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

(21) BR 112020016485-2 A2

(22) Data do Depósito: 13/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/12/2020

(54) Título: MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA

(51) Int. Cl.: A61K 39/395; C07K 16/28; C07K 16/30; C07K 16/32; C07K 16/44.

(30) Prioridade Unionista: 15/02/2018 US 62/631,043; 28/09/2018 US 62/738,632.

(71) Depositante(es): MACROGENICS, INC..

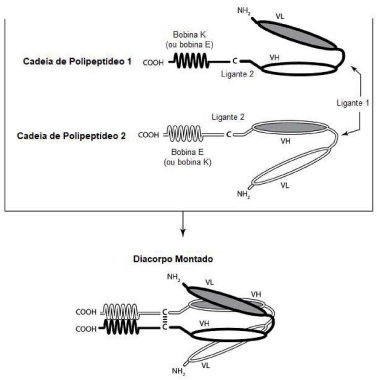
(72) Inventor(es): EZIO BONVINI; LING HUANG; CHIA-YING KAO LAM; GURUNADH REDDY CHICHILI; RALPH FROMAN ALDERSON; PAUL A. MOORE; LESLIE S. JOHNSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2019017772 de 13/02/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/160904 de 22/08/2019

(85) Data da Fase Nacional: 13/08/2020

(57) Resumo: A presente invenção é direcionada a moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3, que compreende um domínio CDRH1, um domínio CDRH2, um domínio CDRH3, um domínio CDRL1, um domínio CDRL2 e um domínio CDRL3, pelo menos um dentre os quais difere em sequência de aminoácidos a partir da sequência de aminoácidos do CDR correspondente de um domínio de ligação rCD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação vCD3 exibe uma afinidade alterada para CD3, em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 que exibe afinidade reduzida para CD3 e são capazes de mediar morte redirecionada de células alvo que expressa uma DA e exibe baixos níveis de liberação de citoquina em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente ao uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 no tratamento de câncer e doenças associadas a patógenos.(...).



MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade sobre os Pedidos de Patente Número de Série U.S. 62/631.043 (depositado em 15 de fevereiro de 2018; pendente), e U.S. 62/738.632 (depositado em 28 de setembro de 2018; pendente), cada um dos quais pedidos são incorporados no presente documento por referência em sua totalidade.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] Este pedido inclui uma ou mais Listagens de Sequência de acordo com 37 C.F.R. 1.821 *et seq.*, que são reveladas em mídia legível por computador (nome do arquivo: 1301_0150PCT_ST25.txt, criado em 30 de janeiro de 2019 e com tamanho de 295.037 bytes), cujo arquivo é incorporado no presente documento em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção é direcionada a moléculas de ligação multiespecíficas (*por exemplo*, um anticorpo biespecífico, um diacorpo, um scFv biespecífico, uma molécula trivalente, um TandAb®, um BiTE® *etc*.) que compreende um domínio de ligação CD3 cm capacidade de se ligar a um epítopo de CD3 e também um domínio de ligação ao antígeno de doença com capacidade de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença (“DA”) (*por exemplo*, uma “molécula de ligação DA x CD3”). A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação CD3 variante (“domínio de ligação vCD3”), que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2, um domínio CDR_H3, um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3, pelo menos uma das quais

difere em sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos do CDR correspondente de um domínio de ligação CD3 de referência ("domínio de ligação rCD3"), e em que a molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação vCD3 exibe uma afinidade alterada for CD3, em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 que exibe afinidade reduzida para CD3 e são capazes de mediar morte redirecionada de células alvo que expressa uma DA e exibe baixos níveis de liberação de citocina em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente ao uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 no tratamento de câncer e doenças associadas a patógenos. A presente invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que compreende tal molécula (ou moléculas).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

I. O sistema imunológico de mamíferos

[004] O sistema imunológico de mamíferos serve como uma defesa contra uma variedade de condições, que inclui, *por exemplo*, lesão, infecção e neoplasia. A eficiência com a qual humanos e outros mamíferos desenvolvem uma resposta imunológica a patógenos, substâncias estranhas e antígenos de câncer se baseia em duas características: a requintada especificidade da resposta imune para o reconhecimento de antígenos e a memória imunológica que permite respostas mais rápidas e vigorosas ao reagir ativação com o mesmo antígeno (Portolés, P. *et al*. (2009) "*The TCR/CD3 Complex: Opening the*

Gate to Successful Vaccination," Current Pharmaceutical Design 15:3290-3300; Guy, C.S. *et al*. (2009) "*Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex*," Immunol Rev. 232(1):7-21; Topalian, S.L. *et al*. (2015) "*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy*," Cancer Cell 27:450-461).

[005] Em indivíduos saudáveis, o sistema imunológico está em estado de repouso, inibido por um repertório de diversos receptores inibidores e ligantes receptores. Após o reconhecimento de um antígeno de câncer, patógeno microbiano, ou uma alérgeno, uma matriz de receptores ativadores e ligantes receptores são acionados para induzir a ativação do sistema imunológico. Tal ativação leva à ativação de macrófagos, células Natural Killer (NK) e células T citotóxicas e específicas para antígenos, e promove a liberação de várias citocinas, que atuam para combater a ameaça percebida à saúde do indivíduo (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," Immunolog. Res. 28(1):39-48; Viglietta, V. *et al.* (2007) "*Modulating Co-Stimulation*," Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*," Adv. Immunol. 90:297-339). O sistema imunológico tem capacidade de retornar ao seu estado de repouso normal quando os sinais imunológicos inibidores compensatórios superam os sinais imunológicos ativadores.

