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

(21) BR 112020005078-4 A2

(22) Data do Depósito: 13/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020

(54) Título: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A NKG2D, CD16, E MOLÉCULA 1 SEMELHANTE A LECITINA DE TIPO C (CLL-1)

(51) Int. Cl.: A61K 39/00; A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 16/28; C07K 16/46.

(30) Prioridade Unionista: 14/09/2017 US 62/558,510.

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

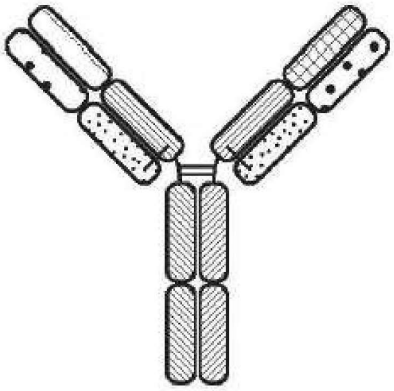
(72) Inventor(es): GREGORY P. CHANG; ANN F. CHEUNG; WILLIAM HANEY; BRADLEY M. LUNDE; BIANKA PRINZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2018050916 de 13/09/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/055677 de 21/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 13/03/2020

(57) Resumo: Proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam a um antígeno CLL-1 associado a um tumor, ao receptor NKG2D e a CD16 são descritas, assim como composições farmacêuticas e métodos terapêuticos utilizáveis no tratamento de câncer.



PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A NKG2D, CD16, E MOLÉCULA 1 SEMELHANTE A LECTINA DE TIPO C (CLL-1)

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de e prioridade para o Pedido de Patente Provisório U.S. No. 62/558.510, depositado em 14 de setembro de 2017.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências, que foi apresentada eletronicamente em formato ASCII e é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Dita cópia ASCII, criada em 11 de setembro de 2018, é denominada DFY-041WO_SL.txt com tamanho de 89.993 bytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A invenção refere-se a proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam a NKG2D, CD16, e um antígeno associado a tumor, molécula 1 semelhante a lectina de tipo C (CLL-1).

FUNDAMENTOS

[004] Câncer continua a ser um problema de saúde significante, apesar dos esforços substanciais de pesquisa e avanços científicos reportados na literatura para o tratamento desta doença. Alguns dos cânceres diagnosticados com maior frequência incluem câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão e câncer colorretal. Câncer de próstata é a forma mais comum de câncer nos homens. Câncer de mama permanece como uma das causas principais de morte em mulheres. Cânceres de sangue e medula óssea também são tipos de câncer frequentemente diagnosticados, incluindo mielomas múltiplos, leucemia e linfomas. Opções de

tratamento atuais para esses cânceres não são eficazes para todos os pacientes e/ou podem ter efeitos colaterais adversos importantes. Outros tipos de câncer também permanecem desafiadores para tratamento usando as opções terapêuticas existentes.

[005] Imunoterapias de câncer são desejáveis porque são altamente específicas e podem facilitar destruição de células de câncer usando o próprio sistema imune do paciente. Proteínas de fusão, como os acopladores de células T biespecíficos, são imunoterapias de câncer descritas na literatura que se ligam a células de tumor e células T para facilitar a destruição de células de tumor. Anticorpos que se ligam a determinados antígenos associados a tumores e a determinadas células imunes foram descritos na literatura. Ver, por exemplo, WO 2016/134371 e WO 2015/095412.

[006] Células matadoras naturais (NK) são um componente do sistema imune inato e constituem aproximadamente 15% dos linfócitos circulantes. Células NK se infiltram praticamente em todos os tecidos e foram originalmente caracterizadas por sua capacidade de matar efetivamente células de tumor sem a necessidade de sensibilização anterior. Células NK ativadas matam as células alvo por meios similares às células T citotóxicas – isto é, via grânulos citolíticos que contêm perforina e granzimas, bem como através das vias dos receptores de morte. Células NK ativadas também secretam citocinas inflamatórias como IFN-γ e quimiocinas que promovem o recrutamento de outros leucócitos para o tecido alvo.

[007] Células NK respondem a sinais através de uma

variedade de receptores ativadores e inibidores em sua superfície. Por exemplo, quando células NK encontram auto-células saudáveis, sua atividade é inibida pela ativação dos receptores do tipo imunoglobulina de célula matadora (KIRs). Alternativamente, quando células NK encontram células estranhas ou células de câncer, elas são ativadas por meio de seus receptores de ativação (por exemplo, NKG2D, NCRs, DNAM1). Células NK também são ativadas pela região constante de algumas imunoglobulinas através dos receptores de CD16 em sua superfície. A sensibilidade geral de células NK à ativação depende da soma dos sinais estimuladores e inibidores.

[008] O gene de membro A família 12 de domínio de lectina tipo C codifica um membro da superfamília de domínio de lectina de tipo C/semelhante a lectina de tipo C (CTL/CTLD). Membros desta família compartilham uma dobra de proteína comum e têm diversas funções, como adesão celular, sinalização célula-célula, renovação de glicoproteína, e papéis em resposta imune e inflamação. A proteína codificada por este gene é um regulador negativo de função de granulócitos e monócitos. A molécula 1 semelhante a lectina de tipo C humana (CLL-1) também conhecida como MICL ou CLEC12A, é uma glicoproteína transmembrana de tipo II e membro da grande família de receptores semelhantes a lectina de tipo C envolvidos em regulação imune. CLL-1/CLEC12A é superexpressa em mais de 90% de pacientes com leucemia mielóide aguda em células-tronco leucêmicas, mas não em células hematopoiéticas normais. A presente invenção provê proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam a CLL-1/CLEC12A, e uso das proteínas no tratamento de câncer.

SUMÁRIO

[009] A invenção provê proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam a um antígeno associado a tumor CLEC12A e ao receptor NKG2D e receptor CD16 em células matadoras naturais. Tais proteínas podem acoplar mais do que um tipo de receptor ativante de NK, e podem bloquear a ligação de ligandos naturais a NKG2D. Em certas modalidades, as proteínas podem agonizar as células NK em humanos, e em outras espécies como roedores e macacos cinomolgos. Vários aspectos e modalidades da invenção são descritos em detalhes adicionais abaixo.

[010] Consequentemente, um aspecto da invenção provê uma proteína que incorpora um primeiro sítio de ligação ao antígeno que se liga a NKG2D; um segundo sítio de ligação ao antígeno que se liga a CLEC12A; e um domínio Fc de anticorpo, uma porção do mesmo suficiente para se ligar a CD16, ou um terceiro sítio de ligação ao antígeno que se liga a CD16. Os sítios de ligação ao antígeno podem cada incorporar um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo e um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (por exemplo disposto como em um anticorpo, ou fusionado junto para formar um scFv), ou um ou mais dos sítios de ligação ao antígeno pode ser um anticorpo de domínio único, tal como um anticorpo V_HH como um anticorpo de camelídeo ou um anticorpo V_{NAR} como aqueles encontrados em peixes cartilaginosos.

[011] O primeiro sítio de ligação ao antígeno, que se liga a NKG2D, em algumas modalidades, pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:1, tal como tendo uma sequência de aminoácido pelo menos

90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntica à SEQ ID NO:1, e/ou incorporando sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:105), CDR2 (SEQ ID NO:106), e CDR3 (SEQ ID NO:107) de SEQ ID NO:1. O domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:1 pode ser acoplado com vários domínios variáveis de cadeia leve para formar um sítio de ligação a NKG2D. Por exemplo, o primeiro sítio de ligação ao antígeno que incorpora um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:1 pode incorporar adicionalmente um domínio variável de cadeia leve selecionado dentre qualquer uma das sequências relacionadas com SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, e 40. Por exemplo, o primeiro sítio de ligação ao antígeno incorpora um domínio variável de cadeia pesada com sequências de aminoácido pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:1 e um domínio variável de cadeia leve com sequências de aminoácido pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas a qualquer uma das sequências selecionadas dentre SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, e 40.

[012] Alternativamente, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:41 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:42. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:41, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:44), e CDR3 (SEQ ID NO:45) de SEQ ID NO:41. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:42, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:47), e CDR3 (SEQ ID NO:48) de SEQ ID NO:42.

[013] Em outras modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:49 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:50. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:49, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:52), e CDR3 (SEQ ID NO:53) de SEQ ID NO:49. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:50, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequencias CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:55) e CDR3 (SEQ ID NO:56) de SEQ ID NO:50.

[014] Alternativamente, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia

pesada relacionado com SEQ ID NO:57 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:58, tal como tendo sequências de aminoácido pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:57 e pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:58, respectivamente.

[015] Em outra modalidade, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:59 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:60. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:59, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:109), CDR2 (SEQ ID NO:110), e CDR3 (SEQ ID NO:111) de SEQ ID NO:59. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:60, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências de CDR1 (SEQ ID NO:112), CDR2 (SEQ ID NO:113), e CDR3 (SEQ ID NO:114) de SEQ ID NO:60.

[016] O primeiro sítio de ligação ao antígeno, que se liga a NKG2D, em algumas modalidades, pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:61 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:62. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser

pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:61, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:64), e CDR3 (SEQ ID NO:65) de SEQ ID NO:61. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:62, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:66), CDR2 (SEQ ID NO:67), e CDR3 (SEQ ID NO:68) de SEQ ID NO:62.

[017] Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:69 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:70. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:69, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:72), e CDR3 (SEQ ID NO:73) de SEQ ID NO:69. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:70, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:75), e CDR3 (SEQ ID NO:76) de SEQ ID NO:70.

[018] Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de

cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:77 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:78. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:77, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:79), CDR2 (SEQ ID NO:80), e CDR3 (SEQ ID NO:81) de SEQ ID NO:77. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:78, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:82), CDR2 (SEQ ID NO:83), e CDR3 (SEQ ID NO:84) de SEQ ID NO:78.

[019] Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:85 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:86. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:85, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:87), CDR2 (SEQ ID NO:88), e CDR3 (SEQ ID NO:89) de SEQ ID NO:85. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:86, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências

CDR1 (SEQ ID NO:90), CDR2 (SEQ ID NO:91), e CDR3 (SEQ ID NO:92) de SEQ ID NO:86.

[020] Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:93 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:94. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do primeiro sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:93, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:95), CDR2 (SEQ ID NO:96), e CDR3 (SEQ ID NO:97) de SEQ ID NO:93. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:94, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:98), CDR2 (SEQ ID NO:99), e CDR3 (SEQ ID NO:100) de SEQ ID NO:94.

[021] Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:101 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:102, tal como tendo sequências de aminoácido pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:101 e pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:102, respectivamente.

[022] Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação ao antígeno pode incorporar um domínio variável de

cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:103 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:104, tal como tendo sequências de aminoácido pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:103 e pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idênticas à SEQ ID NO:104, respectivamente.

[023] Em algumas modalidades, o segundo sítio de ligação ao antígeno pode se ligar a CLEC12A e pode incorporar um domínio variável de cadeia pesada relacionado com SEQ ID NO:115 e um domínio variável de cadeia leve relacionado com SEQ ID NO:119. Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:115, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:116), CDR2 (SEQ ID NO:117), e CDR3 (SEQ ID NO:118) de SEQ ID NO:115. Similarmente, o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno pode ser pelo menos 90% (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) idêntico à SEQ ID NO:119, e/ou incorporar sequências de aminoácido idênticas às sequências CDR1 (SEQ ID NO:120), CDR2 (SEQ ID NO:121), e CDR3 (SEQ ID NO:122) de SEQ ID NO:119.

[024] Em algumas modalidades, o segundo sítio de ligação ao antígeno incorpora um domínio variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido idêntica à sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve presente no primeiro sítio de ligação ao antígeno.

[025] Em algumas modalidades, a proteína incorpora uma porção de um domínio Fc de anticorpo suficiente para se ligar a CD16, em que o domínio Fc de anticorpo compreende domínios CH2 e dobradiça, e/ou sequências de aminoácido pelo menos 90% idênticas à sequência de aminoácido 234-332 de um anticorpo de IgG humana.

[026] Formulações contendo uma destas proteínas; células contendo um ou mais ácidos nucleicos expressando estas proteínas, e métodos de intensificar morte de células de tumor usando estas proteínas são também providos.

[027] Outro aspecto da invenção provê um método de tratamento de câncer em um paciente. O método compreende a administração a um paciente em necessidade do mesmo de uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de ligação multiespecífica aqui descrita. Os cânceres exemplares para o tratamento usando as proteínas de ligação multiespecíficas incluem, por exemplo, leucemia mielóide aguda (AML), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), neoplasmas mieloproliferativos (MPNs), linfoma, linfomas não Hodgkin, e linfoma de Hodgkin clássico.

[028] Em certas modalidades, o câncer a ser tratado é AML selecionada dentre leucemia mieloblástica aguda não diferenciada, leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima, leucemia mieloblástica aguda com maturação, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mielomonocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia, leucemia monocítica aguda, leucemia eritróide aguda, leucemia megacarioblástica aguda (AMKL), leucemia basofílica aguda, panmielose aguda com fibrose, e neoplasma

de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN).

[029] Em certas modalidades da presente invenção, o câncer é MDS selecionado dentre MDS com displasia de multi-linhagem (MDS-MLD), MDS com displasia de linhagem única (MDS-SLD), MDS com sideroblastos em anel (MDS-RS), MDS com blastos em excesso (MDS-EB), MDS com del(5q) isolado, e MDS, não classificada (MDS-U).

[030] Em certas modalidades da presente invenção, a ALL a ser tratada é selecionada dentre leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) e leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Em modalidades da presente invenção, a MPN para ser tratada é selecionada dentre policitemia vera, trombocitemia essencial (ET), e mielofibrose. Em certas modalidades da presente invenção, o linfoma não Hodgkin a ser tratado é selecionado dentre linfoma de célula B e linfoma de célula T. Em certas modalidades da presente invenção, o linfoma a ser tratado é selecionado dentre leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma linfoblástico (LPL), linfoma de célula B grande difuso (DLBCL), linfoma de Burkitt (BL), linfoma mediastinal primário de célula B grande (PMBL), linfoma folicular, linfoma de células do manto, leucemia de células pilosas, mieloma de células plasmáticas (PCM) ou mieloma múltiplo (MM), neoplasias T/NK maduras e neoplasias histiocíticas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[031] Figura 1 é uma representação de um anticorpo multiespecífico, heterodimérico (uma proteína de ligação triespecífica (TriNKET)). Cada braço pode representar ou o domínio de ligação a NKG2D, ou o domínio de ligação ao

antígeno associado ao tumor. Em algumas modalidades, os domínios de ligação a NKG2D e aos antígenos associados ao tumor podem compartilhar uma cadeia leve comum.

[032] Figura 2 é uma representação de um anticorpo multiespecífico, heterodimérico. Tanto o domínio de ligação a NKG2D quanto o domínio de ligação ao antígeno associado ao tumor podem adquirir o formato scFv (braço direito).

[033] Figura 3 são gráficos em linha demonstrando a afinidade de ligação de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) a NKG2D recombinante humano em um ensaio ELISA.

[034] Figura 4 são gráficos em linha demonstrando a afinidade de ligação de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) a NKG2D recombinante cinomolgo em um ensaio ELISA.

[035] Figura 5 são gráficos em linha demonstrando a afinidade de ligação de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) para NKG2D recombinante de camundongo em um ensaio ELISA.

[036] Figura 6 são gráficos de barra demonstrando a ligação de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) para células EL4 expressando NKG2D humano por citometria de fluxo mostrando variação de intensidade de fluorescência média (MFI) sobre fundo (FOB).

[037] Figura 7 são gráficos de barra demonstrando a ligação de domínio de ligação a NKG2D (listados como clones) para células EL4 expressando NKG2D de camundongo por citometria de fluxo mostrando variação de intensidade de fluorescência média (MFI) sobre fundo (FOB).

[038] Figura 8 são gráficos em linha demonstrando

afinidade de ligação específica de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) para NKG2D-Fc recombinante humano por competição com ligando natural ULBP-6.

[039] Figura 9 são gráficos em linha demonstrando afinidade de ligação específica de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) para NKG2D-Fc recombinante humano por competição com ligando natural MICA.

[040] Figura 10 são gráficos em linha demonstrando afinidade de ligação específica de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) para NKG2D-Fc recombinante de camundongo por competição com ligando natural Rae-1 delta.

[041] Figura 11 são gráficos de barra mostrando ativação de NKG2D humano por domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) por quantificação da porcentagem de células positivas para TNF-α, que expressam proteínas de fusão zeta NKG2D-CD3 humanas.

[042] Figura 12 são gráficos de barra mostrando ativação de NKG2D de camundongo por domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) por quantificação da porcentagem de células positivas para TNF-α, que expressam proteínas de fusão zeta NKG2D-CD3 de camundongo.

[043] Figura 13 são gráficos de barra mostrando ativação de células NK humanas por domínios de ligação a NKG2D (listados como clones).

[044] Figura 14 são gráficos de barra mostrando ativação de células NK humanas por domínios de ligação a NKG2D (listados como clones).

[045] Figura 15 são gráficos de barra mostrando ativação de células NK de camundongos por domínios de ligação a NKG2D (listados como clones).

[046] Figura 16 são gráficos de barra mostrando ativação de células NK de camundongos por domínios de ligação a NKG2D (listados como clones).

[047] Figura 17 são gráficos de barra mostrando o efeito citotóxico de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) em células de tumor.

[048] Figura 18 são gráficos de barra mostrando a temperatura de fusão de domínios de ligação a NKG2D (listados como clones) medidos por fluorimetria de varredura diferencial.

[049] Figuras 19A-19C são gráficos de barra de ativação sinérgica de células NK usando ligação a CD16 e NKG2D. Figura 19A demonstra níveis de CD107a; Figura 19B demonstra níveis de IFN-γ; Figura 19C demonstra níveis de CD107a e IFN-γ. Gráficos indicam a média (n = 2) ± DP. Dados são representativos de cinco experimentos independentes usando cinco doadores saudáveis diferentes.

[050] Figura 20 é uma representação de uma proteína de ligação triespecífica (TriNKET) na forma Triomab, que é um anticorpo biespecífico, trifuncional, que mantém um formato semelhante a IgG. Esta quimera consiste de dois meio-anticorpos, cada um com uma cadeia leve e uma pesada, que se originam de dois anticorpos parentais. A forma Triomab pode ser uma construção heterodimérica contendo 1/2 de anticorpo de rato e 1/2 de anticorpo de camundongo.

[051] Figura 21 é uma representação de uma TriNKET na forma de cadeia leve comum KiH, que envolve a tecnologia *knobs-into-holes* (KIHs). KiH é um heterodímero contendo 2 fragmentos Fab se ligando ao alvo 1 e 2, e um Fc estabilizado por mutações de heterodimerização. TriNKET no

formato KiH pode ser uma construção heterodimérica com 2 fragmentos Fab se ligando ao alvo 1 e alvo 2, contendo duas diferentes cadeias pesadas e uma cadeia leve comum que se emparelha com ambas as cadeias pesadas.

[052] Figura 22 é uma representação de uma TriNKET na forma de imunoglobulina de domínio variável duplo (DVD-Ig™), que combina os domínios de ligação alvo de dois anticorpos monoclonais via ligadores flexíveis de ocorrência natural, e produz uma molécula semelhante a IgG tetravalente. DVD-Ig™ é uma construção homodimérica onde o antígeno de marcação de domínio variável 2 é fusionado ao terminal N de um domínio variável de antígeno 1 de marcação de fragmento Fab. A forma de DVD-Ig™ contém Fc normal.

[053] Figura 23 é uma representação de uma TriNKET na forma de interface Fab ortogonal (Orto-Fab), que é uma construção heterodimérica que contém 2 fragmentos Fab se ligando ao alvo 1 e alvo 2 fusionados a Fc. O pareamento cadeia leve (LC) - cadeia pesada (HC) é assegurado por interface ortogonal. Heterodimerização é assegurada por mutações em Fc.

[054] Figura 24 é uma representação de uma TriNKET no formato de Ig 2-em-1.

[055] Figura 25 é uma representação de uma TriNKET na forma ES, que é uma construção heterodimérica contendo dois diferentes fragmentos Fab se ligando ao alvo 1 e alvo 2 fusionados ao Fc. Heterodimerização é assegurada por mutações de direção eletrostática no Fc.

[056] Figura 26 é uma representação de uma TriNKET na forma de troca de braço de fragmento Fab: anticorpos que trocam os braços Fab por permuta de uma cadeia pesada e

cadeia leve fixada (meia-molécula) com um par de cadeias pesada-leve de outra molécula, resultando em anticorpos biespecíficos. A forma de troca de braço Fab (cFAE) é um heterodímero contendo 2 fragmentos Fab se ligando aos alvos 1 e 2, e um Fc estabilizado por mutações de heterodimerização.

[057] Figura 27 é uma representação de uma TriNKET na forma de Corpo SEED, que é um heterodímero contendo 2 fragmentos Fab se ligando aos alvos 1 e 2, e um Fc estabilizado por mutações de heterodimerização.

[058] Figura 28 é uma representação de uma TriNKET na forma de LuZ-Y, em que um zíper leucina é usado para induzir heterodimerização dos dois diferentes HCs. A forma LuZ-Y é um heterodímero contendo dois diferentes scFabs se ligando aos alvos 1 e 2, fusionados a Fc. Heterodimerização é assegurada através de motivos de zíper leucina fusionados ao terminal C de Fc.

[059] Figura 29 é uma representação de uma TriNKET na forma de Corpo-Cov-X.

[060] Figuras 30A-30B são representações de TriNKETs nas formas de Corpo-κλ, que são construções heterodiméricas com dois diferentes fragmentos Fab fusionados a Fc estabilizados por mutações de heterodimerização: um antígeno 1 de marcação de fragmento Fab contém kappa LC, e o segundo antígeno 2 de marcação de fragmento Fab contém lambda LC. Figura 30A é uma representação exemplar de uma forma de um Corpo-κλ; Figura 30B é uma representação exemplar de outro Corpo-κλ.

[061] Figura 31 é uma construção heterodimérica Oasc-Fab que inclui fragmento Fab se ligando ao alvo 1 e scFab

se ligando ao alvo 2, ambos dos mesmos são fusionados ao domínio Fc. Heterodimerização é assegurada por mutações no domínio Fc.

[062] Figura 32 é um DuetMab, que é uma construção heterodimérica contendo dois diferentes fragmentos Fab se ligando a antígenos 1 e 2, e um Fc que é estabilizado por mutações de heterodimerização. Os fragmentos Fab 1 e 2 contém pontes S-S diferenciais que asseguram o pareamento correto de cadeia leve e cadeia pesada.

[063] Figura 33 é um CrossmAb, que é uma construção heterodimérica com dois diferentes fragmentos Fab se ligando a alvos 1 e 2 e um Fc estabilizado por mutações de heterodimerização. Os domínios CL e CH1 e domínios VH e VL são comutados, por exemplo, CH1 é fusionado em linha com VL, enquanto CL é fusionado em linha com VH.

[064] Figura 34 é um Fit-Ig, que é uma construção homodimérica onde fragmento Fab se ligando ao antígeno 2 é fusionado ao terminal N de HC de fragmento Fab que se liga ao antígeno 1. A construção contém Fc de tipo selvagem.

[065] Figura 35 são gráficos de linha mostrando ligação de TriNKETs direcionadas a CLEC12A (por exemplo, A49-TriNKET-CLEC12A) e um anticorpo monoclonal anti-CLEC12A para linhagem de células AML humanas SKM-1 expressando CLEC12A.

