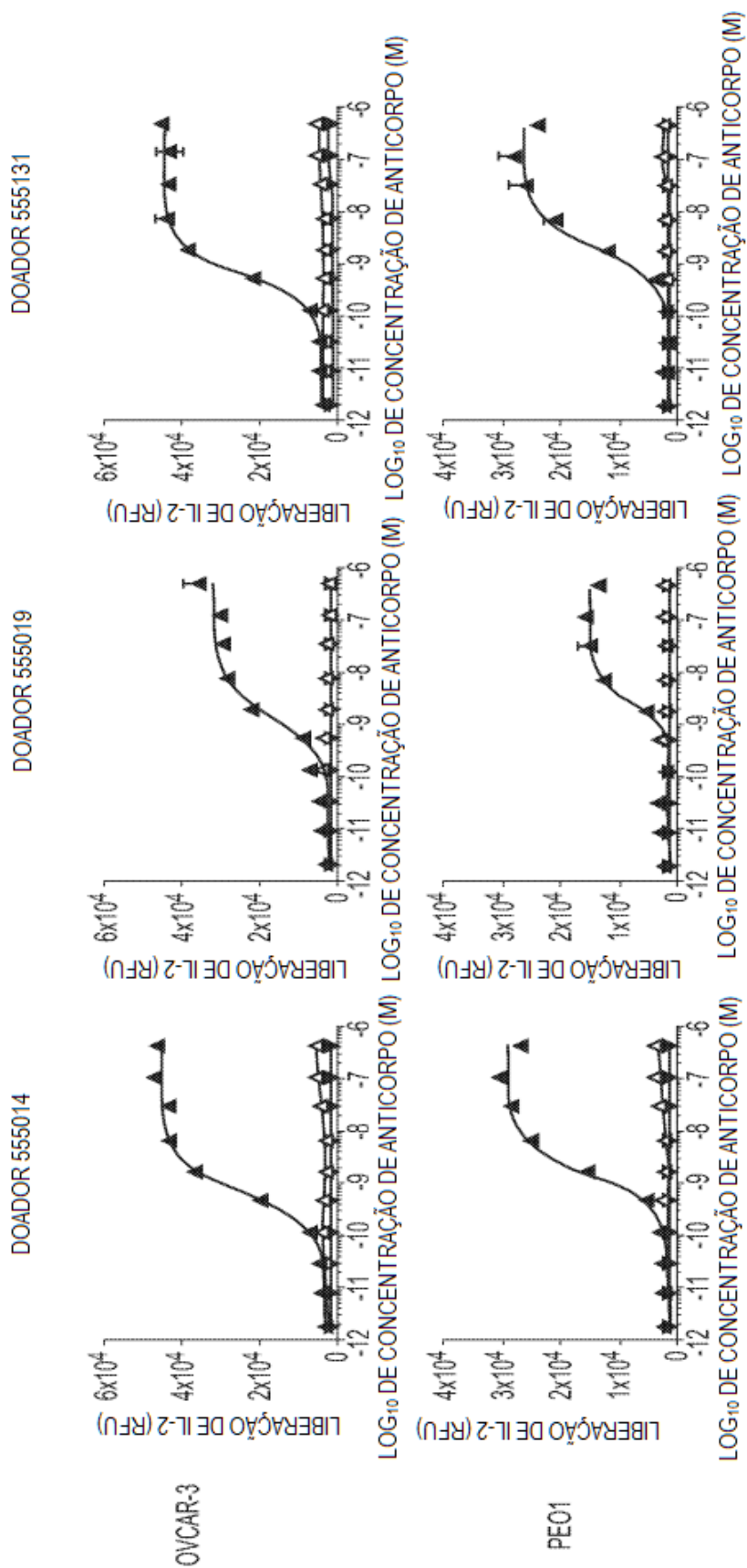


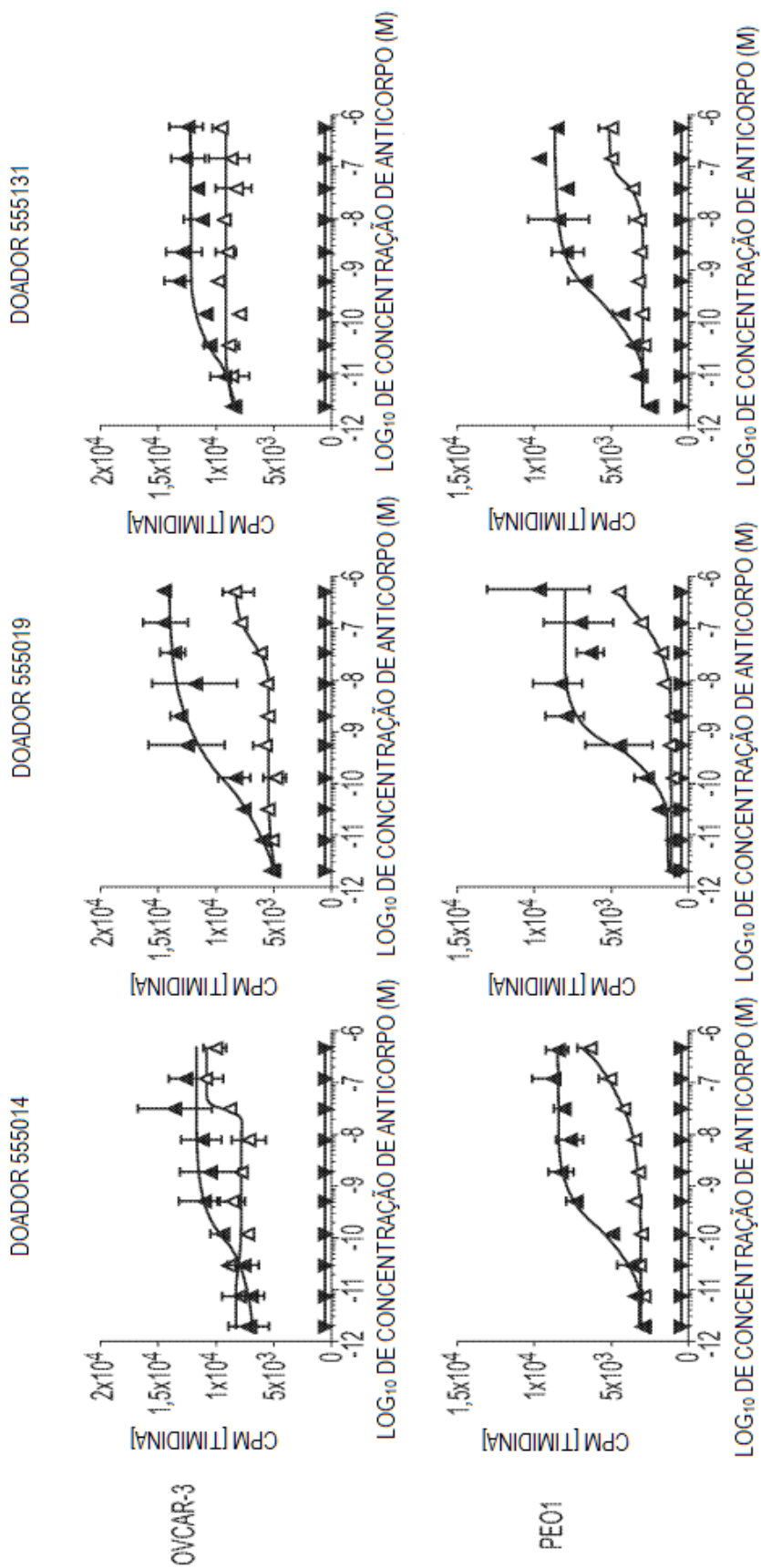
FIG. 11A

FIG. 11B



- ▲ bs24963D + REGN4018
- ▼ bs24963D + não TAAxCD3
- △ não TAAxCD28 + REGNA4018
- ▽ não TAAxCD3 + não TAAxCD28

FIG. 12



- ▲ bs24963D + REGN4018
- ▼ bs24963D + não TAAxCD3
- △ não TAAxCD28 + REGN4018
- ▽ não TAAxCD3 + não TAAxCD28