[006] Assim, o estado de doença de câncer (e de fato os estados de doença de doenças infecciosas) pode ser considerado para refletir uma falha na ativação adequada do sistema imunológico do indivíduo. Essa falha pode refletir uma apresentação inadequada de ativação de sinais imunes ou pode

refletir uma capacidade inadequada para aliviar sinais imunológicos inibitórios no indivíduo. Em alguns casos, os pesquisadores determinaram que as células cancerígenas podem cooptar o sistema imunológico para evitar serem detectadas pelo sistema imunológico (Topalian, S.L. *et al*. (2015) "*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy*," Cancer Cell 27:450-461).

[007] O sistema imunológico de mamíferos é mediado por dois sistemas separados, mas inter-relacionados: o sistema imunológico humoral e o sistema imunológico celular. De um modo geral, o sistema humoral é mediado por moléculas solúveis (anticorpos ou imunoglobulinas) produzidas pelas células B. Tais moléculas têm a capacidade de combinar e neutralizar antígenos que foram reconhecidos como estranhos ao corpo. O sistema imunológico celular envolve a mobilização de certas células, denominadas "células T", que servem a uma variedade de funções terapêuticas. As células T são linfócitos que amadurecem no timo e circulam entre os tecidos, o sistema linfático e o sistema circulatório. Em resposta à presença e reconhecimento de estruturas estranhas (antígenos), as células T se tornam "ativadas" para iniciar uma resposta imune. Em muitos casos, esses antígenos estranhos são expressos nas células hospedeiras como resultado de neoplasia ou infecção. Embora as células T não secretem anticorpos, geralmente são necessárias para a secreção de anticorpos pela segunda classe de linfócitos, "Células B" (que derivam da medula óssea). Criticamente, as células T exibem extraordinária especificidade imunológica, de modo a serem capazes de discernir um antígeno de outro).

[008] São necessárias duas interações para a

ativação das células T (Viglietta, V. *et al.* (2007) "*Modulating Co-Stimulation*," Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*," Adv. Immunol. 90:297-339). Na primeira interação, uma célula precisa exibir o antígeno alvo relevante ligado ao Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I ou Classe II ("MHC") de uma célula, para que possa ligar o Receptor de célula T ("TCR") de um linfócito T virgem. Embora quase todos os tipos de células possam servir como células apresentadoras de antígenos, algumas células, como macrófagos, células B e células dendríticas, se especializam em apresentar antígenos estranhos e são "células apresentadoras de antígenos" "profissionais". A detecção imunológica de antígeno ligada às moléculas de MHC I de uma célula apresentadora de antígeno leva à produção de células T citotóxicas. A detecção imunológica de antígeno ligada às moléculas de MHC II de uma célula apresentadora de antígeno leva à produção de células T citotóxicas. Na segunda interação, um ligante da célula apresentadora de antígeno deve se ligar a um correceptor da célula T (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*," Immunol. Rev. 229:307-321). As células T com ambos os sinais estimuladores são capazes de responder a citocinas (como a Interleucina-2 e Interleucina-12).

[009] Na ausência de ambos os sinais coestimuladores durante o envolvimento do TCR, as células T entram em um estado funcionalmente sem resposta, denominado anergia clonal (Khawli, L.A. *et al.* (2008) "*Cytokine,*

Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors," Exp. Pharmacol. 181:291-328). Nos estados patológicos, as células T são os principais atores de várias doenças autoimunes específicas de órgãos, como diabetes tipo I, artrite reumatóide e esclerose múltipla (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," Immunolog. Res. 28(1):39-48).

[0010] Esse caminho imune do "ponto de verificação" é importante para manter a autotolerância (*isto é,* impedir que um indivíduo monte um ataque do sistema imunológico contra suas próprias células (uma reação "autoimune") e limitar os danos colaterais nos tecidos durante processos antimicrobianos ou respostas imunes antialérgicas. Quando o contato de uma célula T resulta na geração de apenas um dos dois sinais necessários, a célula T não é ativada e não ocorre uma resposta imune adaptativa. O mecanismo de "dois sinais" da ativação das células T fornece, assim, uma maneira para o sistema imunológico evitar respostas indesejadas, como respostas a auto-antígenos que, de outra forma, resultariam em um ataque do sistema imunológico contra as células de um indivíduo (uma reação "autoimune").

II. MOLECULAS DE SUPERFÍCIE DE CÉLULA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO CELULAR

A. CD3, CD4 e CD8

[0011] As células do sistema imunológico são caracterizadas por sua expressão de moléculas especializadas na superfície celular da glicoproteína. As interações entre essas moléculas e moléculas de outras células desencadeiam, mantêm ou amortecem a resposta imune. Em particular, todas as células T são caracterizadas por sua expressão de CD3. CD3 é

um correceptor de células T composto por quatro cadeias distintas (Wucherpfennig, K.W. *et al*. (2010) "*Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation of Signaling*," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; páginas 1 a 14; Chetty, R. *et al*. (1994) "*CD3: Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice*," J. Pathol. 173(4):303-307; Guy, C.S. *et al*. (2009) "*Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex*," Immunol. Rev. 232(1):7-21).

[0012] Nos mamíferos, o complexo contém uma cadeia CD3γ, uma cadeia CD3δ e duas cadeias CD3ε. Essas cadeias se associam ao TCR para gerar um sinal de ativação nos linfócitos T (Smith-Garvin, J.E. *et al*. (2009) "*T Cell Activation*," Annu. Rev. Immunol. 27:591-619). Na ausência de CD3, os TCRs não se agrupam adequadamente e são degradados (Thomas, S. *et al*. (2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170-177). O CD3 é encontrado ligado às membranas de todas as células T maduras e praticamente em nenhum outro tipo de célula (consulte, Janeway, C.A. *et al*. (2005) In: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE," 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214 a 216; Sun, Z. J. *et al*. (2001) "*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3ε:γ Heterodimer*," Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. *et al*. (2006) "*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex*," Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139).