[066] Figura 36 são gráficos de linha mostrando ligação de TriNKETs direcionadas a CLEC12A (por exemplo, A49-TriNKET-CLEC12A) e um anticorpo monoclonal anti-CLEC12A para linhagem de células AML humanas U937 expressando CLEC12A.

[067] Figura 37 são gráficos de linha mostrando

ligação de TriNKETs direcionadas a CLEC12A (por exemplo, A49-TriNKET-CLEC12A) e um anticorpo monoclonal anti-CLEC12A para células EL4 expressando NKG2D humano.

[068] Figura 38 são gráficos de linha mostrando internalização de TriNKETs direcionadas a CLEC12A (por exemplo, A49-TriNKET-CLEC12A), um anticorpo anti-CLEC12A, e anticorpo anti-CD33 lintuzumab em células HL60.

[069] Figura 39 são gráficos de linha mostrando internalização de TriNKETs direcionadas a CLEC12A (por exemplo, A49-TriNKET-CLEC12A), um anticorpo anti-CLEC12A, e anticorpo anti-CD33 lintuzumab em células SKM-1.

[070] Figura 40 são gráficos de linha mostrando internalização de TriNKET direcionada a CLEC12A (por exemplo, A49-TriNKET-CLEC12A), um anticorpo anti-CLEC12A, e anticorpo anti-CD33 lintuzumab em células U937.

[071] Figura 41 são gráficos de linha mostrando que TriNKETs direcionadas a CLEC12A mediam a morte de células NK humanas primárias de células alvo HL60. Os anticorpos de controle são um anticorpo monoclonal anti-CLEC12A e uma TriNKET não específica (por exemplo, uma TriNKET que não marca CLEC12A).

[072] Figura 42 são gráficos de linha mostrando que TriNKETs direcionadas a CLEC12A mediam a morte de células NK humanas primárias de células alvo Mv4-11. Os anticorpos de controle são um anticorpo monoclonal anti-CLEC12A e uma TriNKET não específica (por exemplo, uma TriNKET que não marca CLEC12A).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[073] A invenção provê proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam a CLEC12A em uma célula de

câncer e ao receptor NKG2D e receptor CD16 em células matadoras naturais para ativar células matadoras naturais, composições farmacêuticas compreendendo tais proteínas de ligação multiespecíficas, e métodos terapêuticos usando tais proteínas multiespecíficas e composições farmacêuticas, incluindo para o tratamento de câncer. Vários aspectos da invenção são especificados abaixo em seções; no entanto, aspectos da invenção descritos em uma seção particular não são limitados a qualquer seção particular.

[074] Para facilitar a compreensão da presente invenção, vários termos e frases são definidos abaixo.

[075] Os termos "um" e "uma", como aqui usados, significam "um ou mais" e incluem o plural, salvo se o contexto for inadequado.

[076] Como usado aqui, o termo "sítio de ligação ao antígeno" refere-se à parte da molécula de imunoglobulina que participa da ligação ao antígeno. Em anticorpos humanos, o sítio de ligação ao antígeno é formado por resíduos de aminoácidos das regiões variáveis N-terminais ("V") das cadeias pesada ("H") e leve ("L"). Três trechos altamente divergentes dentro das regiões V das cadeias pesada e leve são chamados como "regiões hipervariáveis", que são interpostas entre trechos de flanqueamento mais conservados, conhecidos como "regiões de framework", ou "FR". Assim, o termo "FR" refere-se a sequências de aminoácidos que são naturalmente encontradas entre e adjacentes a regiões hipervariáveis em imunoglobulinas. Em uma molécula de anticorpo humano, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões

hipervariáveis de uma cadeia pesada são dispostas uma em relação à outra em espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação ao antígeno. A superfície de ligação ao antígeno é complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, e as três regiões hipervariáveis de cada uma das cadeias pesada e leve são referidas como "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs". Em certos animais, como camelos e peixes cartilaginosos, o sítio de ligação ao antígeno é formado por uma cadeia de anticorpos única, fornecendo um "anticorpo de domínio único". Os sítios de ligação ao antígeno podem existir em um anticorpo intacto, em um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo que retém a superfície de ligação ao antígeno, ou em um polipeptídeo recombinante, como um scFv, usando um vinculador de peptídeo para conectar o domínio variável de cadeia pesada ao domínio variável de cadeia leve em um único polipeptídeo.

[077] O termo "antígeno associado ao tumor", como usado aqui, significa qualquer antígeno incluindo, mas não limitado a, uma proteína, glicoproteína, gangliosídeo, carboidrato, lipídio que está associado com câncer. Tal antígeno pode ser expresso em células malignas ou no microambiente do tumor, como em vasos sanguíneos associados ao tumor, matriz extracelular, estroma mesenquimal ou infiltrados imunes.

[078] Como usado aqui, os termos "sujeito" e "paciente" se referem a um organismo a ser tratado pelos métodos e composições aqui descritos. Tais organismos incluem, preferivelmente, mas não são limitados a, mamíferos (por exemplo, murinos, símios, equinos, bovinos,

suínos, caninos, felinos e similares) e, mais preferivelmente, incluem humanos.

[079] Como aqui usado, o termo "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de um composto (por exemplo, um composto da presente invenção) suficiente para alcançar resultados benéficos ou desejados. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações, aplicações ou dosagens e não se destina a ser limitada a uma formulação ou via de administração particular. Como aqui usado, o termo "tratamento" inclui qualquer efeito, por exemplo, diminuindo, reduzindo, modulando, melhorando ou eliminando, que resulta na melhora da condição, doença, distúrbio e similares, ou na melhora de um sintoma dos mesmos.

[080] Como usado aqui, o termo "composição farmacêutica" refere-se à combinação de um agente ativo com um carreador, inerte ou ativo, tornando a composição especialmente apropriada para uso diagnóstico ou terapêutico *in vivo* ou *ex vivo*.

[081] Como usado aqui, o termo "carreador farmaceuticamente aceitável" refere-se a qualquer um dos carreadores farmacêuticos padrão, como uma solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões (por exemplo, como emulsões de óleo/água ou água/óleo), e vários tipos de agentes umectantes. As composições também podem incluir estabilizantes e conservantes. Para exemplos de carreadores, estabilizadores e adjuvantes, ver, por exemplo, Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[082] Como aqui usado, o termo "sal farmaceuticamente

aceitável" refere-se a qualquer sal farmaceuticamente aceitável (por exemplo, ácido ou base) de um composto da presente invenção que, mediante administração a um sujeito, é capaz de fornecer um composto desta invenção ou um metabólito ativo ou resíduo do mesmo. Como é conhecido dos técnicos no assunto, "sais" dos compostos da presente invenção podem ser derivados de bases e ácidos inorgânicos ou orgânicos. Exemplos de ácidos incluem, mas não são limitados a, ácido clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfônico, tartárico, acético, cítrico, metanossulfônico, etanossulfônico, fórmico, benzóico, malônico, naftaleno-2-sulfônico, benzenossulfônico e similares. Outros ácidos, como oxálico, embora não sejam, eles mesmos, farmaceuticamente aceitáveis, podem ser empregados na preparação de sais úteis como intermediários na obtenção dos compostos da invenção e de seus sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis.

[083] Bases exemplares incluem, mas não são limitadas a, hidróxidos de metais alcalinos (por exemplo, sódio), hidróxidos de metais alcalinos-terrosos (por exemplo, magnésio), amônia e compostos de fórmula NW_4^+, em que W é C_{1-4} alquila, e similares.

[084] Sais exemplares incluem, mas não são limitados a: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, bissulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato,

hexanoato, cloridrato, bromidrato, iodidrato, 2-hidroxi etanossulfonato, lactato, maleato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato e similares. Outros exemplos de sais incluem ânions dos compostos da presente invenção compostos com um cátion apropriado, como Na^+, NH_4^+, e NW_4^+ (em que W é um grupo C_{1-4} alquila), e similares.

[085] Para uso terapêutico, sais dos compostos da presente invenção são contemplados como sendo farmaceuticamente aceitáveis. No entanto, sais de ácidos e bases que são não farmaceuticamente aceitáveis também podem encontrar uso, por exemplo, na preparação ou purificação de um composto farmaceuticamente aceitável.

[086] Em toda a descrição, onde composições são descritas como tendo, incluindo ou compreendendo componentes específicos, ou onde processos e métodos são descritos como tendo, incluindo ou compreendendo etapas específicas, é contemplado que, adicionalmente, existem composições da presente invenção que consistem essencialmente em, ou consistem em componentes citados, e que existem processos e métodos, de acordo com a presente invenção, que consistem essencialmente em, ou consistem nas etapas de processamento citadas.

[087] Como uma questão geral, composições especificando uma porcentagem são expressas em peso, salvo especificado de outra forma. Além disso, se uma variável não for acompanhada por uma definição, então, a definição anterior da variável serve como controle.

I. PROTEÍNAS

[088] A invenção provê proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam ao receptor NKG2D e receptor CD16 em células matadoras naturais, e ao antígeno associado ao tumor CLEC12A. As proteínas de ligação multiespecíficas são utilizáveis nas composições farmacêuticas e métodos terapêuticos aqui descritos. Ligação das proteínas de ligação multiespecíficas ao receptor NKG2D e receptor CD16 em uma célula matadora natural intensifica a atividade da célula matadora natural em direção à destruição de células de tumor expressando o antígeno associado ao tumor CLEC12A. Ligação das proteínas de ligação multiespecíficas às células expressando antígeno associado ao tumor leva as células de câncer para uma proximidade com a célula matadora natural, o que facilita a destruição direta e indireta das células de câncer pela célula matadora natural. Descrição adicional de algumas proteínas de ligação multiespecíficas exemplares é apresentada abaixo.

[089] O primeiro componente das proteínas de ligação multiespecíficas se liga às células expressando receptor NKG2D, que podem incluir, mas não são limitadas a, células NK, células T γδ e células T $CD8^+$ αβ. Quando da ligação a NKG2D, as proteínas de ligação multiespecíficas podem bloquear os ligandos naturais, tal como ULBP6 (proteína de ligação 6 a UL16) e MICA (complexo de histocompatibilidade principal Classe I relacionado com cadeia A) de se ligar a NKG2D e ativar os receptores NKG2D.

[090] O segundo componente das proteínas de ligação multiespecíficas se liga a um antígeno associado a tumor CLEC12A. As células expressando antígeno associado ao

tumor, que podem ser encontradas em leucemias tal como, por exemplo, leucemia mielóide aguda e leucemia de células T.

[091] O terceiro componente para as proteínas de ligação multiespecíficas se liga a células expressando CD16, um receptor de Fc sobre a superfície de leucócitos, incluindo células matadoras naturais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, e células dendríticas foliculares.

[092] As proteínas de ligação multiespecíficas descrias aqui podem tomar vários formatos. Por exemplo, um formato é um anticorpo multiespecífico, heterodimérico, incluindo uma primeira cadeia pesada de imunoglobulina, uma primeira cadeia leve de imunoglobulina, uma segunda cadeia pesada de imunoglobulina e uma segunda cadeia leve de imunoglobulina (Figura 1). A primeira cadeia pesada de imunoglobulina inclui um primeiro domínio Fc (dobradiça-CH2-CH3), um primeiro domínio variável de cadeia pesada e opcionalmente um primeiro domínio de cadeia pesada CH1. A primeira cadeia leve de imunoglobulina inclui um primeiro domínio variável de cadeia leve e um primeiro domínio constante de cadeia leve. A primeira cadeia leve de imunoglobulina, junto com a primeira cadeia pesada de imunoglobulina, forma um sítio de ligação ao antígeno que se liga a NKG2D. A segunda cadeia pesada de imunoglobulina compreende um segundo domínio Fc (dobradiça-CH2-CH3), um segundo domínio variável de cadeia pesada e opcionalmente um segundo domínio de cadeia pesada CH1. A segunda cadeia leve de imunoglobulina inclui um segundo domínio variável de cadeia leve e um segundo domínio constante de cadeia leve. A segunda cadeia leve de imunoglobulina, junto com a

segunda cadeia pesada de imunoglobulina, forma um sítio de ligação ao antígeno que se liga ao antígeno associado ao tumor CLEC12A. O primeiro domínio Fc e o segundo domínio Fc juntos são capazes de se ligar a CD16 (Figura 1). Em algumas modalidades, a primeira cadeia leve de imunoglobulina é idêntica à segunda cadeia leve de imunoglobulina.

[093] Outro formato exemplar envolve um anticorpo multiespecífico, heterodimérico, incluindo uma primeira cadeia pesada de imunoglobulina, uma segunda cadeia pesada de imunoglobulina e uma cadeia leve de imunoglobulina (Figura 2). A primeira cadeia pesada de imunoglobulina inclui um primeiro domínio Fc (dobradiça-CH2-CH3) fusionado via ou um vinculador ou uma dobradiça de anticorpo a um fragmento variável de cadeia simples (scFv) composto de um domínio variável de cadeia pesada e domínio variável de cadeia leve que pareiam e se ligam a NKG2D, ou se ligam a um antígeno associado ao tumor CLEC12A. A segunda cadeia pesada de imunoglobulina inclui um segundo domínio Fc (dobradiça-CH2-CH3), um segundo domínio variável de cadeia pesada e, opcionalmente, um domínio de cadeia pesada CH1. A cadeia leve de imunoglobulina inclui um domínio variável de cadeia leve e domínio constante de cadeia leve. A segunda cadeia pesada de imunoglobulina pareia com a cadeia leve de imunoglobulina e se liga à NKG2D ou se liga a CLEC12A. O primeiro domínio Fc e o segundo domínio Fc são capazes, juntos, de se ligar a CD16 (Figura 2).

[094] Um ou mais motivos de ligação adicionais pode ser fusionado ao terminal C do domínio CH3 de região constante, opcionalmente via uma sequência de vinculador.

Em certas modalidades, o motivo de ligação ao antígeno é uma região variável de cadeia simples ou estabilizada com dissulfeto (scFv) formando uma molécula tetravalente ou trivalente.

[095] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma Triomab, que é um anticorpo biespecífico trifuncional que mantém um formato semelhante a IgG. Esta quimera consiste em dois meio-anticorpos, cada com uma cadeia leve e uma pesada, que se originam de dois anticorpos parentais.

[096] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica é a forma de cadeia leve comum KiH (LC), que envolve a tecnologia *knobs-into-holes* (KIHs). A KIH envolve a engenharia de domínios C_H3 para criar ou uma "protuberância" ou um "buraco" em cada cadeia pesada para promover heterodimerização. O conceito por trás da tecnologia de Fc "*Knobs-into-Holes* (KiH)" consiste em introduzir uma "protuberância" em um domínio CH3 (CH3A) por substituição de um resíduo pequeno por um volumoso (por exemplo, $T366W_{CH3A}$ em numeração EU). Para acomodar a "protuberância," uma superfície de "buraco" complementar foi criada no outro domínio CH3 (CH3B) por substituição dos resíduos vizinhos mais próximos da protuberância pelos menores (por exemplo, $T366S/L368A/Y407V_{CH3B}$). A mutação do "buraco" foi otimizada por triagem da biblioteca de fagos estruturada-guiada (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., *Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library*, J. Mol. Biol. (1997) 270(1):26-35). *X-ray crystal structures of KiH Fc variants* (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R,

Takeda K, Spiess C, *et al.*, *Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction*. J. Mol. Biol. (2014) 426(9):1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. *Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs*. Mol. Immunol. (2014) 58(1):132-8) demonstraram que heterodimerização é termodinamicamente favorecida por interações hidrofóbicas dirigidas por complementaridade estérica na interface do núcleo do domínio inter-CH3, enquanto as interfaces protuberância-protuberância e buraco-buraco não favorecem a homodimerização devido ao impedimento estérico e disrupção das interações favoráveis, respectivamente.

[097] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma de imunoglobulina de domínio variável duplo (DVD-Ig™), que combina os domínios de ligação alvo dos dois anticorpos monoclonais via vinculadores flexíveis de ocorrência natural, e produz uma molécula semelhante a IgG tetravalente.

[098] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma de interface de Fab ortogonal (Orto-Fab). Na abordagem de IgG orto-Fab (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, *et al.*, *Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab Interface*. Nat. Biotechnol (2014) 32(2):191-8), o desenho regional à base de estrutura introduz mutações complementares a interface LC e HC_{VH-CH1} em apenas um fragmento Fab, sem quaisquer mudanças sendo feitas no outro fragmento Fab.

[099] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está no formato de Ig 2-em-1. Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma ES, que é uma construção heterodimérica contendo dois diferentes fragmentos Fab se ligando a alvos 1 e alvo 2 fusionados no Fc. Heterodimerização é assegurada por mutações de direção eletrostática no Fc.

[100] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma de Corpo-κλ, que é uma construção heterodimérica com dois diferentes fragmentos Fab fusionados ao Fc estabilizado por mutações de heterodimerização: antígeno 1 marcando fragmento Fab 1 contém kappa LC, enquanto o segundo antígeno 2 marcando fragmento Fab contém lambda LC. Figura 30A é uma representação exemplar de uma forma de um Corpo-κλ; Figura 30B é uma representação exemplar de outro Corpo-κλ.

[101] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está em forma de troca de braço Fab (anticorpos que trocam braços Fab permutando uma cadeia pesada e cadeia leve fixada (meia-molécula) com um par de cadeias pesada-leve de outra molécula, que resulta em anticorpos biespecíficos).

[102] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma de Corpo SEED. A plataforma de domínio modificado com troca de fita (SEED) foi planejada para gerar moléculas semelhantes a anticorpos biespecíficos e assimétricos, uma capacidade que expande as aplicações terapêuticas de anticorpos naturais. Esta plataforma modificada de proteínas é baseada em troca de sequências de imunoglobulina estruturalmente relacionadas

dentro dos domínios de CH3 conservados. O desenho de SEED permite a geração eficaz de heterodímeros AG/GA, enquanto desfavorecendo homodimerização de domínios de CH3 AG e GA SEED. (Muda M. *et al.*, Protein Eng. Des. Sel. (2011, 24(5):447-54)).

[103] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma LuZ-Y, em que um zíper leucina é usado para induzir heterodimerização de dois diferentes HCs. (Wranik, BJ. *et al.*, J. Biol. Chem. (2012), 287:43331-9).

[104] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está na forma de Corpo-Cov-X. Em Corpos-CovX biespecíficos, dois diferentes peptídeos são unidos juntos usando um vinculador de azetidinona ramificado e fusionado ao anticorpo de andaime sob condições suaves em um modo sítio-específico. Enquanto os farmacóforos são responsáveis por atividades funcionais, o andaime do anticorpo confere uma meia-vida longa e distribuição semelhante a Ig. Os farmacóforos podem ser quimicamente otimizados ou substituídos com outros farmacóforos para gerar anticorpos biespecíficos otimizados ou únicos. (Doppalapudi VR *et al.*, PNAS (2010), 107(52);22611-22616).

[105] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está em uma forma heterodimérica Oasc-Fab que inclui fragmento Fab se ligando ao alvo 1, e scFab se ligando ao alvo 2 fusionado a Fc. Heterodimerização é assegurada por mutações no Fc.

[106] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está em uma forma DuetMab, que é uma construção heterodimérica contendo dois diferentes

fragmentos Fab se ligando a antígenos 1 e 2, e Fc estabilizado por mutações de heterodimerização. Fragmentos Fabs 1 e 2 contém pontes S-S diferenciais que asseguram o pareamento correto de LC e HC.

[107] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está em uma forma CrossmAb, que é uma construção heterodimérica com dois diferentes fragmentos Fab se ligando a alvos 1 e 2, fusionados a Fc estabilizado por heterodimerização. Os domínios CL e CH1 e domínios VH e VL são comutados, por exemplo, CH1 é fusionado em linha com VL, enquanto CL é fusionado em linha com VH.

[108] Em algumas modalidades, a proteína de ligação multiespecífica está em uma forma Fit-Ig, que é uma construção homodimérica onde fragmento Fab se ligando ao antígeno 2 é fusionado no terminal N de HC de fragmento Fab que se liga ao antígeno 1. A construção contém Fc tipo selvagem.

[109] Tabela 1 relaciona sequências de peptídeos de domínios variáveis de cadeia pesada e domínios variáveis de cadeia leve que, em combinação, podem se ligar a NKG2D. Os domínios de ligação a NKG2D podem variar em sua afinidade de ligação para NKG2D, mesmo assim, eles todos ativam as células NKG2D e NK humanas.

Tabela 1		
Clone	Sequência de aminoácido de região variável de cadeia pesada	Sequência de aminoácido de região variável de cadeia leve
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:105) –	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)

	GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:106) - EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:107) - ARARGPWSFDP	
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQSNSYYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYNSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWGFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQS ISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSA TYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFA TYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)

ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)

	(SEQ ID NO:35)	
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYELYSYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTA NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGDSSIRHAYYYYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:41) CDR1 (SEQ ID NO:43) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:44) - GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:45) - ARGDSSIRHAYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS VLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYYSTPITFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:42) CDR1 (SEQ ID NO:46) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:47) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:48) - QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI SSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGS TYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARGSDRFHPYFDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:51) - GSISSSSYYWG CDR2 (SEQ ID NO:52) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:53) - ARGSDRFHPYFDY	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:50) CDR1 (SEQ ID NO:54) - RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:55) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:56) - QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCEQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:58)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTA NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRGRKASGSFYYYYGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:59) CDR1 (SEQ ID NO:109) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:110) - GIIPIFGTANYAQKFQG	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEI K (SEQ ID NO:60) CDR1 (SEQ ID NO:112) - ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO:113) - WASTRES

	CDR3 (SEQ ID NO:111) - ARRGRKASGSFYYYYGMDV	CDR3 (SEQ ID NO:114) - QNDYSYPYT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARGAPNYGDTTHDYYYMDVW GKGTTVTVSS (SEQ ID NO:61) CDR1 (SEQ ID NO:63) - YTFTSYYMH CDR2 (SEQ ID NO:64) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS VSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRAT GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFA VYYCQQYDDWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:66) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:68) - QQYDDWPFT
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:69) CDR1 (SEQ ID NO:71) - YTFTGYYMH CDR2 (SEQ ID NO:72) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:73) - ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS VSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRAT GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFA VYYCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:70) CDR1 (SEQ ID NO:74) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:75) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:76) - QQDDYWPPT
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:77) CDR1 (SEQ ID NO:79) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO:80) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:81) - AKDGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQG IDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:78) CDR1 (SEQ ID NO:82) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:83) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:84) - QQGVSYPRT
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYI YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:87) - FTFSSYSMN CDR2 (SEQ ID NO:88) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:89) - ARGAPMGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:86) CDR1 (SEQ ID NO:90) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:91) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:92) - QQGVSFPRT
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA

	SEDTAVYYCAREGAGFAYGMDYYYMDVWG KGTTVTVSS (SEQ ID NO:93) CDR1 (SEQ ID NO:95) - YTFTSYYMH CDR2 (SEQ ID NO:96) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:97) - AREGAGFAYGMDYYYMDV	VYYCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:94) CDR1 (SEQ ID NO:98) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:99) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:100) - QQSDNWPFT

[110] Alternativamente, um domínio variável de cadeia pesada representado por SEQ ID NO:101 pode ser pareado com um domínio variável de cadeia leve representado por SEQ ID NO:102 para formar um sítio de ligação ao antígeno que pode se ligar a NKG2D, como ilustrado em U.S. 9.273.136.