FIG. 13

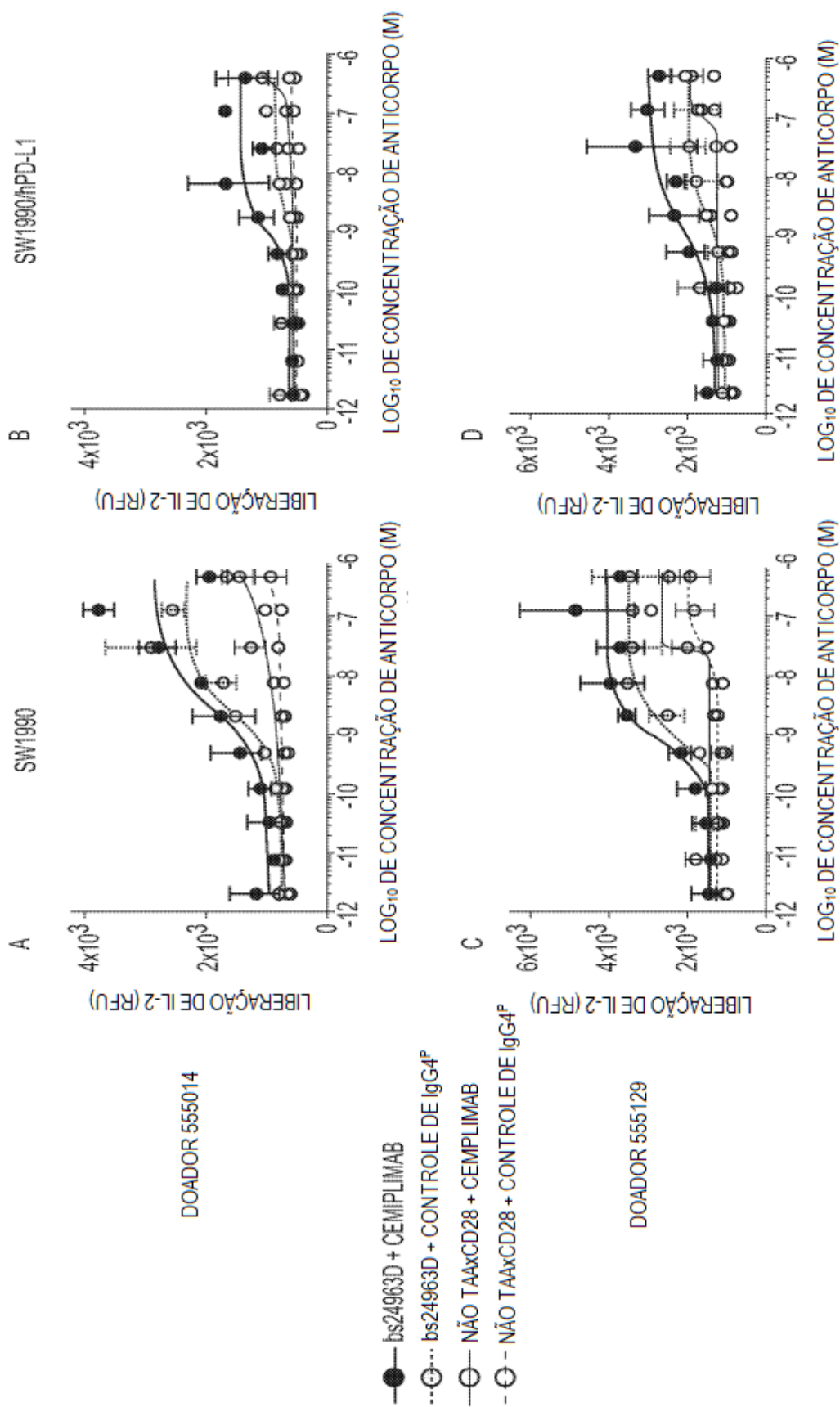


FIG. 14

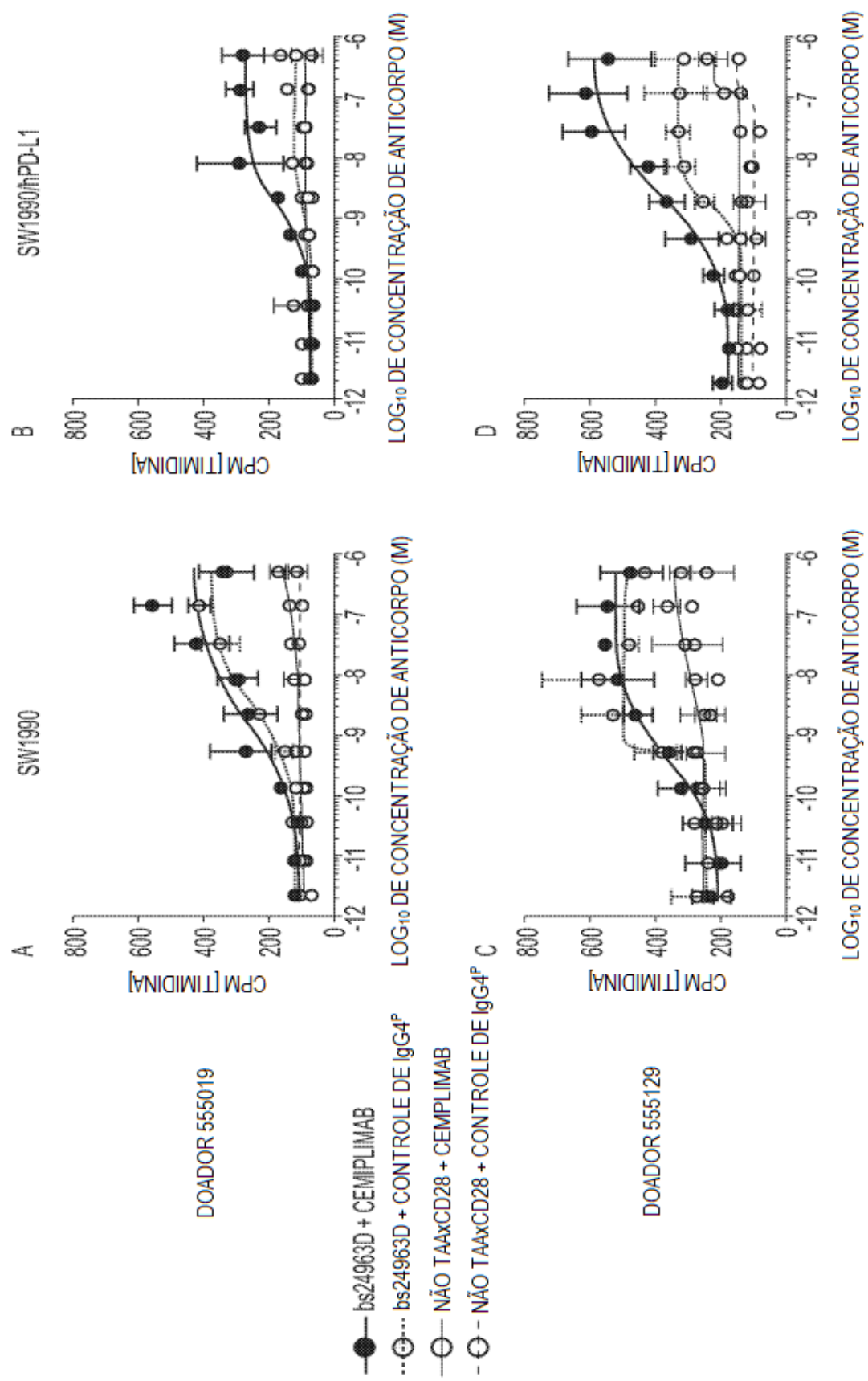


FIG. 15

RESUMO

Patente de Invenção: **“ANTICORPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 X ANTI-CD28 E USOS DOS MESMOS”**.

A presente invenção fornece moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas que compreendem um primeiro domínio de ligação ao antígeno se que liga especificamente a CD28 humano e uma segunda molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a MUC16 humano. Em certas modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da presente invenção têm capacidade de inibir o crescimento de tumores que expressam MUC16, como tumores de ovário. As moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas da invenção são úteis para o tratamento de doenças e distúrbios nos quais uma resposta imunológica alvo induzida ou de regulação crescente é desejada e/ou terapeuticamente benéfica.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p253959.txt
- Data de Geração do Código: 28/05/2021
- Hora de Geração do Código: 16:51:30
- Código de Controle:
 - Campo 1: 2B2E6943D0DCBEDA
 - Campo 2: 2914CC34EEF56FB0