[0013] O componente invariante de sinalização CD3ε do complexo TCR nas células T foi usado como um alvo para

forçar a formação de uma sinapse imunológica entre células T e células cancerígenas. O coenvolvimento de CD3 e do antígeno tumoral ativa as células T, desencadeando a lise das células cancerígenas que expressam o antígeno tumoral (Baeuerle *et al*. (2011) "*Bispecific T-cell Engager For Cancer Therapy*," In: BISPECIFIC ANTIBODIES, Kontermann, R.E. (Ed.) Springer-Verlag; 2011:273-287). Essa abordagem permite que anticorpos biespecíficos interajam globalmente com o compartimento de células T com alta especificidade para células cancerígenas e é amplamente aplicável a uma ampla variedade de antígenos tumorais na superfície celular e também foi implementada para atingir células infectadas por patógenos (consulte, *por exemplo*, Sloan *et al*. (2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*," PLoS Pathog 11(11): e1005233. doi:10.1371/journal.ppat.1005233; documentos número WO 2014/159940; e WO 2016/054101).

[0014] Um primeiro subconjunto de células T, conhecido como "células T auxiliares", é caracterizado pela expressão do CD4 (*isto é*, são "$CD4^+$" bem como $CD3^+$). As células T $CD4^+$ são os organizadoras essenciais da maioria dos sistemas imunológicos e autoimunes de mamíferos (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," Immunolog. Res. 28(1):39-48). Foi constatado que a ativação de células T $CD4^+$ é mediada por interações coestimuladoras entre um antígeno: Complexo Principal de molécula de Histocompatibilidade Classe II (MHC II), que está disposto em matriz na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (como uma célula B, um macrófago ou uma célula dendrítica) e

um complexo de duas moléculas, o TCR e um ligante receptor da superfície de célula CD3, ambos dispostos em matriz na superfície de uma célula T $CD4^+$ virgem. As células auxiliares T ativadas são capazes de proliferar em células Th1 capazes de mediar uma resposta inflamatória à célula alvo.

[0015] Um segundo subconjunto de células T, conhecido como "células T citotóxicas", é caracterizado pela expressão de CD8 (*isto é*, são "$CD8^+$" bem como $CD3^+$). CD8 é um correceptor de célula T composto por duas cadeias distintas (Leahy, D.J. (1995) "*A Structural View of CD4 and CD8*," FASEB J. 9:17-25) that is expressed on cytotoxic T-cells. Foi constatado que a ativação das células T $CD8^+$ é mediada por interações coestimuladoras entre um antígeno: complexo principal de moléculas de histocompatibilidade classe I (MHC I) que está disposto em matriz na superfície de uma célula alvo e um complexo de CD8 e receptor de célula T, disposto em matriz na superfície da célula T $CD8^+$ ((Gao, G. *et al*. (2000) "*Molecular Interactions Of Coreceptor CD8 And MHC Class I: The Molecular Basis For Functional Coordination With The T-Cell Receptor,*" Immunol. Today 21:630-636). Ao contrário das moléculas principais de histocompatibilidade classe II (MHC II), que são expressas apenas por certas células do sistema imunológico, as moléculas de MHC I são muito amplamente expressas. Assim, as células T citotóxicas com capacidade de se ligar a uma grande variedade de tipos de células. As células T citotóxicas ativadas mediam a morte celular através da liberação de citotoxinas perforina, granzimas e granulisina. Através da ação da perforina, as granzimas entram no citoplasma da célula alvo e sua função de protease de serina desencadeia a cascata de caspase, que é uma série de proteases de cisteína

que eventualmente levam à apoptose (morte celular programada) das células alvo.

B. O RECEPTOR DE CÉLULAS T ("TCR")

[0016] O receptor de células T ("TCR") é expresso de forma nativa por células T CD4+ ou CD8+ e permite que essas células reconheçam peptídeos antigênicos que são ligados e apresentados por proteínas MHC de classe I ou classe II de células apresentadoras de antígenos. O reconhecimento de um complexo pMHC (peptídeo-MHC) por um TCR inicia a propagação de uma resposta imune celular que leva à produção de citocinas e à lise da célula apresentadora de antígenos (consulte, *por exemplo*, Armstrong, K.M. *et al.* (2008) "*Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes*," Biochem. J. 415(Parte 2):183-196; Willemsen, R. (2008) "*Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy*," Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. *et al.* (2007) "*Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation*," Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. *et al.* (2005) "*Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes*," Am. J. Ther. 12(6):534-550). CD3 é o receptor que se liga ao TCR (Thomas, S. *et al.* (2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170-177; Guy, C.S. *et al.* (2009) "*Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex*," Immunol. Rev. 232(1):7-21; St. Clair, E.W. (Epub 2009 Oct 12) "*Novel Targeted Therapies For Autoimmunity*," Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657; Baeuerle, P.A. *et al.* (Epub 2009 Jun 9) "*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*," Cancer Res. 69(12):4941-4944; Smith-Garvin, J.E. *et*

al. (2009) "*T Cell Activation*," Annu. Rev. Immunol. 27:591-619; Renders, L. *et al*. (2003) "*Engineered CD3 Antibodies For Immunosuppression*," Clin. Exp. Immunol. 133(3):307-309).