[111] SEQ ID NO:101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQG TTVTVSS

[112] SEQ ID NO:102

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLL PSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[113] Alternativamente, um domínio variável de cadeia pesada representado por SEQ ID NO:103 pode ser pareado com um domínio variável de cadeia leve representado por SEQ ID NO:104 para formar um sítio de ligação ao antígeno que pode se ligar a NKG2D, como ilustrado em U.S. 7.879.985.

[114] SEQ ID NO:103

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSG SANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMVTVS S

[115] SEQ ID NO:104

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR

ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[116] Tabela 2 relaciona sequências de peptídeos de domínios variáveis de cadeia pesada e domínios variáveis de cadeia leve que, em combinação, podem se ligar a CLL-1/CLEC12A.

Tabela 2

Nome de anticorpo (Fonte)	Sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada	Sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve
Anticorpo anti-CLEC12A 4331 (U.S. 2014/0120096 A1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGN YGDEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:115) CDR1: SGYTFTSY (SEQ ID NO:116) CDR2: IINPSGGS (SEQ ID NO:117) e CDR3: GNYGDEFDY (SEQ ID NO:118)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:119) CDR1(SEQ ID NO:120) - RASQSISSYLN CDR2 (SEQ ID NO:121) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:122) - QQSYSTPPT

[117] Sítios de ligação ao antígeno que podem se ligar ao antígeno associado ao tumor CLL1 podem ser identificados por triagem para ligação à sequência de aminoácido definida por SEQ ID NO:123.

[118] SEQ ID NO:123

MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLI GLGVLASMFHVTLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISNKIRNLSTTLQTIA TKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINN KNALEFIKSQSRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYCGYINR LYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQLGSTYFREA

[119] Dentro do domínio Fc, ligação a CD16 é mediada pela região de dobradiça e o domínio CH2. Por exemplo, dentro de IgG1 humana, a interação com CD16 é primariamente focalizada em resíduos de aminoácidos Asp 265 – Glu 269,

Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239, e resíduo de carboidrato N-acetil-D-glucosamina no domínio CH2 (ver, Sondermann *et al.*, Nature, 406 (6793):267-273). Com base nos domínios conhecidos, mutações podem ser selecionadas para intensificar ou reduzir a afinidade de ligação a CD16, tal como usando bibliotecas de exibição de fagos ou bibliotecas de cDNA exibidas na superfície de leveduras, ou podem ser projetadas com base na estrutura tridimensional conhecida da interação.

[120] A montagem de cadeias pesadas de anticorpos heterodiméricos pode ser realizada pela expressão de duas sequências diferentes de cadeias pesadas de anticorpos na mesma célula, o que pode levar à montagem de homodímeros de cada cadeia pesada de anticorpo, bem como à montagem de heterodímeros. A promoção da montagem preferencial de heterodímeros pode ser obtida incorporando diferentes mutações no domínio CH3 de cada região constante da cadeia pesada de anticorpo, como mostrado em US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480, e US14/830336. Por exemplo, mutações podem ser feitas no domínio CH3 com base na IgG1 humana e incorporando pares distintos de substituições de aminoácidos dentro de um primeiro polipeptídeo e um segundo polipeptídeo que permitem que essas duas cadeias heterodimerizem seletivamente uma com a outra. As posições das substituições de aminoácidos ilustradas abaixo são todas numeradas de acordo com o índice UE como em Kabat.

[121] Em um cenário, uma substituição de aminoácidos no primeiro polipeptídeo substitui o aminoácido original

por um aminoácido maior, selecionado entre arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) ou triptofano (W) e pelo menos uma substituição de aminoácidos no segundo polipeptídeo substitui o(s) aminoácido(s) original por um aminoácido(s) menor(es), escolhido(s) dentre alanina (A), serina (S), treonina (T) ou valina (V), de forma que a substituição de aminoácido maior (uma protuberância) se encaixa na superfície das substituições de aminoácidos menores (uma cavidade). Por exemplo, um polipeptídeo pode incorporar uma substituição T366W e o outro pode incorporar três substituições, incluindo T366S, L368A e Y407V.

[122] Um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo da invenção pode opcionalmente ser acoplado a uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica a uma região constante de anticorpo, tal como uma região constante de IgG incluindo dobradiça, domínios CH2 e CH3 com ou sem domínio CH1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos da região constante é pelo menos 90% idêntica a uma região constante de anticorpo humano, tal como uma região constante de IgG1 humana, uma região constante de IgG2, região constante de IgG3, ou região constante de IgG4. Em algumas outras modalidades, a sequência de aminoácidos da região constante é pelo menos 90% idêntica a uma região constante de anticorpo de outro mamífero, tal como coelho, cão, gato, camundongo ou cavalo. Uma ou mais mutações podem ser incorporadas na região constante, como comparada com a região constante de IgG1 humana, por exemplo, em Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 e/ou K439. Substituições

exemplares incluem, por exemplo, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D, e K439E.

[123] Em certas modalidades, mutações que podem ser incorporadas em CH1 de uma região constante de IgG1 humana podem ser em aminoácido V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171, e/ou V173. Em certas modalidades, mutações que podem ser incorporadas em Cκ de uma região constante de IgG1 humana podem ser em aminoácido E123, F116, S176, V163, S174, e/ou T164.

[124] Alternativamente, substituições de aminoácidos podem ser selecionadas dentre os seguintes conjuntos de substituições mostrados na Tabela 3.

Tabela 3		
	Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo
Conjunto 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Conjunto 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Conjunto 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Conjunto 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Conjunto 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Conjunto 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Conjunto 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Conjunto 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Conjunto 9	L368D/K370S	S364K
Conjunto 10	L368E/K370S	S364K
Conjunto 11	K360E/Q362E	D401K
Conjunto 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Conjunto 13	K370S	S364K/E357Q
Conjunto 14	F405L	K409R
Conjunto 15	K409R	F405L

[125] Alternativamente, substituições de aminoácidos

podem ser selecionadas dentre os seguintes conjuntos de substituições mostrados na Tabela 4.

Tabela 4		
	Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo
Conjunto 1	K409W	D399V/F405T
Conjunto 2	Y349S	E357W
Conjunto 3	K360E	Q347R
Conjunto 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Conjunto 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Conjunto 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[126] Alternativamente, substituições de aminoácido podem ser selecionadas dentre o seguinte conjunto de substituições mostrado na Tabela 5.

Tabela 5		
	Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo
Conjunto 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Conjunto 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Conjunto 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Conjunto 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Conjunto 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Conjunto 6	E356K/D399K	K392D/K409D

[127] Alternativamente, pelo menos uma substituição de aminoácido em cada cadeia de polipeptídeo pode ser selecionada da Tabela 6.

Tabela 6	
Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D e T411E

[128] Alternativamente, pelo menos uma substituição de aminoácidos pode ser selecionada dentre o seguinte conjunto de substituições na Tabela 7, onde a(s) posição(ões) indicada(s) na coluna de Primeiro Polipeptídeo é substituída por qualquer aminoácido negativamente carregado conhecido, e a(s) posição(ões) indicada(s) na coluna de Segundo Polipeptídeo é substituída por qualquer aminoácido positivamente carregado conhecido.

Tabela 7	
Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo

K392, K370, K409, ou K439	D399, E356, ou E357

[129] Alternativamente, pelo menos uma substituição de aminoácido pode ser selecionada dentre o seguinte conjunto na Tabela 8, onde a(s) posição(ões) indicada(s) na coluna de Primeiro Polipeptídeo é(são) substituída(s) por qualquer aminoácido positivamente carregado conhecido, e a(s) posição(ões) indicada(s) na coluna de Segundo Polipeptídeo é(são) substituída(s) por qualquer aminoácido negativamente carregado conhecido.

Tabela 8	
Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo
D399, E356, ou E357	K409, K439, K370, ou K392

[130] Alternativamente, substituições de aminoácidos podem ser selecionadas dentre o seguinte conjunto na Tabela 9.

Tabela 9	
Primeiro Polipeptídeo	Segundo Polipeptídeo
T350V, L351Y, F405A, e Y407V	T350V, T366L, K392L, e T394W

[131] Alternativamente, ou em adição, a estabilidade estrutural de uma proteína hetero-multimérica pode ser aumentada por introdução de S354C ou na primeira ou na segunda cadeias de polipeptídeo, e Y349C na cadeia oposta de polipeptídeo, que forma uma ponte dissulfeto artificial dentro da interface dos dois polipeptídeos.

[132] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em posição T366, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais

posições selecionadas dentre o grupo consistindo em T366, L368 e Y407.

[133] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em T366, L368 e Y407, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 na posição T366.

[134] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405, e T411 e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 e T411.

[135] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 e T411 e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de

aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405, e T411.

[136] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em L351, D399, S400 e Y407 e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em T366, N390, K392, K409 e T411.

[137] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em T366, N390, K392, K409 e T411 e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em L351, D399, S400 e Y407.

[138] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Q347, Y349, K360, e K409, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo

difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Q347, E357, D399 e F405.

[139] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Q347, E357, D399 e F405, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Y349, K360, Q347 e K409.

[140] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em K370, K392, K409 e K439, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em D356, E357 e D399.

[141] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em D356, E357 e D399, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da

sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em K370, K392, K409 e K439.

[142] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em L351, E356, T366 e D399, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Y349, L351, L368, K392 e K409.

[143] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Y349, L351, L368, K392 e K409, e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em L351, E356, T366 e D399.

[144] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por uma substituição S354C e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por

uma substituição Y349C.

[145] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por uma substituição Y349C e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por uma substituição S354C.

[146] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições K360E e K409W e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições O347R, D399V e F405T.

[147] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições O347R, D399V e F405T e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições K360E e K409W.

[148] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por uma substituição T366W e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de

polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições T366S, T368A, e Y407V.

[149] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições T366S, T368A, e Y407V e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por uma substituição T366W.

[150] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições T350V, L351Y, F405A, e Y407V e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições T350V, T366L, K392L, e T394W.

[151] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido de uma cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições T350V, T366L, K392L, e T394W e em que a sequência de aminoácido da outra cadeia de polipeptídeo da região constante de anticorpo difere da sequência de aminoácido de uma região constante de IgG1 por substituições T350V, L351Y, F405A, e Y407V.

[152] As proteínas multiespecíficas descritas acima

podem ser feitas usando tecnologia de DNA recombinante bem conhecida para um técnico no assunto. Por exemplo, uma primeira sequência de ácido nucleico codificando a primeira cadeia pesada de imunoglobulina pode ser clonada em um primeiro vetor de expressão; uma segunda sequência de ácido nucleico codificando a segunda cadeia pesada de imunoglobulina pode ser clonada em um segundo vetor de expressão; uma terceira sequência de ácido nucleico codificando a cadeia leve de imunoglobulina pode ser clonada em um terceiro vetor de expressão; e o primeiro, segundo e terceiro vetores de expressão podem ser estavelmente transfectados juntos em células hospedeiras para produzir as proteínas multiméricas.

[153] Para alcançar o maior rendimento da proteína multiespecífica, diferentes razões do primeiro, segundo e terceiro vetores de expressão podem ser exploradas para determinar a razão ótima para transfecção nas células hospedeiras. Após transfecção, clones únicos podem ser isolados para geração de banco de células usando métodos conhecidos na técnica, como diluição limitada, ELISA, FACS, microscopia ou Clonepix.

[154] Clones podem ser cultivados sob condições apropriadas para ampliação no biorreator e expressão mantida da proteína multiespecífica. As proteínas multiespecíficas podem ser isoladas e purificadas usando métodos conhecidos na técnica, incluindo centrifugação, filtração em profundidade, lise celular, homogeneização, congelamento-descongelamento, purificação por afinidade, filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia de troca de interação hidrofóbica e

cromatografia de modo misto.

II. CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS MULTIESPECÍFICAS

[155] As proteínas multiespecíficas aqui descritas incluem um sítio de ligação a NKG2D, um sítio de ligação a CD16, e um antígeno associado a tumor CLEC12A. Em algumas modalidades, as proteínas multiespecíficas se ligam simultaneamente a células expressando NKG2D e/ou CD16, tal como células NK, e a células de tumor expressando um antígeno associado a tumor CLEC12A. Ligação das proteínas multiespecíficas a células NK pode intensificar a atividade das células NK para a destruição das células de tumor.

[156] Em algumas modalidades, as proteínas multiespecíficas se ligam a um antígeno associado a tumor CLEC12A com uma afinidade similar para o correspondente anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal 4331, descrito na Publicação de Pedido de Patente U.S. no. 2104/0120096 A1). Em algumas modalidades, as proteínas multiespecíficas são mais eficazes em morte de células de tumor expressando um antígeno associado a tumor CLEC12A, comparado com o correspondente anticorpo monoclonal.

[157] Em certas modalidades, as proteínas multiespecíficas aqui descritas, que incluem um sítio de ligação a NKG2D e um sítio de ligação para um antígeno associado a tumor CLEC12A, ativam as células NK primárias humanas quando co-cultivando com células expressando CLEC12A. A ativação de células NK é marcada pelo aumento em degranulação de CD107a e produção de citocinas IFN-γ. Além disso, comparado com um anticorpo monoclonal correspondente para CLEC12A, as proteínas multiespecíficas podem mostrar ativação superior de células NK humanas na presença de

células expressando CLEC12A.

[158] Em certas modalidades, as proteínas multiespecíficas aqui descritas, que incluem um sítio de ligação a NKG2D e um sítio de ligação para CLEC12A, intensificam a atividade de células NK humanas em repouso e ativadas por IL-2 em co-cultivo com células expressando CLEC12A.

[159] Em certas modalidades, comparado com um anticorpo monoclonal correspondente que se liga a CLEC12A, as proteínas multiespecíficas oferecem uma vantagem na marcação de células de tumor que expressam CLEC12A. As proteínas de ligação multiespecíficas aqui descritas podem ser mais eficazes na redução do crescimento do tumor e morte de células de câncer. Por exemplo, TriNKETs A49-TriNKET-CLEC12A (um domínio de ligação a NKG2D do clone ADI-27749 e um domínio de ligação a CLEC12A) tem potência intensificada e lise máxima de células alvo expressando CLEC12A, comparado com um anticorpo monoclonal anti-CLEC12A.

III. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

[160] A invenção provê métodos para tratamento de câncer usando uma proteína de ligação multiespecífica aqui descrita e/ou uma composição farmacêutica aqui descrita. Os métodos podem ser usados para tratar uma variedade de cânceres que expressam CLEC12A por administração a um paciente em necessidade da mesma de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de ligação multiespecífica aqui descrita.

[161] O método terapêutico pode ser caracterizado de acordo com o câncer a ser tratado. Por exemplo, em certas

modalidades, o câncer é leucemia mielóide aguda, mieloma múltiplo, linfoma difuso de células B grandes, timoma, carcinoma adenóide cístico, câncer gastrointestinal, câncer renal, câncer de mama, glioblastoma, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de cérebro, câncer de próstata, câncer de pâncreas ou melanoma.

[162] Em algumas outras modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em certas outras modalidades, o câncer é câncer de cólon, câncer de bexiga, câncer cervical, câncer de endométrio, câncer de esôfago, leucemia, câncer de fígado, câncer de reto, câncer de estômago, câncer de testículo ou câncer de útero. Em ainda outras modalidades, o câncer é um tumor vascularizado, carcinoma de célula escamosa, adenocarcinoma, carcinoma de pequenas células, melanoma, glioma, neuroblastoma, sarcoma (por exemplo, um angiossarcoma ou condrossarcoma), câncer de laringe, câncer de parótida, câncer do trato biliar, câncer de tireóide, melanoma acral lentiginoso, queratoses actínicas, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielóide aguda, carcinoma adenoide cístico, adenomas, adenossarcoma, carcinoma adenoescamoso, câncer de canal anal, câncer anal, câncer anorretal, tumor astrocítico, carcinoma da glândula de bartolina, carcinoma de células basais, câncer biliar, câncer ósseo, câncer de medula óssea, câncer brônquico, carcinoma da glândula brônquica, carcinóide, colangiocarcinoma, condrossarcoma, papiloma/carcinoma do plexo coróide, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielóide crônica, carcinoma de células claras, câncer de tecido conjuntivo, cistadenoma, câncer do sistema digestivo, câncer do duodeno, câncer do sistema endócrino,

tumor do seio endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma do estroma endometrial, adenocarcinoma endometrióide, câncer de células endoteliais, câncer ependimário, câncer de células epiteliais, sarcoma de Ewing, câncer de olho e órbita, câncer genital feminino, hiperplasia nodular focal, câncer de vesícula biliar, câncer de antro gástrico, câncer de fundo gástrico, gastrinoma, glioblastoma, glucagonoma, câncer de coração, hemangioblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatose hepática, câncer hepatobiliar, carcinoma hepatocelular, doença de Hodgkin, câncer de íleo, insulinoma, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas interepiteliais, câncer de duto biliar intra-hepático, carcinoma de células escamosas invasivo, câncer de jejuno, câncer articular, sarcoma de Kaposi, câncer pélvico, carcinoma de células grandes, câncer de intestino grosso, leiomiossarcoma, melanomas de lentigo maligno, linfoma, câncer genital masculino, melanoma maligno, tumores mesoteliais malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, câncer meníngeo, câncer mesotelial, carcinoma metastático, câncer de boca, carcinoma mucoepidermóide, mieloma múltiplo, câncer muscular, câncer do trato nasal, câncer do sistema nervoso, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, câncer de pele não epitelial, linfoma não Hodgkin, carcinoma de células tipo grão de aveia, câncer oligodendroglial, câncer de cavidade oral, osteossarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, câncer peniano, câncer da faringe, tumores pituitários, plasmocitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, câncer retal, carcinoma de células renais, câncer do sistema respiratório, retinoblastoma, rabdomiossarcoma,

sarcoma, carcinoma seroso, câncer de seio, câncer de pele, carcinoma de pequenas células, câncer de intestino delgado, câncer de músculo liso, câncer de tecidos moles, tumor secretando somatostatina, câncer de coluna, carcinoma de células escamosas, câncer de músculo estriado, câncer submesotelial, melanoma de espalhamento superficial, leucemia de células T, câncer de língua, carcinoma indiferenciado, câncer de ureter, câncer de uretra, câncer de bexiga urinária, câncer de sistema urinário, câncer de colo uterino, câncer de corpo uterino, melanoma uveal, câncer vaginal, carcinoma verrucoso, VIPoma, câncer de vulva, carcinoma bem diferenciado ou tumor de Wilms.

[163] Em algumas outras modalidades, o câncer é linfoma não Hodgkin, tal como um linfoma de células B ou um linfoma de células T. Em certas modalidades, o linfoma não Hodgkin é um linfoma de célula B, tal como um linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastinal primário de células B, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeno, linfoma de células do manto, linfoma de células B de zona marginal, linfoma de células B de zona marginal extranodal, linfoma de células B de zona marginal nodal, linfoma de células B de zona marginal esplênica, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico, leucemia de célula pilosa, ou linfoma primário do sistema nervoso central (SNC). Em algumas outras modalidades, o linfoma não Hodgkin é um linfoma de células T, tal como um linfoma linfoblástico T precursor, linfoma de células T periféricas, linfoma de células T cutâneas, linfoma de células T angioimunoblásticas, linfoma extranodal de células matadoras naturais/T, linfoma de células T tipo

enteropatia, linfoma de células T semelhante a paniculite subcutâneo, linfoma de células grandes anaplásicas, ou linfoma de células T periféricas.

[164] O câncer a ser tratado pode ser caracterizado de acordo com a presença de um antígeno particular expresso na superfície da célula de câncer. Em certas modalidades, a célula de câncer pode expressar um ou mais dos seguintes além de CLEC12A: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, TROP2, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, e PD1.

[165] Em modalidades da presente invenção, o câncer a ser tratado é selecionado dentre leucemia mielóide aguda (AML), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), neoplasmas mieloproliferativos (MPNs), linfoma, linfomas não Hodgkin, e linfoma de Hodgkin clássico.

[166] Em algumas modalidades da presente invenção, o câncer a ser tratado é AML selecionado dentre leucemia mieloblástica aguda não diferenciada, leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima, leucemia mieloblástica aguda com maturação, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mielomonocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia, leucemia monocítica aguda, leucemia eritróide aguda, leucemia megacarioblástica aguda (AMKL), leucemia basofílica aguda, panmielose aguda com fibrose, e neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN). Em algumas modalidades da presente invenção, a AML é caracterizada por expressão de CLL-1 nas células-tronco de leucemia AML (LSCs). Em algumas

modalidades da presente invenção, as LSCs em um sujeito com AML expressam adicionalmente um marcador de membrana selecionado dentre CD34, CD38, CD123, TIM3, CD25, CD32, e CD96. Em algumas modalidades da presente invenção, a AML é caracterizada como uma doença residual mínima (MRD). Em algumas modalidades da presente invenção, a MRD de AML é caracterizada pela presença ou ausência de uma mutação selecionada dentre *FLT3-ITD* ((tirosina quinase tipo Fms 3)-duplicações em tandem internas (ITD)), *NPM1* (Nucleofosmina 1), *DNMT3A* (gene de DNA metiltransferase *DNMT3A*), e *IDH* (Isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2)).

[167] Em certas modalidades da presente invenção, o câncer é MDS selecionado dentre MDS com displasia multi-linhagem (MDS-MLD), MDS com displasia de linhagem única (MDS-SLD), MDS com sideroblastos em anel (MDS-RS), MDS com blastos em excesso (MDS-EB), MDS com del(5q) isolado, e MDS, não classificada (MDS-U).

[168] Em certas modalidades da presente invenção, a ALL a ser tratada é selecionada dentre leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) e leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Em certas modalidades da presente invenção, a MPN a ser tratada é selecionada dentre policitemia vera, trombocitemia essencial (ET), e mielofibrose. Em certas modalidades da presente invenção, o linfoma não Hodgkin a ser tratado é selecionado dentre linfoma de células B e linfoma de células T. Em certas modalidades da presente invenção, o linfoma a ser tratado é selecionado dentre leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma linfoblástico (LPL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de

Burkitt (BL), linfoma mediastinal primário de células B grandes (PMBL), linfoma folicular, linfoma de células do manto, leucemia de célula pilosa, mieloma de células plasmáticas (PCM) ou mieloma múltiplo (MM), neoplasias de T/NK maduras, e neoplasias histiocíticas.

IV- TERAPIA DE COMBINAÇÃO

[169] Outro aspecto da invenção provê uma terapia de combinação. Uma proteína de ligação multiespecífica descrita aqui pode ser usada em combinação com agentes terapêuticos adicionais para tratar o câncer.