[0017] O complexo TCR e CD3, juntamente com a cadeia zeta de cadeia CD3 (também conhecida como cadeia zeta T3 de receptor de células T ou CD247) compreende o "complexo TCR" (Van der Merwe, P.A. *etc*. (epub Dec. 3, 2010) "*Mechanisms For T Cell Receptor Triggering*," Nat. Rev. Immunol. 11:47-55; Wucherpfennig, K.W. *et al*. (2010) "*Structural Biology of the T Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling*," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140). O complexo é particularmente significativo, visto que contém um grande número (dez) de motivos de ativação à base de tirosina imunoreceptora (ITAMs).

[0018] Moléculas multiespecíficas que compreendem um domínio de ligação CD3 e um domínio de ligação específico para um antígeno de doença ("DA") expresso em uma célula alvo são capazes de mediar a morte de células T redirecionadas dessas células alvo. No entanto, devido à afinidade de tais moléculas para CD3, essas moléculas podem ser muito potentes, de modo a exibir liberação indesejável de citocinas a partir das células T estimuladas. Assim, apesar dos avanços anteriores na identificação das moléculas envolvidas nas respostas imunes aos mamíferos, permanece uma necessidade de terapias melhoradas para o tratamento de cânceres e doenças infecciosas. A presente invenção fornece um painel de domínios de ligação CD3 variantes com uma variedade de cinética de ligação, que pode ser usada para modular as atividades de morte celular e/ou liberação de citocinas de tais moléculas multiespecíficas para melhorar a janela terapêutica. A presente invenção é

direcionada para esse e outros objetivos.

SUMARIO DA INVENÇÃO

[0019] A presente invenção é direcionada a moléculas de ligação multiespecíficas (*por exemplo*, um anticorpo biespecífico, um diacorpo, um scFv biespecífico, uma molécula trivalente, um TandAb®, um BiTE® *etc*.) que compreende um domínio de ligação CD3 cm capacidade de se ligar a um epítopo de CD3 e também um domínio de ligação ao antígeno de doença com capacidade de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença ("DA") (*por exemplo*, uma "molécula de ligação DA x CD3"). A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação CD3 variante ("domínio de ligação vCD3"), que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2, um domínio CDR_H3, um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3, pelo menos uma das quais difere em sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos do CDR correspondente de um domínio de ligação CD3 de referência ("domínio de ligação rCD3"), e em que a molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação vCD3 exibe uma afinidade alterada for CD3, em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 que exibe afinidade reduzida para CD3 e são capazes de mediar morte redirecionada de células alvo que expressa uma DA e exibe baixos níveis de liberação de citoquina em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente ao uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 no tratamento de câncer e doenças associadas a

patógenos. A presente invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que compreende tal molécula (ou moléculas).

[0020] Em detalhes, a invenção fornece uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação CD3 com capacidade de se ligar a um epítopo de CD3 e um domínio de ligação ao antígeno de doença com capacidade de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença, em que o domínio de ligação CD3 compreende:

[0021] (I) (A) um domínio CDR_H1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95 e SEQ ID NO:97;

[0022] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[0023] (C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

[0024] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[0025] (E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

[0026] (F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; ou

[0027] (II) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

[0028] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[0029] (C) um domínio CDR_H3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID

NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105 e SEQ ID NO:107;

[0030] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[0031] (E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

[0032] (F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; ou

[0033] (III) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

[0034] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[0035] (C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

[0036] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[0037] (E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

[0038] (F) um domínio CDR_L3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:109 ou SEQ ID NO:111; ou

[0039] (IV) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

[0040] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[0041] (C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

[0042] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[0043] (E) um domínio CDR_L2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:113 e SEQ ID NO:115; e

[0044] (F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62.

[0045] A invenção se refere adicionalmente à modalidade dessa molécula de ligação DA x CD3, em que o domínio de ligação CD3 compreende:

[0046] (I) (A) um domínio VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

[0047] (B) um domínio VH que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104 e SEQ ID NO:106; ou

[0048] (II) (A) um domínio VL que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112; e SEQ ID NO:114;

[0049] (B) um domínio VH que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55.

[0050] A invenção se refere adicionalmente à modalidade dessa molécula de ligação DA x CD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 é um anticorpo biespecífico, um diacorpo biespecífico, um scFv biespecífico, um TandAb biespecífico ou uma molécula de ligação trivalente.

[0051] A invenção se refere adicionalmente à modalidade dessa molécula de ligação DA x CD3, em que a

molécula de ligação DA x CD3 é capaz de se ligar a mais de um antígeno da doença e/ou uma molécula de superfície de célula diferente de uma célula efetora. Particularmente, em que a molécula diferente da superfície de célula de uma célula efetora é CD2, CD8, CD16, TCR, NKp46 ou NKG2D.

[0052] A invenção também se refere à modalidade dessa molécula de ligação DA x CD3, em que o antígeno da doença é um antígeno de câncer ou um antígeno associado ao patógeno.

[0053] A invenção também se refere à modalidade dessa molécula de ligação DA x CD3, em que o antígeno de câncer é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos de câncer: 19,9, 4,2, ADAM-9, AH6, ALCAM, B1, B7-H3, BAGE, beta-catenina, grupo sanguíneo ALe^b/Le^y, antígeno de linfoma de Burkitt-38,13, C14, CA125, Carboxipeptidase M, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD36, CD40/CD154, CD45, CD56, CD46, CD52, CD56, CD79a/CD79b, CD103, CD123, CD317, CDK4, CEA, CEACAM5/CEACAM6, CO17-1A, CO-43, CO-514, CTA-1, CTLA-4, Citoqueratina 8, D1.1, $D_1$56-22, DR5, série E_1, EGFR, um receptor de Efrina, EphA2, Erb, GAGE, um gangliosídeo GD2/GD3/GM2, GICA 19-9, gp100, Gp37, gp75, gpA33, HER2/neu, HMFG, Papilomavírus Humano-E6/Papilomavírus Humano-E7, HMW-MAA, antígeno I, IL13Rα2, Integrina β6, JAM-3, KID3, KID31, KS 1/4 antígeno de pan-carcinoma, L6,L20, LEA, LUCA-2, M1:22:25:8, M18, M39, MAGE, MART, mesotelina, MUC-1, MUM-1, Myl, N-acetilglucosaminiltransferase, neoglicoproteína, NS-10, OFA-1, OFA-2, Oncostatina M, p15, p97, PEM, PEMA, PIPA, PSA, PSMA, fosfato de ácido prostático, R_{24}, ROR1, um esfingolipídio, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, sTn, o peptídeo derivado do receptor de células T, T_5A_7, TAG-72, TL5, receptor TNF, receptor TNF-γ, TRA-1-85, um Receptor de Transferrina,

5T4, TSTA, VEGF, um Receptor VEGF, VEP8, VEP9, VIM-D5 e hapteno Y, Le^y.

[0054] A invenção se refere particularmente à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que o antígeno de câncer é B7-H3, CEACAM5/CEACAM6, EGRF, EphA2, gpA33, HER2/neu, VEGF, 5T4, IL13Rα2, CD123, CD19, ou ROR1.

[0055] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que o antígeno associado ao patógeno é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

[0056] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende: uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo, covalentemente ligados entre si, em que:

[0057] (A) a primeira cadeia de polipeptídeo compreende, na direção do terminal N ao terminal C:

[0058] (i) um domínio 1, que compreende:

[0059] (1) um subdomínio (1A), que compreende um domínio VL de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao epítopo de um antígeno de doença (VL_{DA}); e

[0060] (2) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VH de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao epítopo de CD3 (VH_{CD3});

[0061] em que os subdomínios 1A e 1B são separados um do outro por um peptídeo ligante; e

[0062] (ii) um domínio 2, em que o domínio 2 é um domínio de promoção de heterodímero;

[0063] (B) a segunda cadeia de polipeptídeo compreende, na direção do terminal N ao terminal C:

[0064] (i) um domínio 1, que compreende:

[0065] (1) um subdomínio (1A), que compreende um domínio VL de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao epítopo de CD3 (VL_{CD3}); e

[0066] (2) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VH do anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao epítopo de um antígeno de doença (VH_{DA});

[0067] em que os ditos subdomínios 1A e 1B são separados um do outro por um peptídeo ligante;

[0068] (ii) um domínio 2, em que o domínio 2 é um domínio de promoção de heterodímero, em que o domínio de promoção de heterodímero da primeira e da segunda cadeias de polipeptídeo são diferentes;

[0069] e em que:

[0070] (a) o domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno de doença e o domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação CD3; ou

[0071] (b) o domínio VL da primeira cadeia de

polipeptídeo e o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação CD3 e o domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno de doença.

[0072] A invenção se refere adicionalmente à modalidade dessa molécula de ligação DA x CD3, em que:

[0073] (A) o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina E e o dito domínio de promoção de heterodímero da dita segunda cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina K; ou

[0074] (b) o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina K e o dito domínio de promoção de heterodímero da dita segunda cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina E.

[0075] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que a primeira ou a segunda cadeia de polipeptídeo adicionalmente compreende um domínio 3 que compreende um domínio CH2 e CH3 de um domínio Fc de imunoglobulina.

[0076] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende ainda uma terceira cadeia de polipeptídeo que compreende um domínio CH2 e CH3 de um domínio Fc de imunoglobulina.

[0077] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende ainda um domínio de

ligação CD8.

[0078] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal molécula de ligação DA x CD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende:

[0079] (I) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:179;

[0080] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:175; e

[0081] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[0082] (II) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:184;

[0083] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:181; e

[0084] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[0085] (III) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:196;

[0086] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:186; e

[0087] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[0088] (IV) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:197;

[0089] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:192; e

[0090] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[0091] (V) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:193;

[0092] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:194; e

[0093] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[0094] (VI) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:179;

[0095] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:175;

[0096] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[0097] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

[0098] (VII) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:184;

[0099] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:181;

[00100] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[00101] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

[00102] (VIII) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:196;

[00103] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:186;

[00104] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[00105] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

[00106] (IX) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:193;

[00107] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:194;

[00108] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[00109] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188.

[00110] A invenção adicionalmente se refere a uma composição farmacêutica que compreende qualquer uma dentre as moléculas de ligação DA x CD3 e um veículo farmaceuticamente aceitável descritos acima.

[00111] A invenção adicionalmente se refere a um método para o tratamento de uma doença, que compreende a administração a um indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer uma das moléculas de ligação DA x CD3 descritas acima ou a composição farmacêutica descrita acima.

[00112] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal método, em que a doença é câncer. Incluindo modalidades, em que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular, e câncer uterino.

[00113] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal método, em que a doença é uma doença associada a patógenos; incluindo modalidades, em que o antígeno associado ao patógeno é selecionado a partir do grupo que

consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

[00114] A invenção adicionalmente se refere ao uso de qualquer uma dentre as moléculas de ligação DA x CD3 descritas acima ou a composição farmacêutica descrita acima no tratamento de uma doença.

[00115] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal uso, em que a doença é câncer. Incluindo modalidades, em que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular, e câncer uterino.