[170] Agentes terapêuticos exemplares que podem ser usados como parte de uma terapia de combinação no tratamento do câncer, incluem, por exemplo, radiação, mitomicina, tretinoína, ribomustina, gencitabina, vincristina, etoposida, cladribina, mitobronitol, metotrexato, doxorubicina, carboquona, pentostatina, nitracrina, zinostatina, cetrorelix, letrozol, raltitrexed, daunorrubicina, fadrozol, fotemustina, timalfasina, sobuzoxana, nedaplatina, citarabina, bicalutamida, vinorelbina, vesnarinona, aminoglutetimida, amsacrina, proglumida, acetato de eliptínio, cetanserina, doxifluridina, etretinato, isotretinoína, estreptozocina, nimustina, vindesina, flutamida, drogenil, butocina, carmofur, razoxana, sizofilana, carboplatina, mitolactol, tegafur, ifosfamida, prednimustina, picibanil, levamisol, teniposida, improsulfan, enocitabina, lisurida, oximetolona, tamoxifeno, progesterona, mepitiostana, epitiostanol, formestana, interferon-alfa, interferon-2 alfa, interferon-beta, interferon-gama (IFN-γ), fator estimulante de colônia 1, fator estimulante de colônia 2,

denileucina diftitox, interleucina-2, fator de liberação de hormônio luteinizante e variações dos agentes acima mencionados que podem exibir ligação diferencial a seu receptor cognato e meia-vida sérica aumentada ou diminuída.

[171] Uma classe adicional de agentes que podem ser usados como parte de uma terapia combinada no tratamento do câncer são os inibidores do ponto de verificação imune. Inibidores do ponto de verificação imune exemplares incluem agentes que inibem um ou mais dos (i) antígeno 4 citotóxico associado a linfócitos T (CTLA4), (ii) proteína de morte celular programada 1 (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4, e (vii) TIM3. O inibidor de CTLA4 ipilimumab foi aprovado pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos para o tratamento de melanoma.

[172] Ainda outros agentes que podem ser usados como parte de uma terapia de combinação no tratamento do câncer são agentes de anticorpos monoclonais que marcam os alvos que não são pontos de verificação (por exemplo, herceptina) e agentes não citotóxicos (por exemplo, inibidores de tirosina-quinase).

[173] Ainda outras categorias de agentes anti-câncer incluem, por exemplo: (i) um inibidor selecionado dentre um Inibidor ALK, um Inibidor ATR, um Antagonista A2A, um Inibidor de Reparo de Excisão da Base, um Inibidor Tirosina Quinase Bcr-Abl, um Inibidor Tirosina Quinase de Bruton, um Inibidor CDC7, um Inibidor CHK1, um Inibidor Quinase Ciclina-Dependente, um Inibidor DNA-PK, um Inibidor de tanto DNA-PK quanto mTOR, um Inibidor DNMT1, um Inibidor DNMT1 mais 2-cloro-desoxiadenosina, um Inibidor HDAC, um Inibidor de Via de Sinalização Hedgehog, um Inibidor IDO,

um Inibidor JAK, um Inibidor mTOR, um Inibidor MEK, um Inibidor MELK, um Inibidor MTH1, um Inibidor PARP, um Inibidor Fosfoinositida 3-Quinase, um Inibidor de tanto PARP1 quanto DHODH, um Inibidor Proteassoma, um Inibidor Topoisomerase-II, um Inibidor Tirosina Quinase, um Inibidor VEGFR, e um Inibidor WEE1; (ii) um agonista de OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25, ou ICOS; e (iii) uma citosina selecionada dentre IL-12, IL-15, GM-CSF, e G-CSF.

[174] Proteínas da invenção também podem ser usadas como um adjunto para remoção cirúrgica da lesão primária.

[175] A quantidade de proteína de ligação multiespecífica e agente terapêutico adicional e o tempo relativo de administração podem ser selecionados para alcançar um efeito terapêutico combinado desejado. Por exemplo, ao administrar uma terapia de combinação a um paciente em necessidade de tal administração, os agentes terapêuticos na combinação, ou uma composição ou composições farmacêuticas compreendendo os agentes terapêuticos, podem ser administrados em qualquer ordem, como por exemplo, sequencialmente, concorrentemente, juntos, simultaneamente e similares. Além disso, por exemplo, uma proteína de ligação multiespecífica pode ser administrada durante um tempo em que o(s) agente(s) terapêutico(s) adicional(ais) (ais) exerce(m) seu efeito profilático ou terapêutico, ou vice-versa.

V. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[176] A presente divulgação também inclui composições farmacêuticas que contêm uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína descrita aqui. A composição pode ser formulada para uso em uma variedade de sistemas de

distribuição de fármacos. Um ou mais excipientes ou carreadores fisiologicamente aceitáveis também podem estar incluídos na composição para formulação adequada. Formulações apropriadas para uso na presente divulgação são encontradas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, *Philadelphia*, Pa., 17ª ed., 1985. Para uma breve revisão de métodos para distribuição de fármacos, ver, por exemplo, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[177] Composições farmacêuticas podem conter uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de ligação multiespecífica compreendendo um sítio de ligação a CLEC12A.

[178] A formulação de distribuição intravenosa de fármacos da presente divulgação pode estar contida em uma bolsa, uma caneta, ou uma seringa. Em certas modalidades, a bolsa pode estar conectada a um canal compreendendo um tubo e/ou uma agulha. Em certas modalidades, a formulação pode ser uma formulação liofilizada ou uma formulação líquida. Em certas modalidades, a formulação pode ser seca por congelamento (liofilizada) e contida em cerca de 12-60 frascos. Em certas modalidades, a formulação pode ser seca por congelamento e 45 mg da formulação seca por congelamento podem estar contidos em um frasco. Em certas modalidades, os cerca de 40 mg - a cerca de 100 mg de formulação seca por congelamento podem estar contidos em um frasco. Em certas modalidades, a formulação seca por congelamento de 12, 27, ou 45 frascos é combinada para obter uma dose terapêutica da proteína na formulação de fármaco intravenosa. Em certas modalidades, a formulação pode ser uma formulação líquida e armazenada como cerca de

250 mg/frasco a cerca de 1000 mg/frasco. Em certas modalidades, a formulação pode ser uma formulação líquida e armazenada como cerca de 600 mg/frasco. Em certas modalidades, a formulação pode ser uma formulação líquida e armazenada como cerca de 250 mg/frasco.

[179] A proteína pode existir em uma formulação farmacêutica aquosa líquida incluindo uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína em uma solução tamponada formando uma formulação.

[180] Estas composições podem ser esterilizadas por técnicas de esterilização convencionais, ou podem ser filtradas estéreis. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso como são, ou liofilizadas, a preparação liofilizada sendo combinada com um carreador aquoso estéril antes da administração. O pH das preparações será tipicamente entre 3 e 11, mais preferivelmente entre 5 e 9 ou entre 6 e 8, e mais preferivelmente entre 7 e 8, tal como 7 a 7,5. As composições resultantes na forma sólida podem ser embaladas em múltiplas unidades de doses únicas, cada contendo uma quantidade fixa do agente ou agentes mencionados acima. A composição na forma sólida também pode ser embalada em um recipiente para uma quantidade flexível.

[181] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece uma formulação com uma prolongada vida útil na prateleira incluindo a proteína da presente divulgação, em combinação com manitol, ácido cítrico monoidratado, citrato de sódio, fosfato dissódico di-hidratado, di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado, cloreto de sódio, polissorbato 80, água, e hidróxido de sódio.

[182] Em certas modalidades, uma formulação aquosa é

preparada incluindo a proteína da presente divulgação em uma solução tamponada em pH. O tampão desta invenção pode ter uma faixa de pH de cerca de 4 a cerca de 8, por exemplo, de cerca de 4,5 a cerca de 6,0, ou de cerca de 4,8 a cerca de 5,5, ou pode ter um pH de cerca de 5,0 a cerca de 5,2. Faixas intermediárias aos pH's citados acima também são planejadas para fazer parte desta divulgação. Por exemplo, faixas de valores usando uma combinação de qualquer um dos valores citados acima como limites superiores e/ou inferiores são planejadas para estarem incluídas. Exemplos de tampões que irão controlar o pH dentro desta faixa incluem acetato (por exemplo, acetato de sódio), succinato (tal como succinato de sódio), gluconato, histidina, citrato e outros tampões de ácido orgânico.

[183] Em certas modalidades, a formulação inclui um sistema tampão que contém citrato e fosfato para manter o pH em uma faixa de cerca de 4 a cerca de 8. Em certas modalidades a faixa de pH pode ser de cerca de 4,5 a cerca de 6,0, ou de cerca de pH 4,8 a cerca de 5,5, ou em uma faixa de pH cerca de 5,0 a cerca de 5,2. Em certas modalidades, o sistema tampão inclui ácido cítrico monoidratado, citrato de sódio, fosfato dissódico di-hidratado, e/ou di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado. Em certas modalidades, o sistema tampão inclui cerca de 1,3 mg/mL de ácido cítrico (por exemplo, 1,305 mg/mL), cerca de 0,3 mg/mL de citrato de sódio (por exemplo, 0,305 mg/mL), cerca de 1,5 mg/mL de fosfato dissódico di-hidratado (por exemplo, 1,53 mg/mL), cerca de 0,9 mg/mL de di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (por exemplo, 0,86), e cerca de 6,2 mg/mL de cloreto de sódio (por exemplo,

6,165 mg/mL). Em certas modalidades, o sistema tampão inclui 1-1,5 mg/mL de ácido cítrico, 0,25 a 0,5 mg/mL de citrato de sódio, 1,25 a 1,75 mg/mL de fosfato dissódico di-hidratado, 0,7 a 1,1 mg/mL de di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado, e 6,0 a 6,4 mg/mL de cloreto de sódio. Em certas modalidades, o pH da formulação é ajustado com hidróxido de sódio.

[184] Um poliol, que atua como um tonificante e pode estabilizar o anticorpo, também pode estar incluído na formulação. O poliol é adicionado à formulação em uma quantidade que pode variar com relação à isotonicidade desejada da formulação. Em certas modalidades, a formulação aquosa pode ser isotônica. A quantidade de poliol adicionada também pode ser alterada com relação ao peso molecular do poliol. Por exemplo, uma quantidade menor de um monossacarídeo (por exemplo, manitol) pode ser adicionada, comparada a um dissacarídeo (tal como trealose). Em certas modalidades, o poliol que pode ser usado na formulação como um agente de tonicidade é manitol. Em certas modalidades, a concentração de manitol pode ser cerca de 5 a cerca de 20 mg/mL. Em certas modalidades, a concentração de manitol pode ser cerca de 7,5 a 15 mg/mL. Em certas modalidades, a concentração de manitol pode ser cerca de 10-14 mg/mL. Em certas modalidades, a concentração de manitol pode ser cerca de 12 mg/mL. Em certas modalidades, o poliol sorbitol pode estar incluído na formulação.

[185] Um detergente ou tensoativo também pode ser adicionado à formulação. Detergentes exemplares incluem detergentes não iônicos tais como polissorbatos (por

exemplo, polissorbatos 20, 80 etc.) ou poloxâmeros (por exemplo, poloxâmero 188). A quantidade de detergente adicionado é tal que ela reduz a agregação do anticorpo formulado e/ou minimiza a formação de particulados na formulação e/ou reduz adsorção. Em certas modalidades, a formulação pode incluir um tensoativo que é um polissorbato. Em certas modalidades, a formulação pode conter o detergente polissorbato 80 ou Tween 80. Tween 80 é um termo usado para descrever polioxietileno (20) monooleato de sorbitano (ver Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4ª edição, 1996). Em certas modalidades, a formulação pode conter entre cerca de 0,1 mg/mL e cerca de 10 mg/mL de polissorbato 80, ou entre cerca de 0,5 mg/mL e cerca de 5 mg/mL. Em certas modalidades, cerca de 0,1% de polissorbato 80 pode ser adicionado na formulação.

[186] Nas modalidades, o produto de proteína da presente divulgação é formulado como uma formulação líquida. A formulação líquida pode ser apresentada com uma concentração de 10 mg/mL em frasco USP / Ph Eur tipo I 50R fechado com uma rolha de borracha e vedado com um fecho de vedação de alumínio. A rolha pode ser feita de elastômero de acordo com USP e Ph Eur. Em certas modalidades, os frascos podem ser preenchidos com 61,2 mL da solução do produto de proteína a fim de permitir um volume extraível de 60 mL. Em certas modalidades, a formulação líquida pode ser diluída com 0,9% de solução salina.

[187] Em certas modalidades, a formulação líquida da divulgação pode ser preparada como uma solução de concentração de 10 mg/mL em combinação com um açúcar em

níveis estabilizantes. Em certas modalidades, a formulação líquida pode ser preparada em um carreador aquoso. Em certas modalidades, um estabilizador pode ser adicionado em uma quantidade não maior do que a que pode resultar em uma viscosidade indesejável ou inapropriada para administração intravenosa. Em certas modalidades, o açúcar pode ser dissacarídeo, por exemplo, sacarose. Em certas modalidades, a formulação líquida pode incluir também um ou mais de um agente tamponante, um tensoativo, e um conservante.

[188] Em certas modalidades, o pH da formulação líquida pode ser ajustado pela adição de um ácido e/ou base farmaceuticamente aceitáveis. Em certas modalidades, o ácido farmaceuticamente aceitável pode ser ácido clorídrico. Em certas modalidades, a base pode ser hidróxido de sódio.

[189] Além de agregação, desamidação é uma variante de produto comum de peptídeos e proteínas que pode ocorrer durante fermentação, coleta/clarificação de célula, purificação, armazenamento de substância de fármaco/ produto de fármaco e durante análise da amostra. Desamidação é a perda de NH_3 de uma proteína formando um intermediário succinimida que pode sofrer hidrólise. O intermediário succinimida resulta em uma diminuição de massa de 17 daltons ($2,823 \times 10^{-26}$ kg) do peptídeo parental. A hidrólise subsequente resulta em um aumento de massa de 18 daltons ($2,989 \times 10^{-26}$ kg). O isolamento do intermediário succinimida é difícil devido à instabilidade sob condições aquosas. Como tal, desamidação é tipicamente detectável como um aumento de massa de 1 dalton ($1,661 \times 10^{-27}$ kg). Desamidação de uma asparagina resulta tanto em ácido

aspártico como isoaspártico. Os parâmetros afetando a taxa de desamidação incluem pH, temperatura, constante dielétrica de solvente, resistência iônica, sequência primária, conformação polipeptídica local e estrutura terciária. Os resíduos de aminoácido adjacentes a Asn na cadeia de peptídeo afetam as taxas de desamidação. Gly e Ser seguindo um Asn nas sequências de proteína resulta em uma susceptibilidade maior à desamidação.

[190] Em certas modalidades, a formulação líquida da presente divulgação pode ser conservada sob condições de pH e umidade para evitar a desaminação do produto de proteína.

[191] O carreador aquoso de interesse aqui é um que é farmaceuticamente aceitável (seguro e não tóxico para administração a um humano) e é útil para preparação de uma formulação líquida. Carreadores ilustrativos incluem água estéril para injeção (SWFI), água bacteriostática para injeção (BWFI), uma solução tamponada de pH (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose.

[192] Um conservante pode ser adicionado opcionalmente às formulações aqui para reduzir ação bacteriana. A adição de um conservante pode, por exemplo, facilitar a produção de uma formulação de uso múltiplo (múltiplas doses).

[193] Formulações intravenosas (IV) podem ser a via de administração preferida em casos particulares, tal como quando um paciente está no hospital após transplante recebendo todos os fármacos através da via IV. Em certas modalidades, a formulação líquida é diluída com solução de Cloreto de Sódio a 0,9% antes da administração. Em certas

modalidades, o produto de fármaco diluído para injeção é isotônico e apropriado para administração por infusão intravenosa.

[194] Em certas modalidades, um sal ou componentes tampão podem ser adicionados em uma quantidade de 10 mM - 200 mM. Os sais e/ou tampões são farmaceuticamente aceitáveis e são derivados de vários ácidos conhecidos (inorgânicos e orgânicos) com metais ou aminas "formadores de base". Em certas modalidades, o tampão pode ser tampão fosfato. Em certas modalidades, o tampão pode ser tampões glicinato, carbonato, citrato, caso em que íons sódio, potássio ou amônio podem servir como contra-íon.

[195] Um conservante pode ser adicionado opcionalmente às formulações aqui para reduzir ação bacteriana. A adição de um conservante pode, por exemplo, facilitar a produção de uma formulação de múltiplos usos (múltiplas doses).

[196] O carreador aquoso de interesse aqui é um que é farmaceuticamente aceitável (seguro e não tóxico para administração a um humano) e é útil para a preparação de uma formulação líquida. Carreadores ilustrativos incluem água estéril para injeção (SWFI), água bacteriostática para injeção (BWFI), uma solução tamponada de pH (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose.

[197] A proteína da presente divulgação pode existir em uma formulação liofilizada incluindo as proteínas e um lioprotetor. O lioprotetor pode ser açúcar, por exemplo, dissacarídeos. Em certas modalidades, o lioprotetor pode ser sacarose ou maltose. A formulação liofilizada também

pode incluir um ou mais de um agente de tamponamento, um tensoativo, um agente de volume e/ou um conservante.

[198] A quantidade de sacarose ou maltose útil para estabilização do produto de fármaco liofilizado pode estar em uma razão em peso de pelo menos 1:2 proteína para sacarose ou maltose. Em certas modalidades, a razão em peso de proteína para sacarose ou maltose pode ser de 1:2 a 1:5.

[199] Em certas modalidades, o pH da formulação, antes da liofilização, pode ser ajustado pela adição de um ácido e/ou base farmaceuticamente aceitáveis. Em certas modalidades, o ácido farmaceuticamente aceitável pode ser ácido clorídrico. Em certas modalidades, a base farmaceuticamente aceitável pode ser hidróxido de sódio.

[200] Antes da liofilização, o pH da solução contendo a proteína da presente divulgação pode ser ajustado entre 6 a 8. Em certas modalidades, a faixa de pH para o produto de fármaco liofilizado pode ser de 7 a 8.

[201] Em certas modalidades, um sal ou componentes tampão podem ser adicionados em uma quantidade de 10 mM - 200 mM. Os sais e/ou tampões são farmaceuticamente aceitáveis e são derivados de vários ácidos conhecidos (inorgânicos e orgânicos) com metais ou aminas “formadores de base”. Em certas modalidades, o tampão pode ser tampão fosfato. Em certas modalidades, o tampão pode ser tampões glicinato, carbonato, citrato, caso em que íons sódio, potássio ou amônio podem servir como contra-íon.

[202] Em certas modalidades, um “agente de volume” pode ser adicionado. Uma “agente de volume” é um composto que adiciona massa a uma mistura liofilizada e contribui para a estrutura física da torta liofilizada (por exemplo,

facilita a produção de uma torta liofilizada essencialmente uniforme que mantém uma estrutura de poro aberta). Agentes de volume ilustrativos incluem manitol, glicina, polietileno glicol e sorbitol. As formulações liofilizadas da presente invenção podem conter tais agentes de volume.

[203] Um conservante pode ser adicionado opcionalmente às formulações aqui para reduzir ação bacteriana. A adição de um conservante pode, por exemplo, facilitar a produção de uma formulação de múltiplos usos (múltiplas doses).

[204] Em certas modalidades, o produto de fármaco liofilizado pode ser constituído com um carreador aquoso. O carreador aquoso de interesse aqui é um que é farmaceuticamente aceitável (por exemplo, seguro e não tóxico para administração a um humano) e é útil para a preparação de uma formulação líquida, após liofilização. Diluentes ilustrativos incluem água estéril para injeção (SWFI), água bacteriostática para injeção (BWFI), uma solução tamponada de pH (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose.

[205] Em certas modalidades, o produto de fármaco liofilizado da presente divulgação é reconstituído ou com Água Estéril para Injeção, USP (SWFI) ou Injeção De Cloreto de Sódio a 0,9%, USP. Durante a reconstituição, o pó liofilizado se dissolve em uma solução.

[206] Em certas modalidades, o produto de proteína liofilizado da presente divulgação é constituído de cerca de 4,5 mL de água para injeção e diluído com solução salina a 0,9% (solução de cloreto de sódio).

[207] Níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas desta invenção podem ser variados a fim de obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um particular paciente, composição, e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente.

[208] A dose específica pode ser uma dose uniforme para cada paciente, por exemplo, 50-5000 mg de proteína. Alternativamente, uma dose do paciente pode ser adaptada para o peso corporal ou área de superfície aproximada do paciente. Outros fatores na determinação da dosagem apropriada podem incluir a doença ou condição a ser tratada ou evitada, a severidade da doença, a via de administração, e a idade, sexo e condição médica do paciente. Um refinamento adicional dos cálculos necessários para determinar a dosagem apropriada para tratamento é feito rotineiramente pelos técnicos no assunto, especialmente à luz da informação de dosagem e testes descritos aqui. A dosagem também pode ser determinada através do uso de testes conhecidos para determinar as dosagens usadas em conjunto com dados apropriados de resposta a dose. Uma dosagem de um paciente individual pode ser ajustada à medida que o progresso da doença é monitorado. Os níveis no sangue da construção ou complexo marcáveis em um paciente podem ser medidos para verificar se a dosagem precisa ser ajustada para alcançar ou manter uma concentração eficaz. Farmacogenômica pode ser usada para determinar que construções e/ou complexos marcáveis, e dosagens dos mesmos, são os mais prováveis de serem eficazes para um dado indivíduo (Schmitz *et al.*, Clinica Chimica Acta 308:

43-53, 2001; Steimer *et al.*, Clinica Chimica Acta 308: 33-41, 2001).

[209] Em geral, dosagens com base no peso corporal são de cerca de 0,01 µg a cerca de 100 mg por kg de peso corporal, tal como cerca de 0,01 µg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 100 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 50 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 10 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 1 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,01 µg a cerca de 0,1 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 100 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 10 µg/kg de peso corporal, cerca de 0,1 µg a cerca de 1 µg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 100 µg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 50 µg/kg de peso corporal, cerca de 1 µg a cerca de 10 µg/kg de peso corporal, cerca de 10 µg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 10 µg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 10 µg a cerca de 10 mg/kg de peso

corporal, cerca de 10 µg a cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 10 µg a cerca de 100 µg/kg de peso corporal, cerca de 10 µg a cerca de 50 µg/kg de peso corporal, cerca de 50 µg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 50µg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 50 µg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 50 µg a cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 50 µg a cerca de 100 µg/kg de peso corporal, cerca de 100 µg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 100 µg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 100 µg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 100 µg a cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 mg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 mg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 mg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 10 mg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, cerca de 10 mg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, cerca de 50 mg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

[210] Doses podem ser dadas uma ou mais vezes diariamente, semanalmente, mensalmente ou anualmente, ou mesmo uma vez a cada 2 a 20 anos. Os técnicos no assunto podem estimar facilmente taxas de repetição para dosagem com base nos tempos de residência e concentrações medidas da construção ou complexo marcável nos fluidos corporais ou tecidos. A administração da presente invenção pode ser intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intrapleural, intratecal, intracavitária, por perfusão através de um cateter ou por injeção intralesional direta. Esta pode ser administrada

uma ou mais vezes diariamente, uma ou mais vezes semanalmente, uma ou mais vezes mensalmente, e uma ou mais vezes anualmente.

[211] A descrição acima descreve múltiplos aspectos e modalidades da invenção. O pedido de patente contempla especificamente todas as combinações e permutas dos aspectos e modalidades.

EXEMPLOS

[212] A invenção, sendo agora geralmente descrita, será mais prontamente entendida por referência aos seguintes exemplos, que são incluídos apenas para fins de ilustração de alguns aspectos e modalidades da presente invenção, e que não se destinam a limitar a invenção.