[00116] A invenção adicionalmente se refere à modalidade de tal uso, em que a doença é uma doença associada a patógenos. Incluindo modalidades, em que o antígeno associado ao patógeno é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD,

vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00117] As Figuras 1A-1B fornecem esquemas de diacopos representativos ligados covalentemente, que têm dois domínios de ligação ao epítopo compostos por duas cadeias de polipeptídeo, sendo que cada uma tem um domínio de promoção de heterodímero da bobina E ou bobina K são apresentados a seguir domínios de promoção de heterodímero de bobina E ou bobina K (os domínios de promoção de heterodímero alternativos são fornecidos abaixo). Um resíduo de cisteína pode estar presente em um ligante (A Figura 1A) e/ou no domínio de promoção de heterodímero (A Figura 1B). Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[00118] A Figura 2 fornece um esquemático de uma molécula de diacorpo ligada covalentemente representativa que tem dois domínios de ligação de epítopo compostos por duas cadeias de polipeptídeo, cada uma com um domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas formam todo ou parte de um domínio Fc. Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[00119] As Figuras 3A-3C fornecem esquemas que mostra diacorpos tetravalentes representativos ligados

covalentemente que têm quatro domínios de ligação ao epítopo compostos por dois pares de cadeias de polipeptídeo (*isto é*, quatro cadeias de polipeptídeo no total). Um polipeptídeo de cada par possui um domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas formam todo ou parte de um domínio Fc. Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento. Os dois pares de cadeias de polipeptídeo podem ser os mesmos. Em tais modalidades, em que os dois pares de cadeias de polipeptídeo são os mesmos e os domínios VL e VH reconhecem epítopos diferentes (como mostrado nas Figuras 3A–3B), a molécula resultante possui quatro domínios de ligação ao epítopo e é biespecífica e bivalente em relação a cada epítopo ligado. Em tais modalidades, em que os domínios VL e VH reconhecem o mesmo epítopo (por exemplo, os mesmos CDRs de domínio VL e os mesmos CDRs de domínio VH são usados em ambas as cadeias), a molécula resultante possui quatro domínios de ligação a epítopo e é monoespecífica e tetravalente em relação a um único epítopo. Alternativamente, os dois pares de polipeptídeos podem ser diferentes. Em tais modalidades, em que os dois pares de cadeias de polipeptídeo são diferentes e os domínios VL e VH de cada par polipeptídico reconhecem epítopos diferentes (como mostrado pelos diferentes sombreamentos e padrões da Figura 3C), a molécula resultante possui quatro domínios de ligação ao epítopo e é específico e monovalente em relação a cada epítopo ligado. A Figura 3A mostra um diacorpo que contém Domínio Fc que contém um domínio de promoção de heterodímero de peptídeo que compreende um resíduo de cisteína. A Figura 3B mostra um diacorpo que contém Domínio Fc, que contém domínios de promoção de heterodímero de bobina E e bobina K que

compreende um resíduo de cisteína e um ligante (com um resíduo de cisteína opcional). A Figura 3C mostra um diacorpo que contém o domínio Fc, que contém os domínios CH1 e CL do anticorpo para promover a heterdimerização.

[00120] As Figuras 4A–4B fornecem esquemas de uma molécula de diacorpo ligada covalentemente representativa que tem dois domínios de ligação a epítopos compostos por três cadeias de polipeptídeo. Duas das cadeias de polipeptídeo possuem um domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas formam todo ou parte de um domínio Fc. As cadeias de polipeptídeo que compreendem o domínio VL e VH compreendem ainda um domínio de promoção de heterodímero. Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[00121] A Figura 5 fornece os esquemas de uma molécula de corpo do corpo ligada covalentemente representativa que tem quatro domínios de ligação ao epítopo compostos por cinco cadeias de polipeptídeo. Duas das cadeias de polipeptídeo possuem um domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas formam um domínio Fc que compreende todo ou parte de um domínio Fc. As cadeias de polipeptídeo que compreendem os domínios VL e VH ligados ainda compreendem um domínio de promoção de heterodímero. Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[00122] As Figuras 6A–6F fornecem esquemas de moléculas de ligação trivalentes que contém o domínio Fc representativas com três domínios de ligação ao epítopo. As Figuras 6A e 6B, respectivamente, ilustram esquematicamente os domínios de moléculas de ligação trivalentes que compreendem

dois domínios de ligação do tipo diacorpo e um domínio de ligação do tipo Fab com orientações de domínio diferentes nas quais os domínios de ligação do tipo diacorpo são terminal N ou terminal C para um domínio Fc. As moléculas nas Figuras 6A e 6B compreendem quatro cadeias. As Figuras 6C e 6D, respectivamente, ilustram esquematicamente os domínios de Moléculas de Ligação trivalentes que compreendem dois Domínios de Ligação do Tipo Diacorpo do terminal N a um Domínio Fc e um Domínio de Ligação do Tipo Fab no qual a Cadeia Leve e a Cadeia Pesada estão ligadas através de um polipeptídeo espaçador ou um domínio de ligação do tipo scFv. As Moléculas de Ligação trivalentes nas Figuras 6E e 6F, respectivamente, ilustram esquematicamente os domínios de Moléculas de Ligação trivalentes que compreendem dois Domínios de Ligação do Tipo Diacorpo do terminal C a um Domínio Fc e um Domínio de Ligação do Tipo Fab no qual a Cadeia Leve e a Cadeia Pesada estão ligadas através de um polipeptídeo espaçador ou um domínio de ligação do tipo scFv. As moléculas de ligação trivalentes nas Figuras 6C–6F compreendem três cadeias. Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítopo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreamento ou preenchimento.

[00123] A Figura 7A–7D mostra os resultados de CTL e ensaios de ligação. A Figura 7A mostra os resultados da morte celular redirecionada representativa (% de citotoxicidade em um ensaio CTL) mediada por construções de diacorpo do tipo DART-A que contém os domínios VL e VH CD3 mAb 1; CD3 mAb 1 M1; CD3 mAb 1 M2; CD3 mAb 1 M15; CD3 mAb 1 M17; CD3 mAb 1 M18; CD3 mAb 1 M19; e CD3 mAb 1 M20. As Figuras 7B–7C delineiam a correlação entre as constantes de afinidade (A Figura 7B: KD; a Figura 7C: ka; e a Figura 7D: kd) e atividade de CTL (EC_{50}

de citólise a 18 horas) relatada nas Tabelas 11-12.

[00124] A Figura 8A-8E mostra os resultados de estudos representativos de construções de diacorpos do tipo DART A mediadas por morte celular redirecionada (ensaio CTL) que contém os domínios VL e VH de CD3 mAb 1; CD3 mAb 1 M2; CD3 mAb 1 M7; CD3 mAb 1 M13; e CD3 mAb 1 M15; com uso de células efetoras Pan-T e células alvo de leucemia MV-4-11. A porcentagem de citotoxicidade é representada na Figura 8A. As respostas de citocinas são representadas nas Figuras 8B-8E (A Figura 8B: IFN-gama; a Figura 8C: TNF-alfa; a Figura 8D: IL-6; a Figura 8D: IL-2); NegCtrl: controle negativo.

[00125] A Figura 9A-9B mostra a capacidade dos diacorpos do tipo DART-B de se ligarem a antígenos de doenças. A Figura 9A mostra a capacidade dos diacorpos do tipo CD123-WT, CD123-M1, CD123-M2 e CD123-M18 DART-B de se ligarem a células MOLM-13 que expressam CD123. A Figura 9B mostra a capacidade dos diacorpos do tipo 5T4-WT, 5T4-M1, 5T4-M2 e 5T4-M18 DART-B de se ligarem a células A498 que expressam 5T4. A ligação foi detectada com uso de anticorpo biotinilado específico para as bobinas E/K dos diacorpos e estreptavidina-fitoeritrina (PE).

[00126] As Figuras 10A-10B mostram a capacidade dos diacorpos do tipo DART-B CD123-WT, CD123-M1, CD123-M2 e CD123-M18 de se ligarem às células T CD8+ (A Figura 10A) e às células T CD4+ (A Figura 10B).

[00127] As Figuras 11A-11Q mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada (ensaio CTL) mediados por construções de diacorpo do tipo B CD123 x CD3 DART B (que possui domínios Fc): CD123-WT (As Figuras 11B, 11F, 11J e 11N), CD123-M2 (As Figuras 11C, 11G,

11K e 11O), CD123-M18 (As Figuras 11D, 11H, 11L e 11P), HIV-WT (As Figuras 11E, 11I, 11M e 11Q), com uso de células efetoras Pan-T e células alvo de leucemia monocítica aguda (LMA) MOLM-13. A porcentagem de citotoxicidade é delineada na Figura 11A. As respostas de citocinas e a porcentagem de citotoxicidade são representadas nas Figuras 11B-11Q (As Figuras 11B-11E: IFN-gama; Figuras 11F a 11I: TNF-alfa; Figuras 11J a 11M: IL-6; Figuras 11N a 11Q: IL-2).

[00128] As Figuras 12A-12E mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada (ensaio CTL) mediados por construções de diacorpo do tipo B CD123 x CD3 DART B (que possui domínios Fc) com uso de células efetoras de PBMC e células alvo AML MOLM-13. A porcentagem de citotoxicidade está representada na Figura 12A (E:T=15:1, 24 h). As respostas de citocinas são representadas nas Figuras 12B-12E (A Figura 12B: IFN-gama; a Figura 12C: TNF-alfa; a Figura 12D: IL-6; a Figura 12E: IL-2).

[00129] As Figuras 13A-13Q mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada (ensaio CTL) mediados por construções de diacorpo do tipo B 5T4 x CD3 do tipo DART B (que possui domínios Fc) 5T4-WT (As Figuras 13B, 13F, 13J e 13N), 5T4- M2 (As Figuras 13C, 13G, 13K e 13O), 5T4-M18 (As Figuras 13D, 13H, 13L e 13P), HIV-WT (As Figuras 13E, 13I, 13M e 13Q), com uso de células efetoras Pan-T e células alvo de carcinoma de célula renal A498 (E:T = 5:1, 24 h). A citotoxicidade é representada na Figura 13A. As respostas de citocinas e a porcentagem de citotoxicidade são representadas nas Figuras 13B-13Q (As Figuras 13B-13E: IFN-gama; Figuras 13F a 13I: TNF-alfa; Figuras 13J a 13M: IL-6; Figuras 13N a 13Q: IL-2).

[00130] As Figuras 14A–14J mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada (ensaio CTL) mediados por construções de diacorpo do tipo B CD19 x CD3 DART B (possuindo domínios Fc) usando PBMCs (As Figuras 14A–14E) ou células efetoras Pan–T (As Figuras 14F–14J) (E:T= 30:1 para PBMCs e 10:1 para células Pan–T, 24 a 48 h). A porcentagem de citotoxicidade (48 horas) é representada nas Figuras 14A (PBMCs) e na Figura 14F (células Pan–T). As respostas de citocinas em 48 horas com uso de PBMCs são representadas nas Figuras 14B–14E (PBMCs) e nas Figuras 14G–14J (células T Pan) (As Figuras 14B e 14G: IFN–gama; Figuras 14C e 14H: TNF–alfa; Figuras 14D e 14I: IL–6; Figuras 14E e 14J: IL–2).