Exemplo 1 – Domínios de ligação a NKG2D se ligam a NKG2D

Domínios de ligação a NKG2D se ligam a NKG2D recombinante purificado

[213] As sequências de ácido nucleico de ectodomínios NKG2D humanos, de camundongos ou de cinomolgos foram fusionadas com sequências de ácido nucleico codificando domínios Fc de IgG1 humana e introduzidas em células de mamíferos a serem expressadas. Após purificação, proteínas de fusão NKG2D-Fc foram adsorvidas em cavidades de microplacas. Após bloqueio das cavidades com albumina de soro bovino para evitar ligação não específica, domínios de ligação a NKG2D foram titulados e adicionados às cavidades pré-adsorvidas com proteínas de fusão NKG2D-Fc. Ligação de anticorpo primário foi detectada usando um anticorpo secundário que foi conjugado com peroxidase de raiz forte e reconhece especificamente uma cadeia leve Kappa humana para

evitar reatividade cruzada de Fc. 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), um substrato para peroxidase de raiz forte, foi adicionado às cavidades para visualizar o sinal de ligação, cuja absorbância foi medida a 450 nM e corrigida a 540 nM. Um clone do domínio de ligação a NKG2D, um controle de isotipo ou um controle positivo (compreendendo domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada selecionados dentre SEQ ID NOs:101-104, ou clones NKG2D anti-camundongo MI-6 e CX-5 disponíveis em eBioscience) foram adicionados a cada cavidade.

[214] O controle de isotipo mostrou ligação mínima às proteínas NKG2D-Fc recombinantes, enquanto o controle positivo se ligou de modo mais forte aos antígenos recombinantes. Domínios de ligação a NKG2D produzidos por todos os clones demonstraram ligação através de proteínas NKG2D-Fc recombinantes humanas, de camundongo e de cinomolgo, embora com afinidades variadas de clone para clone. Geralmente, cada clone anti-NKG2D ligado a NKG2D-Fc recombinante humano (Figura 3) e cinomolgo (Figura 4) com afinidade similar, mas com afinidade menor para NKG2D-Fc recombinante de camundongo (Figura 5).

Domínios de ligação a NKG2D se ligam às células expressando NKG2D

[215] Linhagens de células de linfoma de camundongo EL4 foram modificadas para expressar receptores de antígeno quimérico de domínio de sinalização zeta NKG2D-CD3 humano ou de camundongo. Um clone de ligação a NKG2D, um controle de isotipo ou um controle positivo foram usados a uma concentração de 100 nM para colorir NKG2D extracelular expresso nas células EL4. A ligação a anticorpo foi

detectada usando anticorpos secundários de IgG anti-humana conjugados a fluorófloro. Células foram analisadas por citometria de fluxo, e a variação sobre fundo (FOB) foi calculada usando a intensidade de fluorescência média (MFI) de células expressando NKG2D em comparação com células EL4 parentais.

[216] Domínios de ligação a NKG2D produzidos por todos os clones se ligaram às células EL4 expressando NKG2D humano e de camundongo. Anticorpos de controle positivo (compreendendo domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve selecionados dentre SEQ ID NOs:101-104, ou clones NKG2D anti-camundongo MI-6 e CX-5 disponíveis em eBioscience) deram o melhor sinal de ligação a FOB. A afinidade de ligação a NKG2D para cada clone foi similar entre células expressando NKG2D humano (Figura 6) e NKG2D de camundongo (Figura 7).

Exemplo 2 – Domínios de ligação a NKG2D bloqueiam a ligação do ligando natural a NKG2D

Competição com ULBP-6

[217] Proteínas NKG2D-Fc humanas recombinantes foram adsorvidas em cavidades de uma microplaca, e as cavidades foram bloqueadas com albumina de soro bovino para reduzir a ligação não específica. Uma concentração saturante de ULBP-6-His-biotina foi adicionada às cavidades, seguido pela adição dos clones de domínio de ligação a NKG2D. Após uma incubação de 2 horas, as cavidades foram lavadas e ULBP-6-His-biotina que permaneceu ligada às cavidades revestidas com NKG2D-Fc foi detectada por estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz forte e substrato TMB. Absorbância foi medida a 450 nM e corrigida a 540 nM. Após subtrair o

fundo, ligação específica de domínios de ligação a NKG2D às proteínas NKG2D-Fc foi calculada a partir da porcentagem de ULBP-6-His-biotina que foi bloqueada de se ligar às proteínas NKG2D-Fc nas cavidades. O anticorpo de controle positivo (compreendendo domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve selecionados dentre SEQ ID NOs:101-104) e vários domínios de ligação a NKG2D bloquearam a ligação de ULBP-6 a NKG2D, enquanto controle de isotipo mostrou pequena competição com ULBP-6 (Figura 8).

[218] Sequência ULBP-6 é representada por SEQ ID NO:108

MAAAAIPALLLCLPLLFLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQ VDEKTFLHYDCGNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYT PKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWE NDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTLILC CLLIILPCFILPGI (SEQ ID NO:108)

Competição com MICA

[219] Proteínas MICA-Fc humanas recombinantes foram adsorvidas em cavidades de uma microplaca, e as cavidades foram bloqueadas com albumina de soro bovino para reduzir ligação não específica. NKG2D-Fc-biotina foi adicionada às cavidades seguido por domínios de ligação a NKG2D. Após incubação e lavagem, NKG2D-Fc-biotina que permaneceu ligada às cavidades revestidas com MICA-Fc foi detectada usando substrato TMB e estreptavidina-HRP. Absorbância foi medida a 450 nM e corrigida a 540 nM. Após subtração do fundo, ligação específica de domínios de ligação a NKG2D com as proteínas NKG2D-Fc foi calculada a partir da porcentagem de NKG2D-Fc-biotina que foi bloqueada de se ligar às cavidades revestidas com MICA-Fc. O anticorpo de controle positivo

(compreendendo domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve selecionados dentre SEQ ID NOs:101-104) e vários domínios de ligação a NKG2D bloquearam a ligação de MICA a NKG2D, enquanto o controle de isotipo mostrou pequena competição com MICA (Figura 9).

Competição com Rae-1 delta

[220] Rae-1delta-Fc de camundongo recombinante (adquirido de R&D Systems) foi adsorvido em cavidades de uma microplaca, e as cavidades foram bloqueadas com albumina de soro bovino para reduzir ligação não específica. NKG2D-Fc-biotina de camundongo foi adicionado às cavidades seguido por domínios de ligação a NKG2D. Após incubação e lavagem, NKG2D-Fc-biotina que permaneceu ligada às cavidades revestidas com Rae-1delta-Fc foi detectada usando substrato TMB e estreptavidina-HRP. Absorbância foi medida a 450 nM e corrigida a 540 nM. Após subtrair o fundo, ligação específica de domínios de ligação a NKG2D com as proteínas NKG2D-Fc foi calculada a partir da porcentagem de NKG2D-Fc-biotina que foi bloqueada de se ligar às cavidades revestidas com Rae-1delta-Fc. O controle positivo (compreendendo domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve selecionados dentre SEQ ID NOs:101-104, ou clones NKG2D anti-camundongo MI-6 e CX-5 disponíveis em eBioscience) e vários clones de domínio de ligação a NKG2D bloquearam a ligação Rae-1delta a NKG2D de camundongo, enquanto o anticorpo de controle de isotipo mostrou pequena competição com Rae-1delta (Figura 10).

Exemplo 3 – Clones de domínio de ligação a NKG2D ativam NKG2D

[221] Sequências de ácido nucleico de NKG2D humano e

de camundongo foram fusionadas em sequências de ácido nucleico codificando um domínio de sinalização CD3 zeta para obter construções de receptor de antígeno quimérico (CAR). As construções NKG2D-CAR foram então clonadas em um vetor de retrovírus usando conjunto de Gibson e transfectadas em células expi293 para produção de retrovírus. Células EL4 foram infectadas com vírus contendo NKG2D-CAR junto com 8 µg/mL de polibreno. 24 horas após infecção, os níveis de expressão de NKG2D-CAR nas células EL4 foram analisados por citometria de fluxo, e clones que expressam níveis altos do NKG2D-CAR na superfície da célula foram selecionados.

[222] Para determinar se domínios de ligação a NKG2D ativam NKG2D, eles foram adsorvidos em cavidades de uma microplaca, e células NKG2D-CAR EL4 foram cultivadas nas cavidades revestidas com fragmento de anticorpo por 4 horas na presença de brefeldina-A e monensina. Produção de TNF-α intracelular, um indicador para ativação de NKG2D, foi testada por citometria de fluxo. A porcentagem de células positivas para TNF-α foi normalizada para as células tratadas com o controle positivo. Todos os domínios de ligação a NKG2D ativaram tanto NKG2D humano (Figura 11) como NKG2D de camundongo (Figura 12).

Exemplo 4 – Domínios de ligação a NKG2D ativam células NK

Células NK humanas primárias

[223] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de capas leucocitárias de sangue periférico humano usando centrifugação por gradiente de densidade. Células NK ($CD3^-$ $CD56^+$) foram isoladas usando

seleção negativa com contas magnéticas de PBMCs, e a pureza das células NK isoladas foi tipicamente >95%. Células NK isoladas foram então cultivadas em meio contendo 100 ng/mL IL-2 por 24-48 horas antes de serem transferidas para as cavidades de uma microplaca na qual os domínios de ligação a NKG2D foram adsorvidos, e cultivados no meio contendo anticorpo anti-CD107a conjugado com fluorófloro, brefeldina-A, e monensina. Após cultura, células NK foram testadas por citometria de fluxo usando anticorpos conjugados com fluoróforo contra CD3, CD56 e IFN-γ. Colorações de CD107a e IFN-γ foram analisadas em células $CD3^-$ $CD56^+$ para avaliar ativação de células NK. O aumento em células duplo-positivas CD107a/IFN-γ é indicativo de melhor ativação de células NK através do envolvimento de dois receptores de ativação em vez de um receptor. Domínios de ligação a NKG2D e o controle positivo (por exemplo, domínio variável de cadeia pesada representado por SEQ ID NO:101 ou SEQ ID NO:103, e domínio variável de cadeia leve representado pela SEQ ID NO:102 ou SEQ ID NO:104) mostraram uma porcentagem maior de células NK se tornando $CD107a^+$ e $IFN\text{-}\gamma^+$ do que o controle de isotipo (Figura 13 e Figura 14 representam dados de dois experimentos independentes, cada usando PBMC de um doador diferente para preparação de células NK).

Células NK primárias de camundongo

[224] Baços foram obtidos de camundongos C57Bl/6 e esmagados através de um filtro celular de 70 µm para obter suspensão de célula única. Células foram peletizadas e recolocadas em suspensão em tampão de lise ACK (adquirido de Thermo Fisher Scientific #A1049201; cloreto de amônio

155 mM, bicarbonato de potássio 10 mM, EDTA 0,01 mM) para remover células vermelhas do sangue. As células restantes foram cultivadas com 100 ng/mL de hIL-2 por 72 horas antes de serem coletadas e preparadas para isolamento de células NK. Células NK ($CD3^-NK1.1^+$) foram então isoladas de células de baço usando uma técnica de depleção negativa com contas magnéticas com tipicamente >90% de pureza. Células NK purificadas foram cultivadas em meio contendo 100 ng/mL de mIL-15 por 48 horas antes de serem transferidas para as cavidades de uma microplaca na qual os domínios de ligação a NKG2D foram adsorvidos, e cultivados no meio contendo anticorpo anti-CD107a conjugado a flurófloro, brefeldina-A, e monensina. Após cultura em cavidades revestidas com domínio de ligação a NKG2D, células NK foram testadas por citometria de fluxo usando anticorpos conjugados com fluoróforo contra CD3, NK1.1 e IFN-γ. Coloração de CD107a e IFN-γ foi analisada em células $CD3^-$ $NK1.1^+$ para avaliar ativação de células NK. O aumento em células duplo-positivas CD107a/IFN-γ é indicativo de ativação melhor de células NK através do envolvimento de dois receptores e ativação em vez de um receptor. Domínios de ligação a NKG2D e o controle positivo (selecionados de clones NKG2D anti-camundongo MI-6 e CX-5 disponíveis em eBioscience) mostraram uma porcentagem maior de células NK se tornando $CD107a^+$ e IFN-γ^+ do que o controle de isotipo (Figura 15 e Figura 16 representam dados de dois experimentos diferentes, cada usando um camundongo diferente para preparação de células NK).

EXEMPLO 5 – Domínios de ligação a NKG2D permitem citotoxicidade de células de tumor alvo

[225] Testes de ativação de células NK primárias humanas e de camundongos demonstraram marcadores de citotoxidade aumentados em células NK após incubação com domínios de ligação a NKG2D. Para verificar se isto se traduz em lise aumentada de células de tumor, um teste com base em células foi utilizado em que cada domínio de ligação a NKG2D foi desenvolvido em um anticorpo monoespecífico. A região Fc foi usada como um braço de marcação, enquanto as regiões de fragmento Fab (domínio de ligação a NKG2D) atuaram como outro braço de marcação para ativar células NK. Células THP-1, que são de origem humana e expressam níveis altos de receptores Fc, foram usadas como um alvo de tumor e um Kit de Citotoxidade Perkin Elmer DELFIA foi usado. Células THP-1 foram marcadas com reagente BATDA, e recolocadas em suspensão em 10^5/mL no meio de cultura. Células THP-1 marcadas foram então combinadas com anticorpos NKG2D e células NK de camundongo isoladas em cavidades de uma placa de microtitulação a 37°C por 3 horas. Após incubação, 20 µL do sobrenadante da cultura foram removidos, misturados com 200 µL de solução de Európio e incubados com agitação por 15 minutos no escuro. Fluorescência foi medida ao longo do tempo por um leitor de placa PheraStar equipado com um modulo de fluorescência resolvido no tempo (Excitação 337 nM, Emissão 620 nM) e lise específica foi calculada de acordo com as instruções do kit.

[226] O controle positivo, ULBP-6 - um ligando natural para NKG2D - conjugado a Fc, mostrou lise específica aumentada de células alvo THP-1 por células NK de camundongo. Anticorpos NKG2D também aumentaram lise

específica de células alvo THP-1, enquanto anticorpo de controle de isotipo mostrou lise específica reduzida. A linha pontilhada indica lise específica de células THP-1 por células NK de camundongo sem anticorpo adicionado (Figura 17).

Exemplo 6 – Anticorpos NKG2D mostram alta termoestabilidade

[227] Temperaturas de fusão de domínios de ligação a NKG2D foram testadas usando fluorimetria de varredura diferencial. As temperaturas de fusão aparentes extrapoladas são altas em relação a anticorpos IgG1 típicos (Figura 18).

Exemplo 7 – Ativação sinérgica de células NK humanas por reticulação de NKG2D e CD16

Teste de ativação de células NK humanas primárias

[228] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas de capas leucocitárias de sangue humano periférico usando centrifugação por gradiente de densidade. Células NK foram purificadas de PBMCs usando contas magnéticas negativas (StemCell # 17955). Células NK eram >90% $CD3^-$ $CD56^+$ como determinado por citometria de fluxo. As células foram então expandidas 48 horas em meio contendo 100 ng/mL hIL-2 (Peprotech #200-02) antes do uso em testes de ativação. Anticorpos foram revestidos sobre uma placa de fundo plano com 96 cavidades a uma concentração de 2 µg/mL (anti-CD16, Biolegend # 302013) e 5 µg/mL (anti-NKG2D, R&D #MAB139) em 100 µL de PBS estéril durante a noite a 4°C seguido por lavagem completa das cavidades para remover anticorpo em excesso. Para a avaliação de degranulação, células NK ativadas por IL-2

foram recolocadas em suspensão em $5x10^5$ células/mL em meio de cultura suplementado com 100 ng/mL de IL-2 humano (hIL2) e 1 µg/mL de mAb anti-CD107a conjugado a APC (Biolegend # 328619). $1x10^5$ células/cavidade foram então adicionadas sobre placas revestidas com anticorpo. Os inibidores de transporte de proteína Brefeldina A (BFA, Biolegend # 420601) e Monensina (Biolegend # 420701) foram adicionados a uma diluição final de 1:1000 e 1:270, respectivamente. Células nas placas foram incubadas por 4 horas a 37°C em CO_2 a 5%. Para coloração intracelular de IFN-γ, células NK foram marcadas com anti-CD3 (Biolegend #300452) e mAb anti-CD56 (Biolegend # 318328) e subsequentemente fixadas, permeabilizadas e marcadas com mAb anti-IFN-γ (Biolegend # 506507). Células NK foram analisadas para expressão de CD107a e IFN-γ por citometria de fluxo após *gating* em células $CD56^+CD3^-$ vivas.

[229] Para investigar a potência relativa de combinação de receptor, reticulação de NKG2D ou CD16 e co-reticulação de ambos os receptores por estimulação ligada à placa foi realizada. Como mostrado na Figura 19 (Figuras 19A-19C), estimulação combinada de CD16 e NKG2D resultou em níveis altamente elevados de CD107a (degranulação) (Figura 19A) e/ou produção de IFN-γ (Figura 19B). Linhas pontilhadas representam um efeito aditivo de estimulações individuais de cada receptor.

[230] Níveis de CD107a e produção de IFN-γ intracelular de células NK ativadas por IL-2 foram analisados após 4 horas de estimulação ligada à placa com anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-NKG2D ou uma combinação de ambos. Gráficos indicam a média (n = 2) ± DP.

Figura 19A demonstra níveis de CD107a; Figura 19B demonstra níveis de IFN-γ; Figura 19C demonstra níveis de CD107a e IFN-γ. Dados mostrados nas Figuras 19A-19C são representativos de cinco experimentos independentes usando cinco doadores saudáveis diferentes.

Exemplo 8 – Citotoxicidade intensificada mediada por proteína de ligação triespecífica (TriNKET) de células alvo

Avaliação de ligação de TriNKET a NKG2D humano expresso em célula:

[231] Células EL4 transduzidas com NKG2D humano foram usadas para testar ligação de A49-TriNKET-CLEC12A (um domínio de ligação a NKG2D do clone ADI-27749 e um domínio de ligação a CLEC12A de um anticorpo monoclonal 4331 descrito em US2014/0120096 (ver em p. 21)) a células expressando NKG2D humano. TriNKETs foram diluídas na concentração de topo e então diluídas em série. As diluições de mAb ou TriNKET foram usadas para colorir as células, e ligação das TriNKET ou mAb foi detectada usando um anticorpo secundário de IgG anti-humana conjugado a fluoróforo. Células foram analisadas por citometria de fluxo, ligação a MFI foi normalizada para controles de anticorpo secundário para obter variações sobre valores de fundo.

[232] Figura 35 e Figura 36 mostram ligação de TriNKETs marcados para CLEC12A para linhagem de células AML humanas expressando CLEC12A. O anticorpo monoclonal anti-CLEC12A e TriNKET mostraram ligação similar a ambas as células SKM-1 (Figura 35) e U937 (Figura 36).

Avaliação de ligação de TriNKET ou mAb a antígenos de câncer humano expressos em células:

[233] Linhagens celulares humanas de câncer expressando CLEC12A foram usadas para avaliar ligação de antígeno de tumor de TriNKETs marcando CLEC12A. As linhagens de células AML humanas U937 e SKM-1 foram usadas para avaliar ligação de TriNKETs a CLEC12A expresso em células. TriNKETs ou mAbs foram diluídas, e foram incubadas com as células respectivas. Ligação da TriNKET foi detectada usando um anticorpo secundário de IgG anti-humana conjugado a fluoróforo. As células foram analisadas por citometria de fluxo, ligação de MFI a CLEC12A expresso em células foi normalizada para controles de anticorpo secundário para obter variações sobre valores de fundo.

[234] Figura 37 mostra ligação de CLEC12A-TriNKETs a NKG2D humano expresso sobre a superfície de células EL4. Ligação a NKG2D expresso na superfície da célula foi fraca, mas detectável comparado com o anticorpo monoclonal anti-CLEC12A.

Avaliação de internalização de TriNKET ou mAb:

[235] Linhagens de células AML humanas, HL60, SKM-1 e U937, foram usadas para avaliar internalização de TrINKETs ligadas a CLEC12A expresso na superfície da célula. TriNKETs ou mAbs foram diluídos a 20 µg/mL, e diluições foram usadas para colorir as células. Após a coloração de superfície de CLEC12A, amostras foram divididas, dois terços da amostra foram colocados a 37°C durante a noite para facilitar a internalização, com o outro terço do anticorpo ligado à amostra foi detectado usando um anticorpo secundário de IgG anti-humana conjugado a fluoróforo. As células foram fixadas após coloração com o anticorpo secundário, e foram armazenadas a 4°C durante a

noite para análise no dia seguinte. Após 2 e 20 horas a 37°C, as amostras foram removidas do incubador, e o anticorpo ligado sobre a superfície das células foi detectado usando um anticorpo secundário de IgG anti-humana conjugado a fluoróforo. As amostras foram fixadas e todas as amostras foram analisadas no mesmo dia. Internalização de anticorpos ou TriNKETs foi calculada como a seguir: % internalização = (1-(amostra MFI 24h/linha de base MFI)) * 100%.

[236] Figuras 38, 39, e 40 mostram internalização de TriNKETs marcando CLEC12A após incubação com células HL60 (Figura 38), SKM-1 (Figura 39), e U937 (Figura 40), respectivamente. O anticorpo anti-CD33 Lintuzumab foi usado como um controle positivo para internalização, porque CD33 é expresso por linhagens celulares HL60 (Figura 38), SKM-1 (Figura 39), e U937 (Figura 40). Lintuzumab mostrou níveis elevados de internalização em todas as linhagens de células, que aumentaram com o passar do tempo. Em todas as três linhagens de células testadas, mAb e TrINKET anti-CLEC12A mostraram níveis similares de internalização após incubação de 2 horas e 20 horas.

Ensaio de citotoxicidade de célula NK humana primária:

[237] PBMCs foram isolados de capas leucocitárias de sangue periférico humano usando centrifugação por gradiente de densidade. PBMCs isolados foram lavados e preparados para isolamento de células NK. As células NK foram isoladas usando uma técnica de seleção negativa com contras magnéticas, a pureza das células NK isoladas foi tipicamente de >90% $CD3^{-}CD56^{+}$. As células NK isoladas ficaram em repouso durante a noite. As células NK em

repouso foram usadas no seguinte dia em ensaios de citotoxicidade.

[238] Figuras 41 e 42 mostram a morte de células NK humanas primárias de linhagens de células AML humanas positivas para CLEC12A. As células NK humanas em repouso mostraram pouca atividade contra células HL60 (Figura 41) e Mv4-11 (Figura 42) em uma razão de efetor-para-alvo de 5:1. Em um modo de resposta a dose, TriNKET marcada para CLEC12A mostrou morte eficaz de ambas as células HL60 (Figura 41) e Mv4-11 (Figura 42). O anticorpo monoclonal contra CLEC12A mostrou somente uma atividade fraca contra HL60 (Figura 41) e Mv4-11 (Figura 42), enquanto um TrINKET não de marcação não mostrou atividade. CLEC12A-TriNNKETs mostraram melhor potência contra células HL60 (Figura 41), que expressam maiores níveis de CLEC12A comparado com células Mv4-11 (Figura 42).

Ensaio de citotoxicidade de DELFIA

[239] Linhagens celulares humanas de câncer expressando um alvo de interesse foram coletadas da cultura, lavadas com HBS, e recolocadas em suspensão em meio de crescimento a 10^6 células/mL para marcação com reagente BATDA (Perkin Elmer, AD0116). As instruções do fabricante foram seguidas para a marcação das células alvo. Após marcação, células foram lavadas 3 vezes com HBS e recolocadas em suspensão a $0,5x10^5$ células/mL em meio de cultura. Para preparar as cavidades de fundo, uma alíquota das células marcadas foi colocada de lado, e as células foram centrifugadas para fora do meio. 100 µL do meio foram cuidadosamente adicionados às cavidades em triplicata para evitar perturbar as células peletizadas. 100 µL de células

marcadas com BATDA foram adicionados a cada cavidade da placa de 96 cavidades. As cavidades foram guardadas para liberação espontânea das células alvo e preparadas para a lise de células alvo por adição de 1% Triton-X. Os anticorpos monoclonais ou TriNKETs contra o alvo de tumor de interesse foram diluídos em meio de cultura, e 50 µL de mAb ou TriNKET diluídos foram adicionados a cada cavidade. As células NK em repouso foram coletadas da cultura, lavadas, e recolocadas em suspensão a $1,0x10^5$-$2,0x10^6$ célula/mL em meio de cultura, dependendo da razão desejada de efetor para célula alvo. 50 µL de células NK foram adicionados a cada cavidade da placa para dar um volume de cultura total de 200 µL. A placa foi incubada a 37°C com CO_2 a 5% durante 2-3 horas antes de desenvolver o ensaio.

[240] Após cultivar por 2-3 horas, a placa foi removida da incubadora e as células foram peletizadas por centrifugação a 200xg durante 5 minutos. 20 µL de sobrenadante de cultura foram transferidos para uma microplaca limpa fornecida pelo fabricante, e 200 µL de solução de Európio em temperatura ambiente (Perkin Elmer C135-100) foram adicionados a cada cavidade. A placa foi protegida da luz e incubada em um agitador de placa a 250 rpm durante 15 minutos. A placa foi lida usando um instrumento Victor 3 ou SpectraMax® i3X (Molecular Devices), e a lise específica percentual foi calculada (% lise específica = (liberação experimental – liberação espontânea) / (liberação máxima – liberação espontânea)) x 100).

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[241] A divulgação completa de cada um dos documentos

de patente e artigos científicos referidos aqui é incorporada por referência para todos os fins.

EQUIVALENTES

[242] A invenção pode ser corporificada em outras formas específicas sem sair do espírito ou características essenciais da mesma. As modalidades acima devem ser, assim, consideradas em todos os aspectos ilustrativas em vez de limitativos da invenção descrita aqui. O escopo da invenção é, assim, indicado pelas reivindicações em anexo em vez de pela descrição precedente, e todas as mudanças que estão dentro do significado e faixa de equivalência das reivindicações são planejadas para serem aqui englobadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro sítio de ligação ao antígeno que se liga a NKG2D;

(b) um segundo sítio de ligação ao antígeno que se liga a CLL-1/CLEC12A; e

(b) um domínio Fc de anticorpo ou uma porção do mesmo suficiente para se ligar a CD16, ou um terceiro sítio de ligação ao antígeno que se liga a CD16.

2. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno se liga a NKG2D em humanos, primatas não humanos e roedores.

3. Proteína, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve.

4. Proteína, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve estão presentes no mesmo polipeptídeo.

5. Proteína, de acordo com as reivindicações 3 ou 4, **caracterizada** pelo fato de que o segundo sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve.

6. Proteína, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno estão presentes no mesmo polipeptídeo.

7. Proteína, de acordo com a reivindicação 5 ou 6,

caracterizada pelo fato de que o domínio variável de cadeia leve do primeiro sítio de ligação ao antígeno tem uma sequência de aminoácido idêntica à sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno.

8. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a uma sequência de aminoácido selecionada dentre: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85, e SEQ ID NO:93.

9. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:41 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:42.

10. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:49 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:50.

11. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:57 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a

SEQ ID NO:58.

12. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:59 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:60.

13. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:61 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:62.

14. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:69 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:70.

15. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:77 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:78.

16. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:85 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a

SEQ ID NO:86.

17. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:93 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:94.

18. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:101 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:102.

19. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:103 e um domínio variável de cadeia leve pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO:104.

20. Proteína, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro sítio de ligação ao antígeno é um anticorpo de domínio único.

21. Proteína, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo de domínio único é um fragmento V_HH ou um fragmento V_{NAR}.

22. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 ou 20-21, **caracterizada** pelo fato de que o segundo sítio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve.

23. Proteína, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno estão presentes no mesmo polipeptídeo.

24. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 ou 8-19, **caracterizada** pelo fato de que o segundo sítio de ligação ao antígeno é um anticorpo de domínio único.

25. Proteína, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizada** pelo fato de que o segundo sítio de ligação ao antígeno é um fragmento V_HH ou um fragmento V_{NAR}.

26. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-25, **caracterizada** pelo fato de que o segundo sítio de ligação ao antígeno se liga a CLEC12A, o domínio variável de cadeia pesada do segundo sítio de ligação ao antígeno compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:115 e o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:119.

27. Proteína, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada** pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada do segundo sítio de ligação ao antígeno compreende uma sequência de aminoácido incluindo:

uma sequência CDR1 de cadeia pesada idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:116;

uma sequência CDR2 de cadeia pesada idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:117; e

uma sequência CDR3 de cadeia pesada idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:118.

28. Proteína, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada** pelo fato de que o domínio variável de cadeia leve do segundo sítio de ligação ao antígeno compreende uma sequência de aminoácido incluindo:

uma sequência CDR1 de cadeia leve idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:120;

uma sequência CDR2 de cadeia leve idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:121;

e uma sequência CDR3 de cadeia leve idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:122.

29. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, **caracterizada** pelo fato de que a proteína compreende uma porção de um domínio Fc de anticorpo suficiente para se ligar a CD16, em que o domínio Fc de anticorpo compreende domínios de dobradiça e CH2.

30. Proteína, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizada** pelo fato de que o domínio Fc de anticorpo compreende domínios de dobradiça e CH2 de um anticorpo de IgG1 humana.

31. Proteína, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, **caracterizada** pelo fato de que o domínio Fc compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica a aminoácidos 234-332 de um anticorpo de IgG1 humana.

32. Proteína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29-31, **caracterizada** pelo fato de que o domínio Fc compreende sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica ao domínio Fc de IgG1 humana e difere em uma ou mais posições selecionadas dentre o grupo consistindo em Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407,

K409, T411, K439.

33. Formulação, **caracterizada** pelo fato de que compreende a proteína, conforme definida em qualquer uma das reivindicações precedentes, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

34. Célula **caracterizada** pelo fato de que compreende um ou mais ácidos nucleicos expressando a proteína, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-32.

35. Método de intensificar diretamente e/ou indiretamente morte de células de tumor, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende expor um tumor e células matadoras naturais a uma proteína, conforme definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32.

36. Método de tratamento de câncer, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende a administração a um paciente de uma proteína, conforme definida com qualquer uma das reivindicações 1-32 ou uma formulação, conforme definida com a reivindicação 33.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é selecionado dentre o grupo consistindo em leucemia mileoide aguda (AML), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), neoplasmas mieloproliferativos (MPNs), linfoma, linfomas não Hodgkin, e linfoma de Hodgkin clássico.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a AML é selecionada dentre leucemia mieloblástica aguda indiferenciada, leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima, leucemia mieloblástica aguda com maturação, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mielomonocítica aguda, leucemia

mielomonocítica aguda com eosinofilia, leucemia monocítica aguda, leucemia de tireoide aguda, leucemia megacarioblástica aguda (AMKL), leucemia basofílica aguda, panmielose aguda com fibrose e neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN).

39. Método, de acordo com a reivindicação 37 ou 38, **caracterizado** pelo fato de que a AML é representada por expressão de CLL-1 nas células-tronco de leucemia AML (LSCs).

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que LSCs expressa adicionalmente um marcador de membrana selecionado dentre CD34, CD38, CD123, TIM3, CD25, CD32, e CD96.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37-40, **caracterizado** pelo fato de que a AML é uma doença residual mínima (MRD).

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizado** pelo fato de que a MRD é representada pela presença ou ausência de uma mutação selecionada dentre *FLT3-ITD* ((tirosina quinase tipo Fms 3)-duplicações em tandem internas (ITD)), *NPM1* (Nucleofosmina 1), *DNMT3A* (gene de DNA metiltransferase *DNMT3A)*, e *IDH* (Isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2)).

43. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a MDS é selecionada dentre MDS com displasia de multilinhagem (MDS-MLD), MDS com displasia de linhagem única (MDS-SLD), MDS com sideroblastos em anel (MDS-RS), MDS com blastos em excesso (MDS-EB), MDS com del(5q) isolado, e MDS, não classificada (MDS-U).

44. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a MDS é uma MDS primária ou

uma MDS secundária.

45. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a ALL é selecionada dentre leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) e leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL).

46. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o MPN é selecionado dentre policitemia vera, trombocitemia essencial (ET), e mielofibrose.

47. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o linfoma não Hodgkin é selecionado dentre linfoma de células B e linfoma de células T.

48. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o linfoma é selecionado dentre leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma linfoblástico (LPL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Burkitt (BL), linfoma mediastinal primário de células B grandes (PMBL), linfoma folicular, linfoma de células do manto, leucemia de células pilosas, mieloma de células plasmáticas (PCM) ou mieloma múltiplo (MM), neoplasias de células T/NK maduras e neoplasias histiocíticas.

FIG. 1

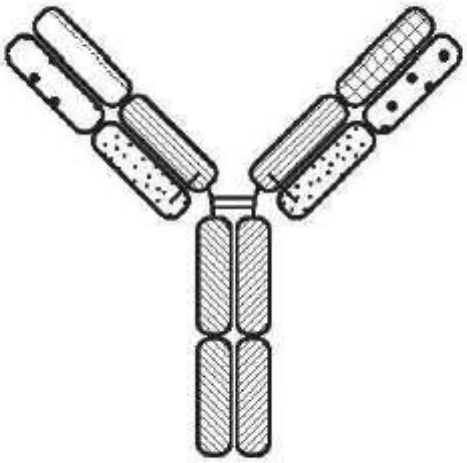


FIG. 2

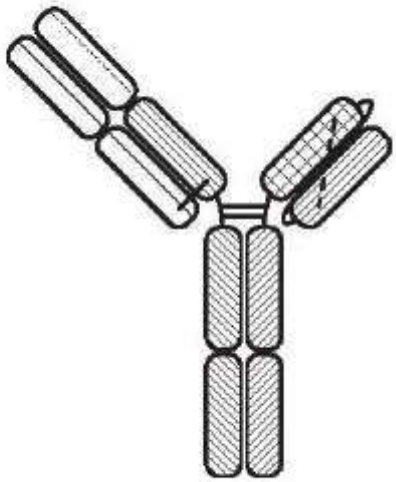


FIG. 3

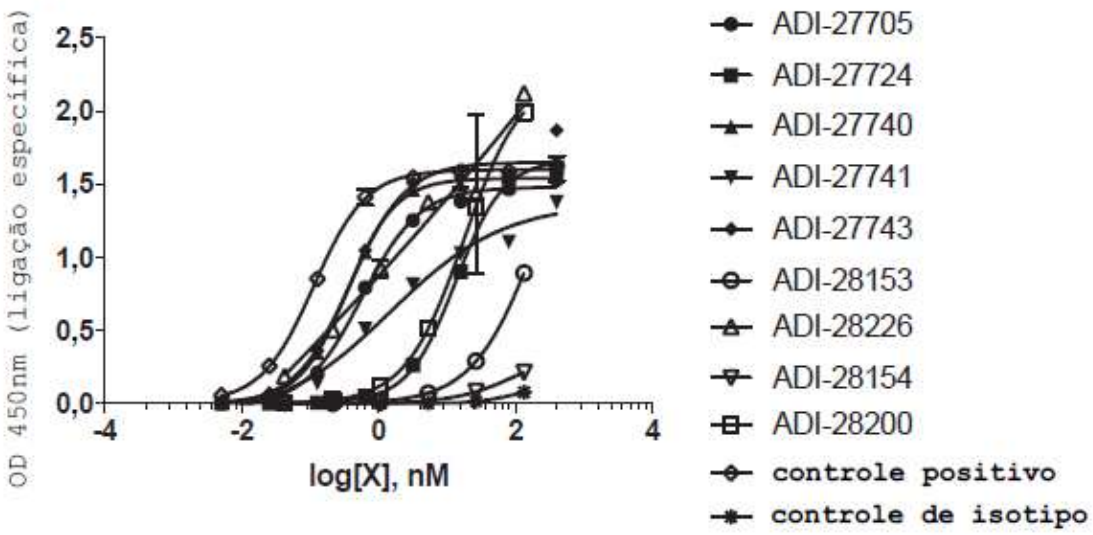

OD 450nm (ligação específica)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-4
-2
0
2
4
log[X], nM
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
controle positivo
controle de isotipo

FIG. 4

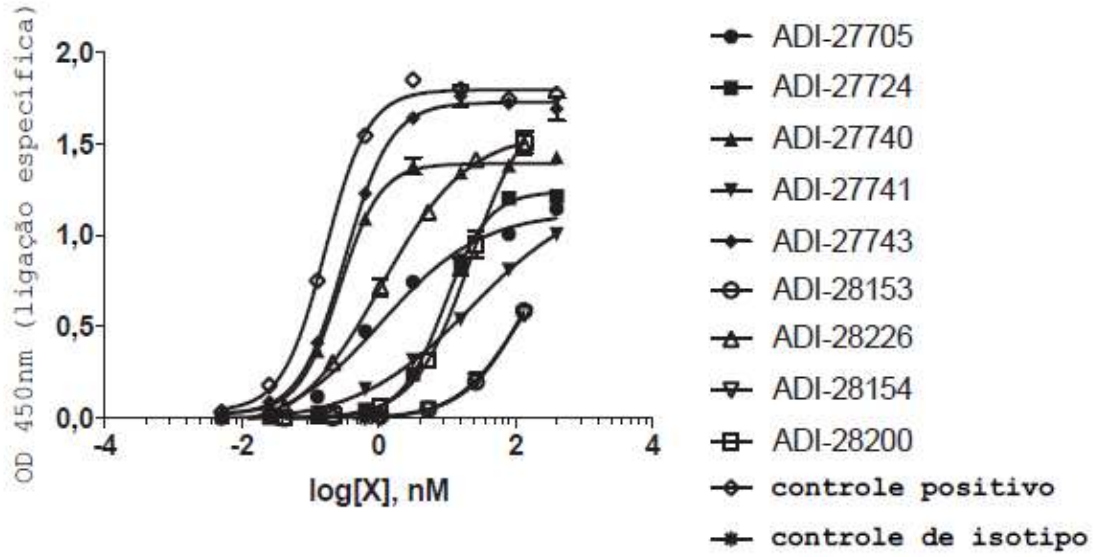

OD 450nm (ligação específica)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-4
-2
0
2
4
log[X], nM
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
controle positivo
controle de isotipo

FIG. 5

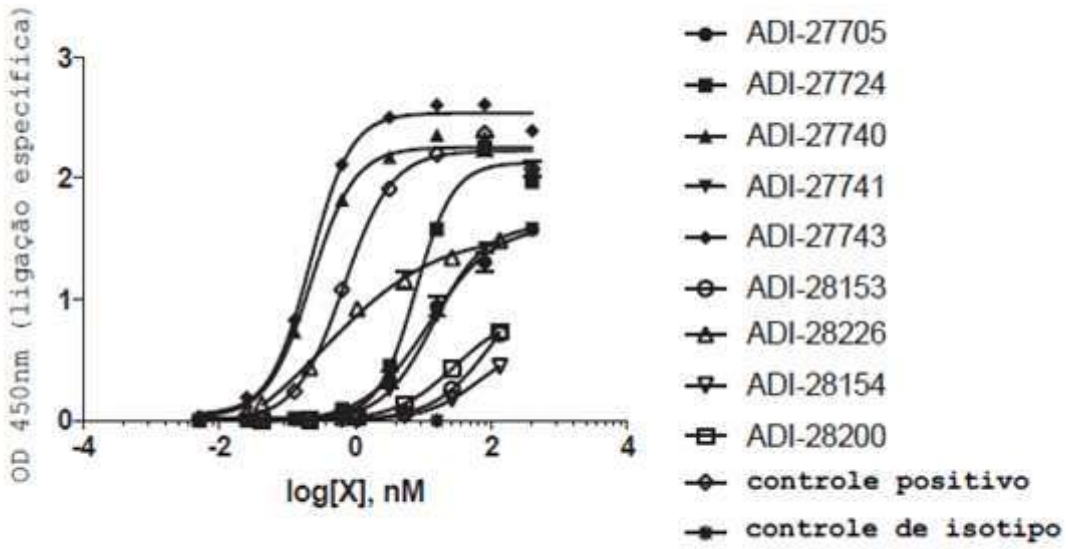

OD 450nm (ligação específica)
3
2
1
0
-4
-2
0
2
4
log[X], nM
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
controle positivo
controle de isotipo

FIG. 6

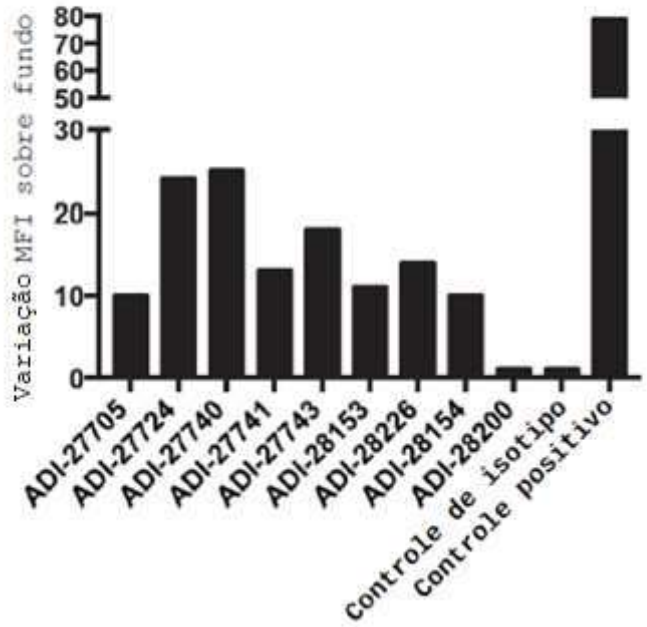

Variação MFI sobre fundo
80
70
60
50
30
20
10
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 7

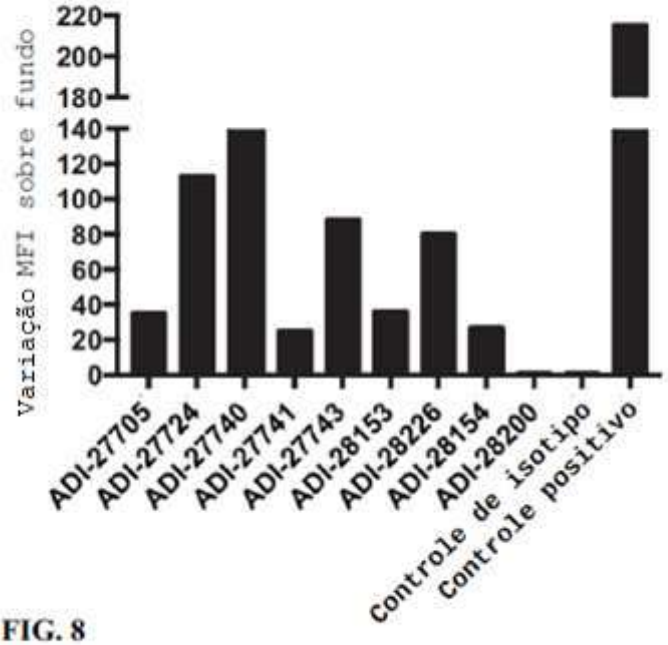

Variação MFI sobre fundo
220
200
180
140
120
100
80
60
40
20
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 8

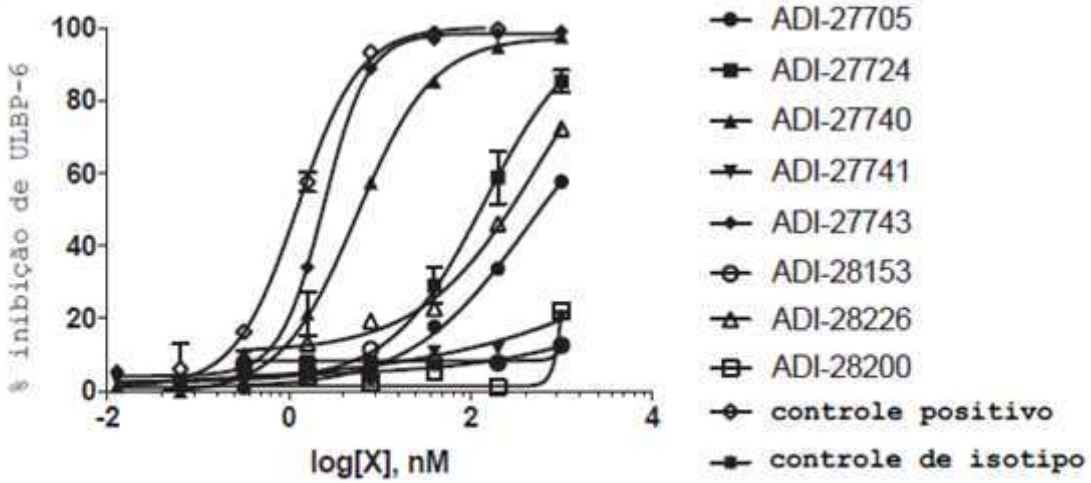

% inibição de ULBP-6
100
80
60
40
20
0
-2
0
2
4
log[X], nM
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28200
controle positivo
controle de isotipo

FIG. 9

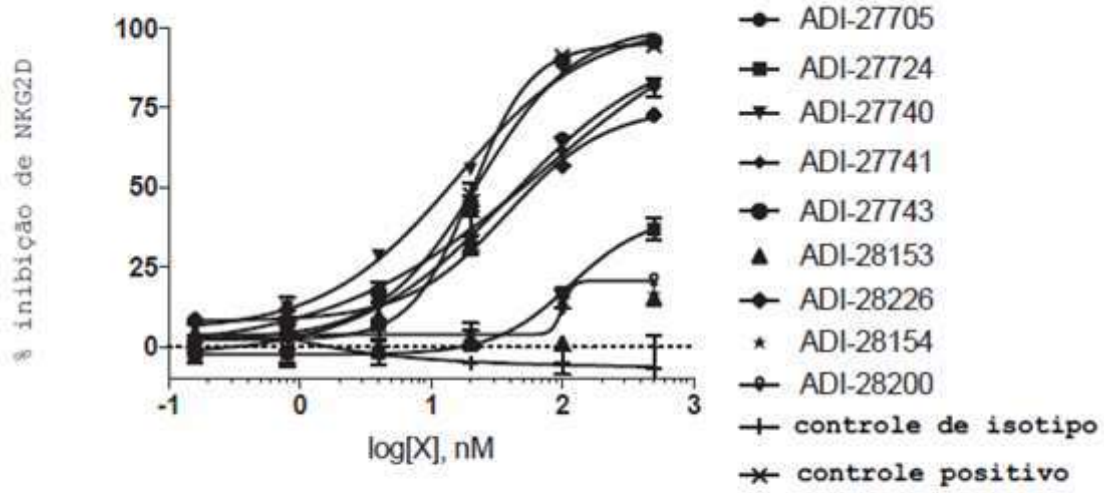

% inibição de NKG2D
100
75
50
25
0
-1
0
1
2
3
log[X], nM
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
controle de isotipo
controle positivo

FIG. 10

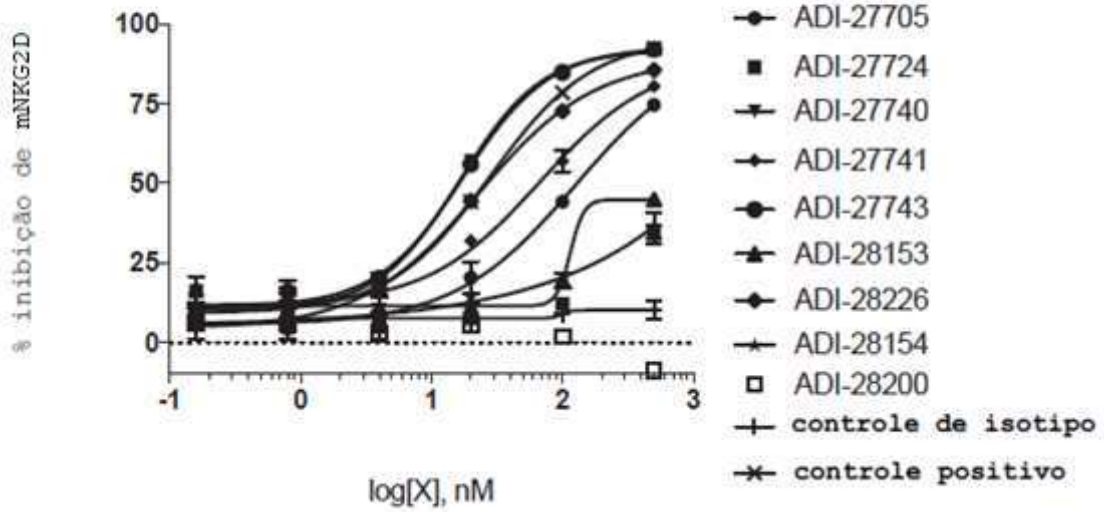

% inibição de mNKG2D
100
75
50
25
0
-1
0
1
2
3
log[X], nM
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
controle de isotipo
controle positivo

FIG. 11

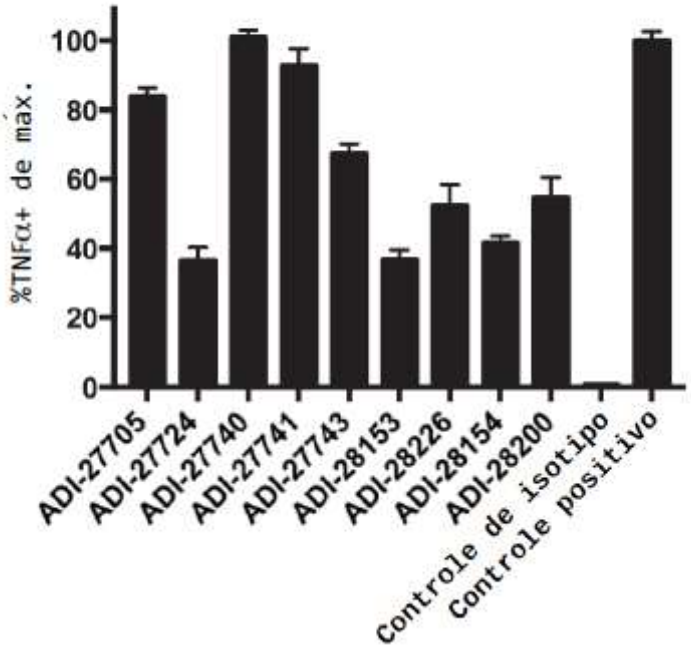

%TNFα+ de máx.
100
80
60
40
20
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 12

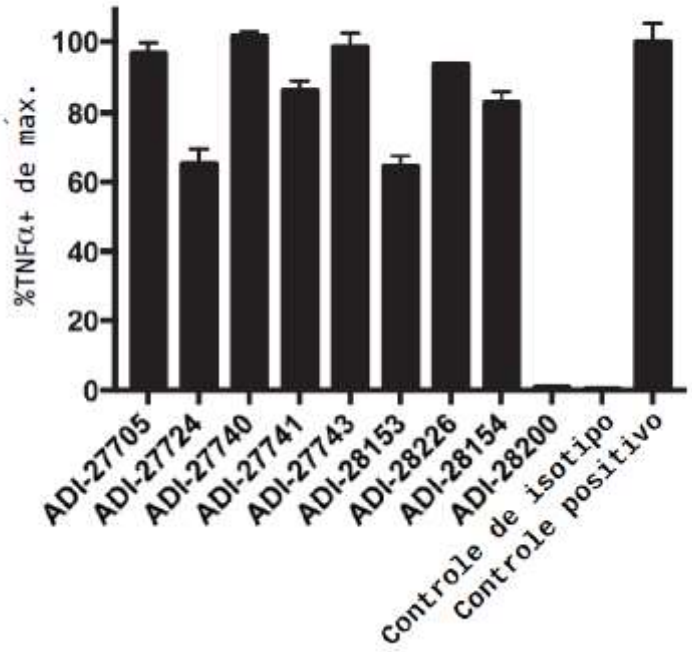

%TNFα+ de máx.
100
80
60
40
20
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 13

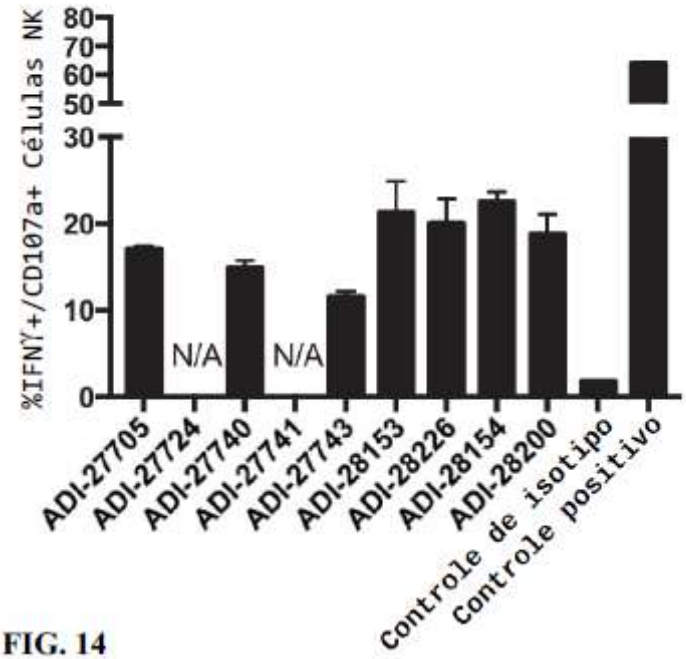

%IFNγ+/CD107a+ Células NK
80
70
60
50
30
20
10
0
N/A
N/A
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 14

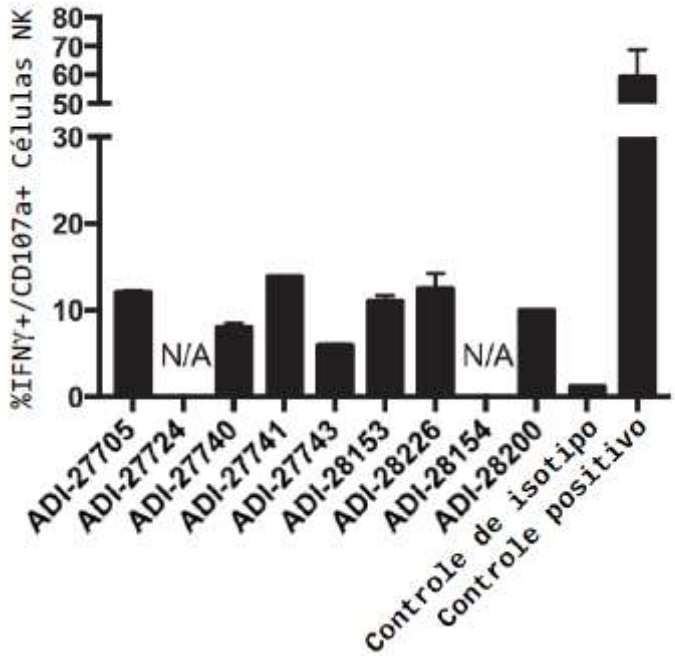

%IFNγ+/CD107a+ Células NK
80
70
60
50
30
20
10
0
N/A
N/A
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 15

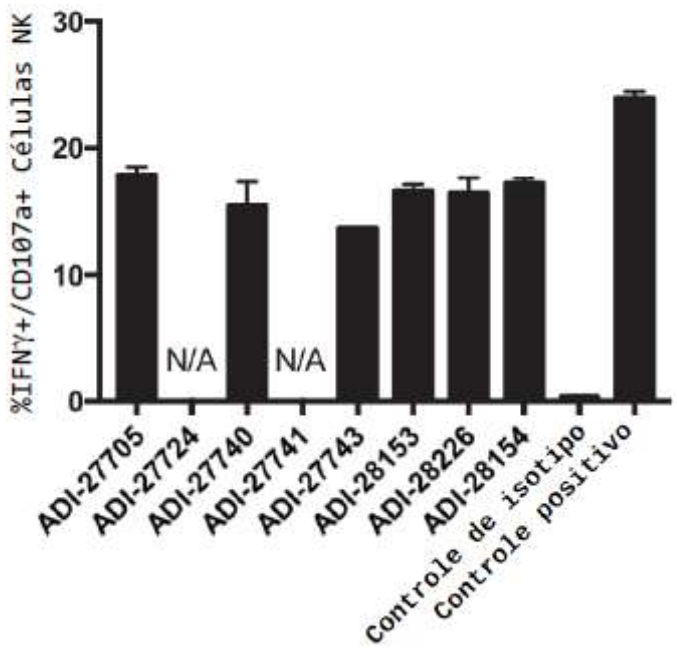

%IFNγ+/CD107a+ Células NK
30
20
10
0
N/A
N/A
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 16

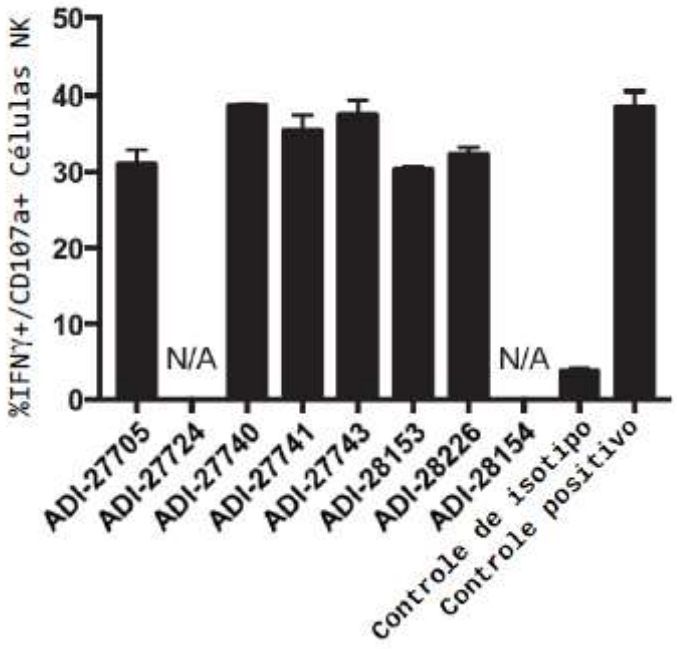

%IFNγ+/CD107a+ Células NK
50
40
30
20
10
0
N/A
N/A
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 17

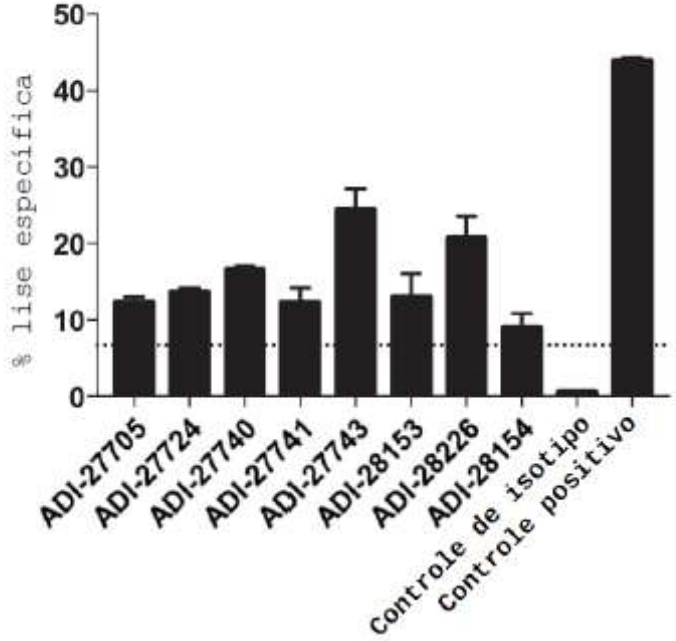

% lise específica
50
40
30
20
10
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
Controle de isotipo
Controle positivo

FIG. 18

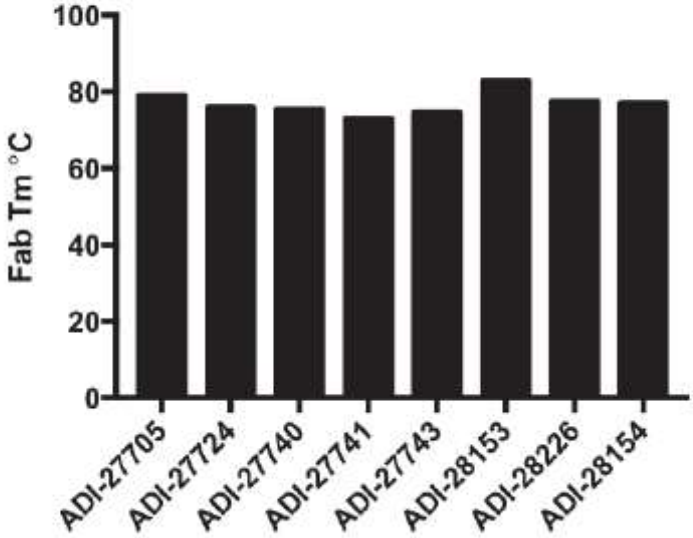

Fab Tm °C
100
80
60
40
20
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154

FIG. 19A

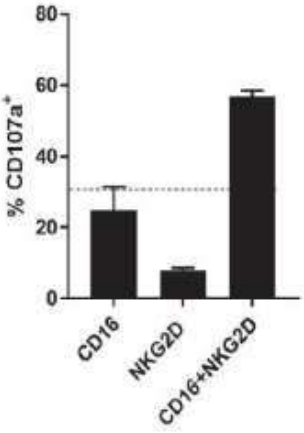


FIG. 19B

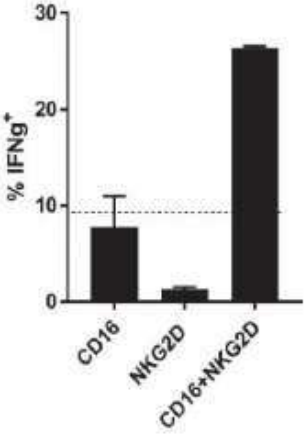


FIG. 19C

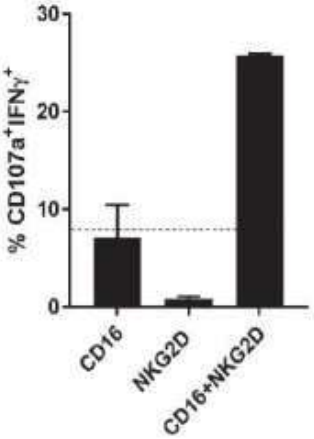


FIG. 20

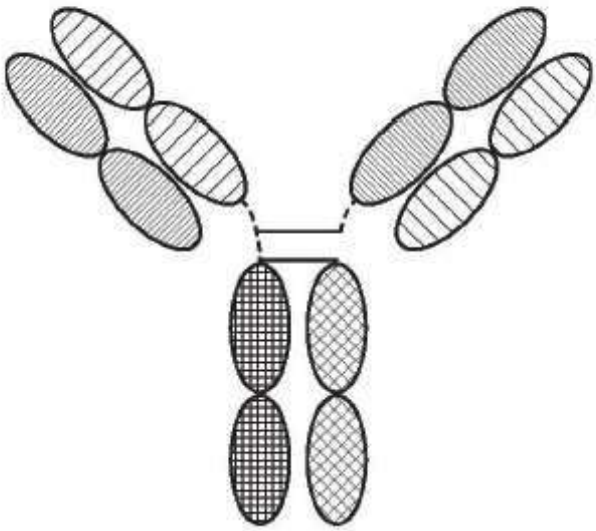


FIG. 21

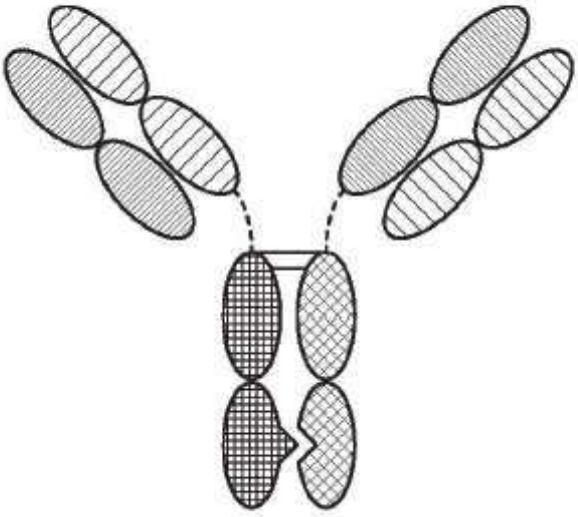


FIG. 22

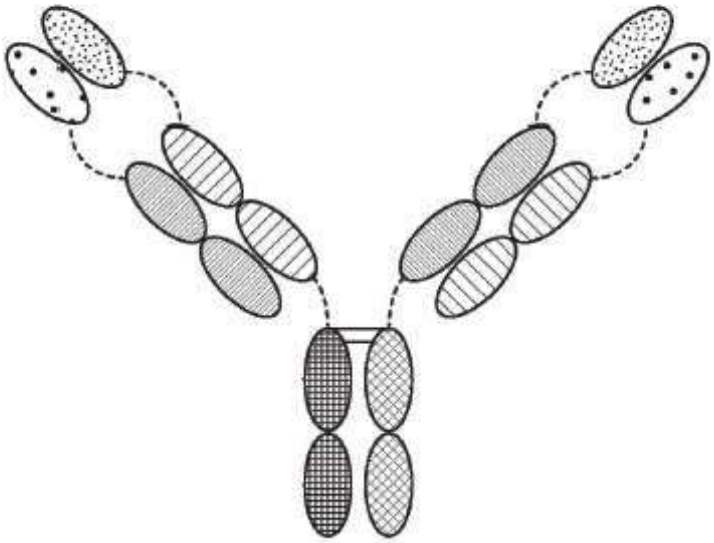


FIG. 23

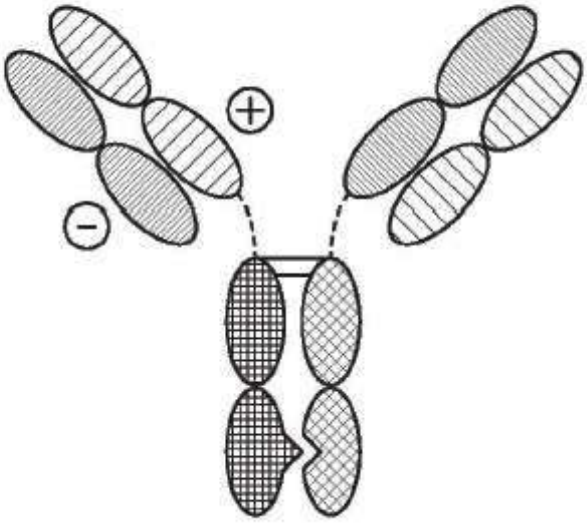


FIG. 24

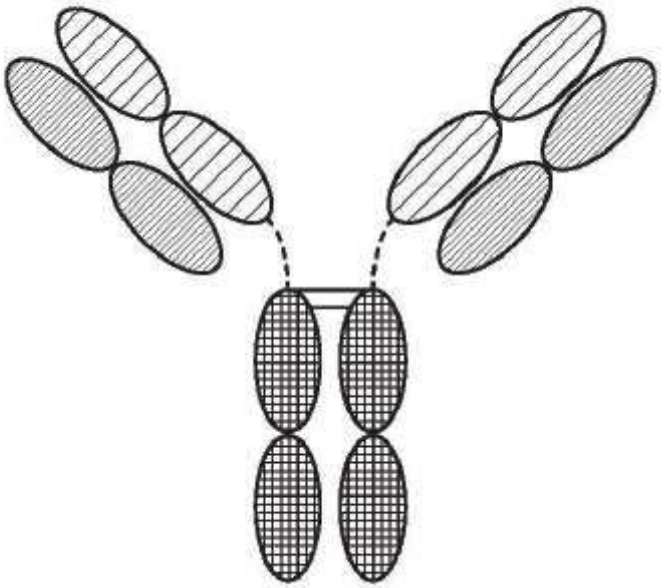


FIG. 25

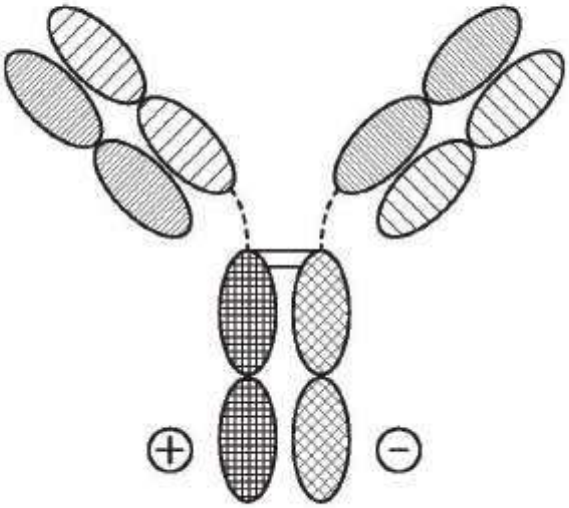


FIG. 26

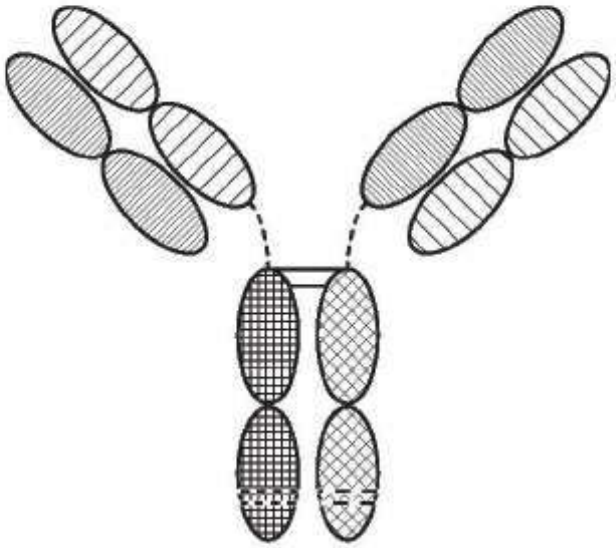


FIG. 27

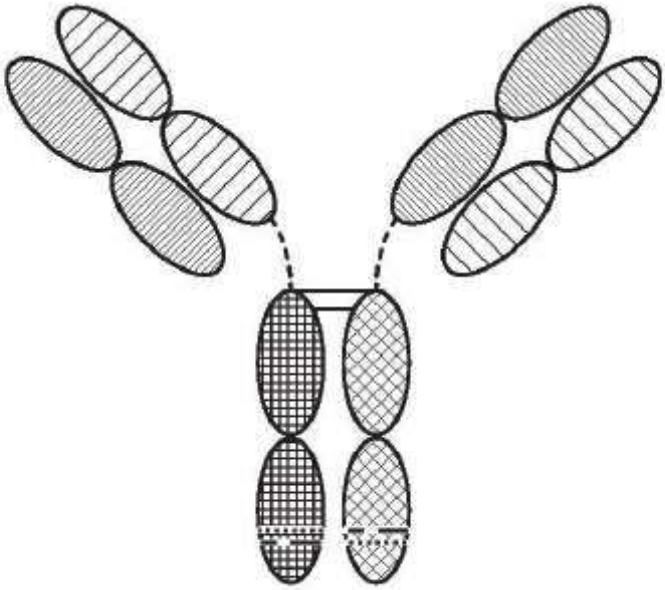


FIG. 28

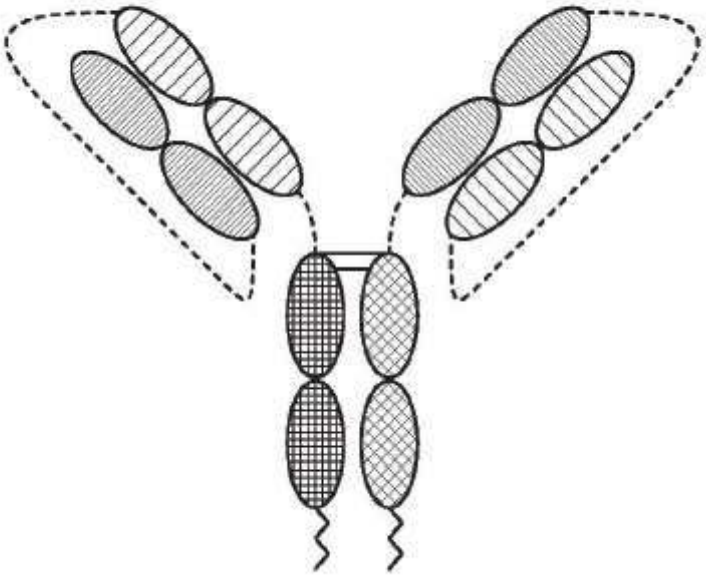


FIG. 29

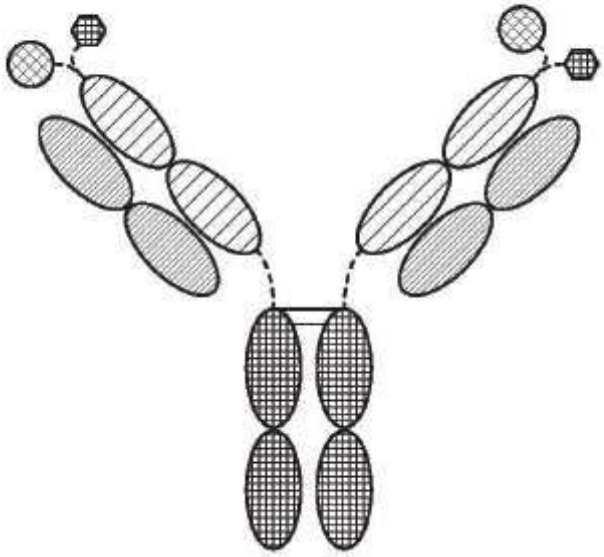


FIG. 30A

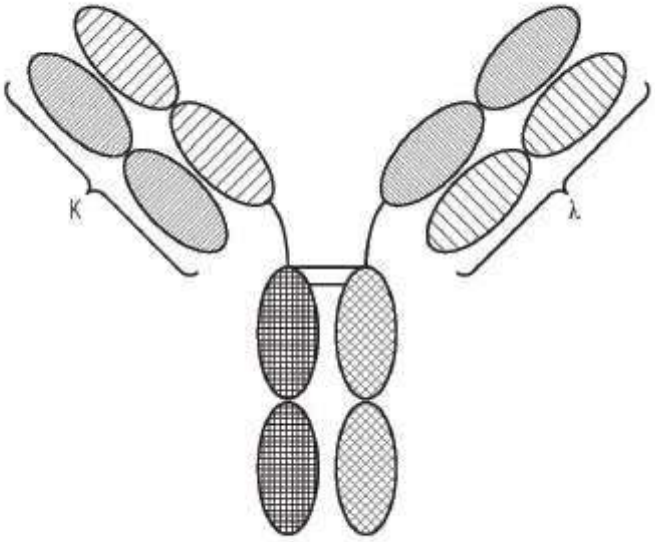


FIG. 30B

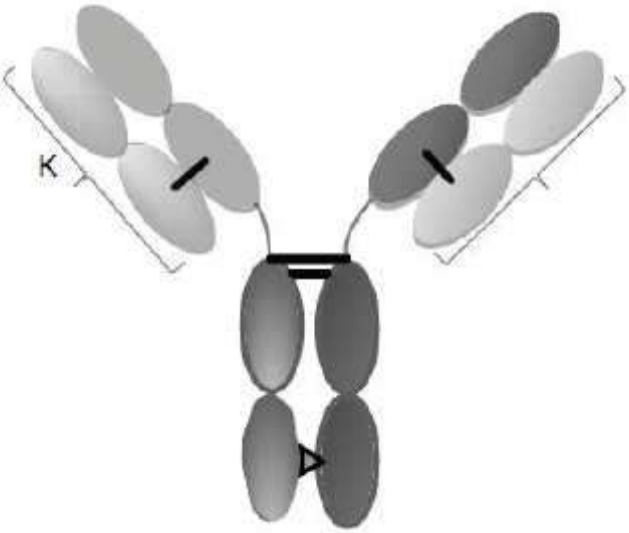


FIG. 31

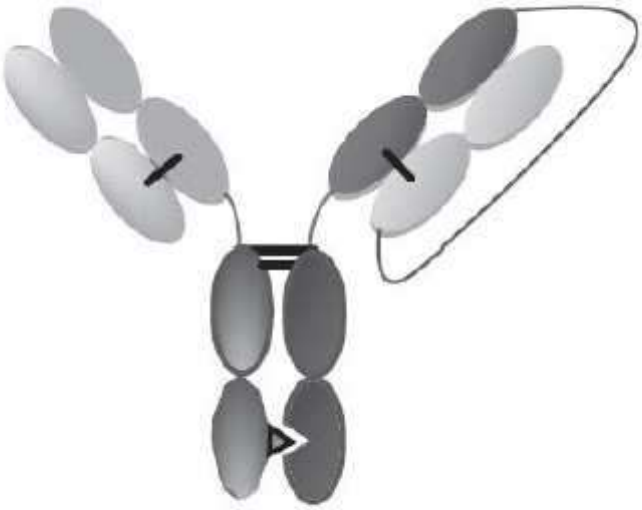


FIG. 32



FIG. 33



FIG. 34



FIG. 35

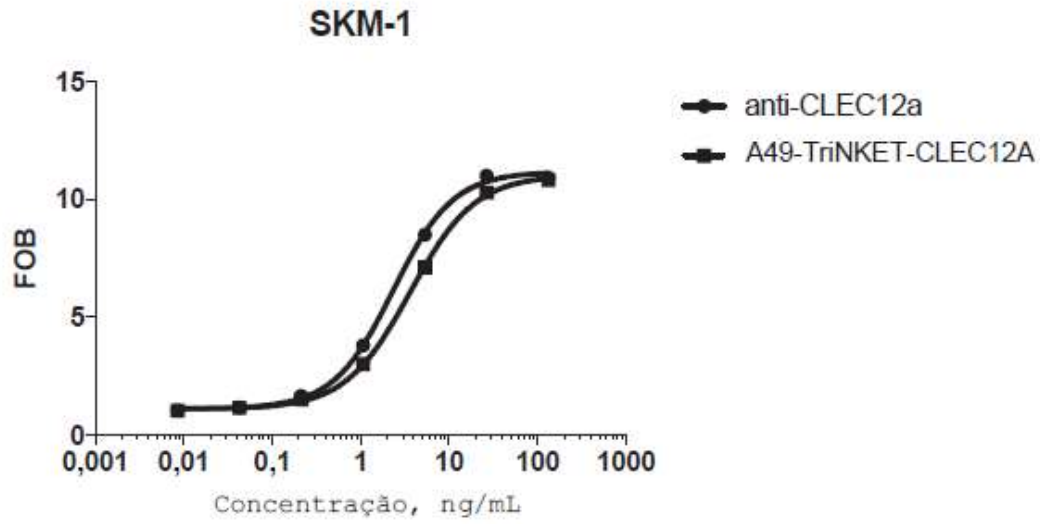

SKM-1
15
10
5
0
FOB
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentração, ng/mL
anti-CLEC12a
A49-TriNKET-CLEC12A

FIG. 36

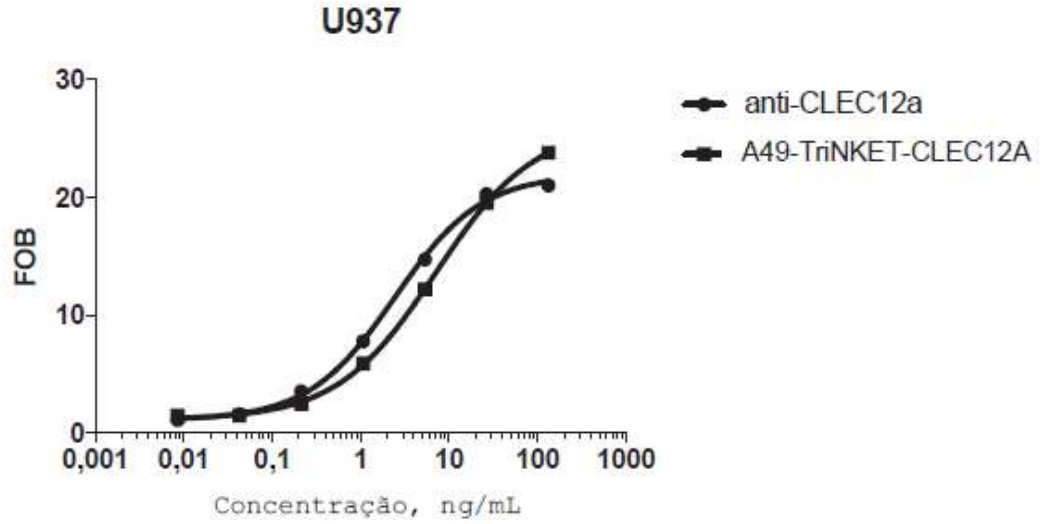

U937
30
20
10
0
FOB
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentração, ng/mL
anti-CLEC12a
A49-TriNKET-CLEC12A

FIG. 37

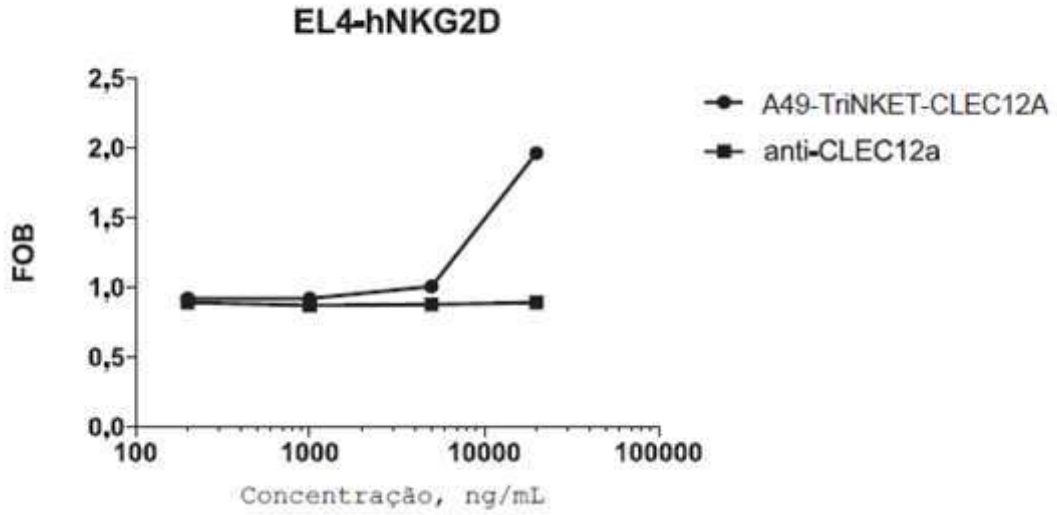

EL4-hNKG2D
FOB
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
100
1000
10000
100000
Concentração, ng/mL
A49-TriNKET-CLEC12A
anti-CLEC12a

FIG. 38

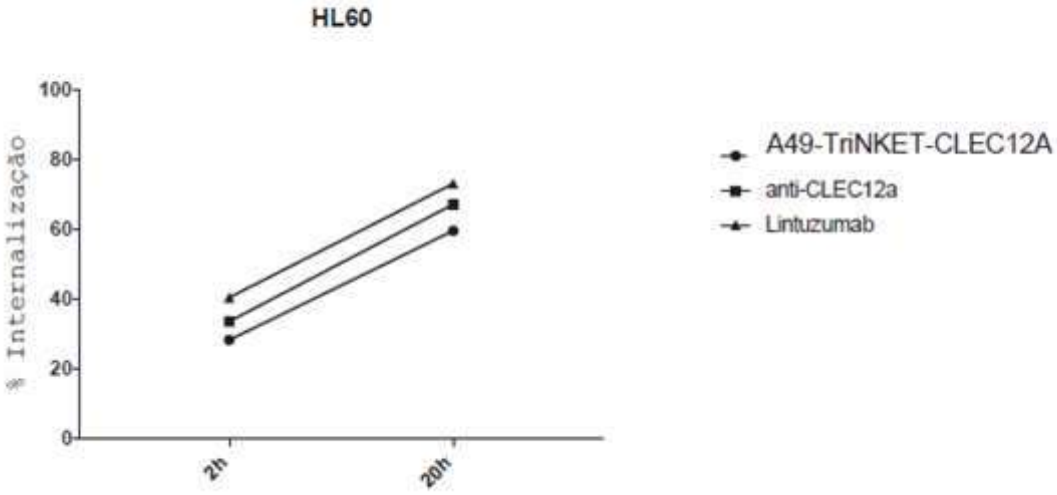

HL60
% Internalização
100
80
60
40
20
0
2h
20h
A49-TriNKET-CLEC12A
anti-CLEC12a
Lintuzumab

FIG. 39

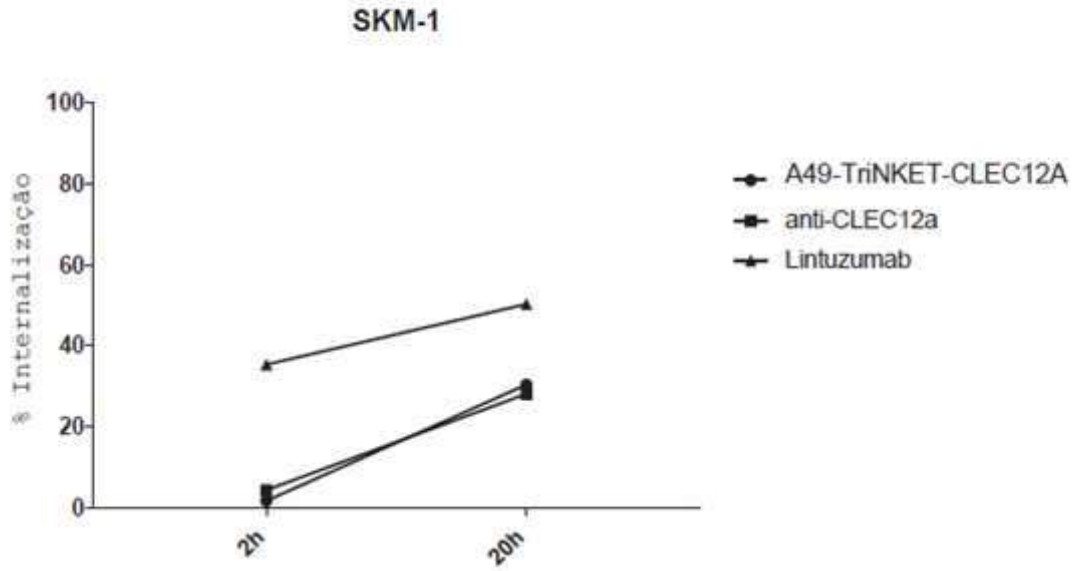

SKM-1
% Internalização
100
80
60
40
20
0
2h
20h
A49-TriNKET-CLEC12A
anti-CLEC12a
Lintuzumab

FIG. 40

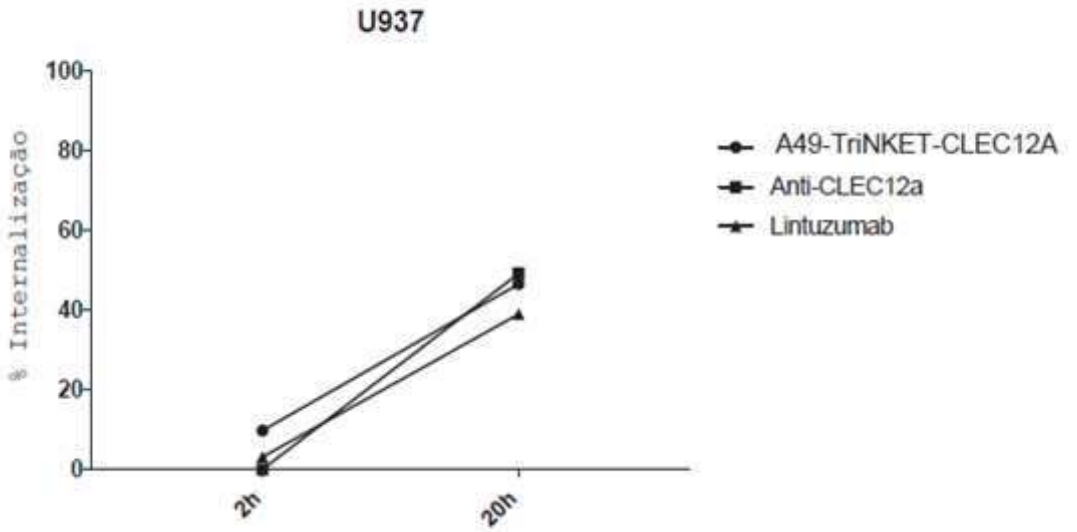

U937
% Internalização
100
80
60
40
20
0
2h
20h
A49-TriNKET-CLEC12A
Anti-CLEC12a
Lintuzumab

FIG. 41

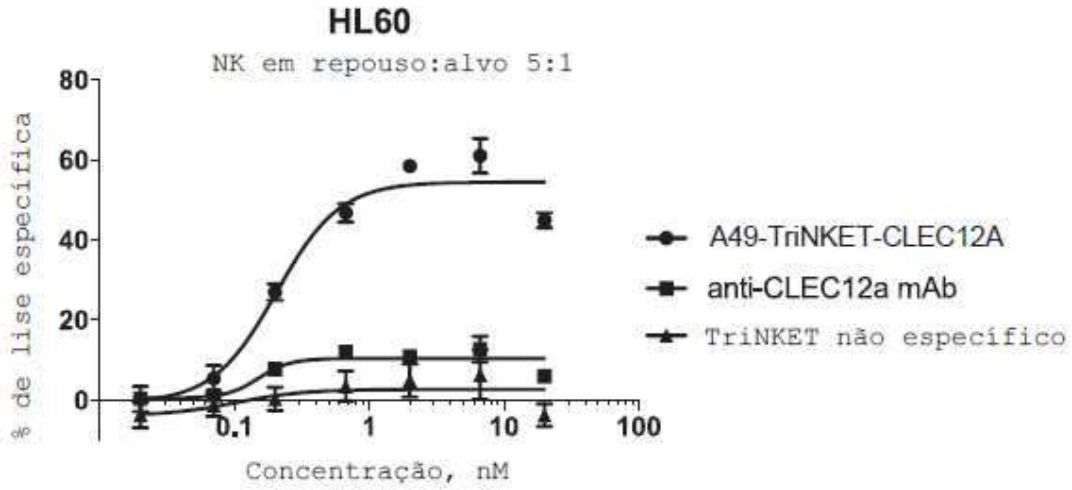
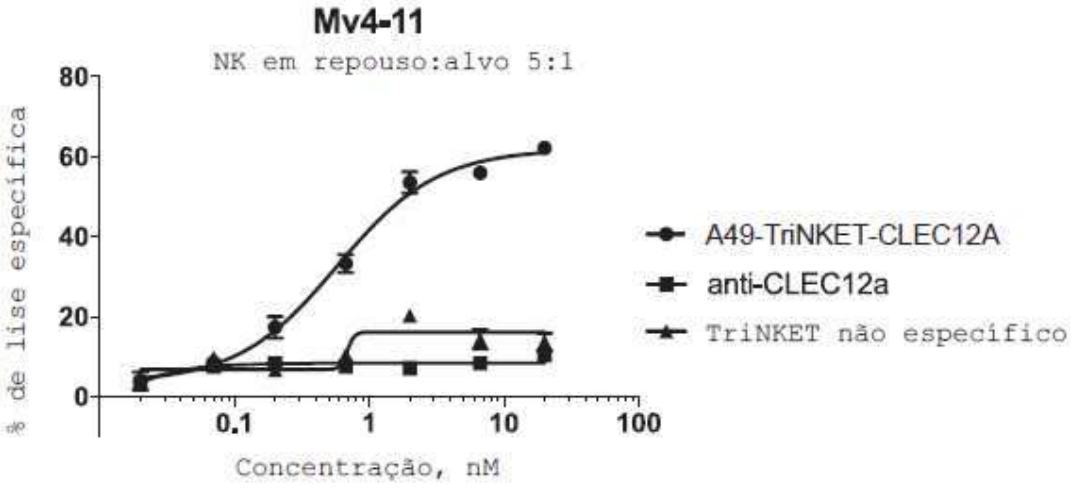

HL60
NK em repouso:alvo 5:1
% de lise específica
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Concentração, nM
A49-TriNKET-CLEC12A
anti-CLEC12a mAb
TriNKET não específico

FIG. 42


Mv4-11
NK em repouso:alvo 5:1
% de lise específica
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Concentração, nM
A49-TriNKET-CLEC12A
anti-CLEC12a
TriNKET não específico

RESUMO

PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A NKG2D, CD16, E MOLÉCULA 1 SEMELHANTE A LECTINA DE TIPO C (CLL-1)

Proteínas de ligação multiespecíficas que se ligam a um antígeno CLL-1 associado a tumor, ao receptor NKG2D, e CD16 são descritas, assim como composições farmacêuticas e métodos terapêuticos utilizáveis no tratamento de câncer.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202000364 DFY-041WO-SL.txt
- Data de Geração do Código: 11/09/2020
- Hora de Geração do Código: 16:55:19
- Código de Controle:
  - Campo 1: 37CBE6051477D9ED
  - Campo 2: 5D8A7ECC18F761F9