[00131] As Figuras 15A–15E mostram a capacidade de diacorpos representativos do tipo CD123 x CD3 DART–B para mediar a ativação de células T. A ativação das células T foi medida avaliando–se a capacidade dos diacorpos de afetar a expressão de CD25 e CD69. A porcentagem de citotoxicidade é representada na Figura 15A. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo–se CD25, está representada na Figura 15B. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo–se CD69, está representada na Figura 15C. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo–se CD25, está representada na Figura 15D. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo–se CD69, está representada na Figura 15E.

[00132] As Figuras 16A–16E mostram a capacidade de diacorpos representativos do tipo 5T4 x CD3 DART–B para mediar a ativação de células T. A ativação das células T foi medida avaliando–se a capacidade dos diacorpos de afetar a expressão

de CD25 e CD69. A porcentagem de citotoxicidade é representada na Figura 16A. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo-se CD25, está representada na Figura 16B. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo-se CD69, está representada na Figura 16C. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo-se CD25, está representada na Figura 16D. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo-se CD69, está representada na Figura 16E.

[00133] As Figuras 17A-17B mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre a capacidade de construções de diacorpo exemplificativas do tipo CD123 x CD3 DART B para mediar a redução de tumores *in vivo*. CD123-WT (50 µg/kg) ou CD123-M18 (a 5 µg/kg ou 50 µg/kg) foram fornecidos a camundongos que receberam as células KG1A e o volume do tumor foi avaliado em 35 dias. Figura 17A: CD4; a Figura 17B: CD8.

[00134] As Figuras 18A-18D mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre a capacidade de construções de diacorpo do tipo CD123 x CD3 DART B para mediar a redução de tumores *in vivo*. CD123-WT, CD123-M2 ou CD123-M18 (a 0,5, 5 50 ou 500 µg/kg) foram fornecidos a camundongos que receberam as células KG1A, e o volume do tumor foi avaliado em 35 dias. Figura 18A: CD123-WT; a Figura 18B: CD123-M2; a Figura 18C: CD123-M18; a Figura 18D: CD123-WT e CD123-M18 50 µg/kg e grupos de tratamento a 500 µg/kg.

[00135] As Figuras 19A-19D mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre a capacidade de construções de diacorpo do tipo CD123 x CD3 DART B para mediar a redução de tumores *in vivo*. CD123-WT, CD123-M2 ou CD123-M18 (a 0,5, 5 50 ou 500 µg/kg) foram fornecidos a camundongos que receberam as células MV4-11, e o volume do tumor foi avaliado em 35 dias.

Figura 19A: CD123-WT; a Figura 19B: CD123-M18; a Figura 19C: CD123-M2; a Figura 19D: Grupos de tratamento CD123-WT, CD123-M2 e CD123-M18 500 μg/kg.

[00136] As Figuras 20A-20B mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre a capacidade de construções de diacorpo do tipo 5T4 x CD3 DART B para mediar a redução de tumores *in vivo*. 5T4-WT (a 10, 50, 100 ou 500 μg/kg), 5T4-M18 (a 10, 50, 100 ou 500 μg/kg) ou 5T4-M2 (a 500 μg/kg) foram fornecidos aos camundongos que receberam as células SKOV3 e o volume do tumor foi avaliado em 45 dias. Figura 20A: 5T4-WT; a Figura 20B: 5T4-M18 e 5T4-M2.

[00137] As Figuras 21A-21D mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre o perfil de liberação de citocinas induzido por diacopos do tipo CD123 x CD3 DART B. Os níveis séricos de citocinas (pg/ml) foram avaliados seis horas após a administração de CD123-WT, CD123-M2 ou CD123-M18 (a 50 ou 500 μg/kg) em camundongos que receberam as células KG1A. A Figura 21A: IFN-γ, Figura 21B: TNF-α; a Figura 21C: IL-6; e a Figura 21D: IL-2.

[00138] As Figuras 22A-22C mostram a capacidade de moléculas do tipo TRIVALENTE CD123 x CD3 x CD8, T-CD123-WT, T-CD123-M1, T-CD123-M2 e T-CD123-M18, de se ligarem a antígenos da superfície celular. A Figura 22A: ligação a células MOLM-13 que expressam CD123; a Figura 22B: ligação a células T $CD4^+$; Figura 22C: ligação a células T $CD8^+$.

[00139] As Figuras 23A-23G mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada (ensaio CTL) mediados por moléculas do tipo TRIVALENTE T-CD123-WT, T-CD123-M1, T-CD123-M2 e T-CD123-M18 CD123 x CD3 x CD8 com uso de diferentes populações de células T. Porcentagem de

citotoxicidade com uso de células $CD3^+$ Pan-T (A Figura 23A); Células T $CD4^+$ (A Figura 23B) e células T $CD8^+$ (A Figura 23C). As respostas de citocinas com uso de células $CD3^+$ Pan-T são representadas nas Figuras 23D-23G. A Figura 23D: IFN-γ; a Figura 23E: TNF-α; a Figura 23F: IL-6; e a Figura 23G: IL-2.

[00140] As Figuras 24A-24J mostram os níveis séricos de citocinas, expressão de Ki67 e níveis de marcadores de patologia clínica observados em macacos cinomolgos tratados com CD123-M18 (10 mg/kg e 20 mg/kg) ou CD123-WT (0,003 mg/kg). Figura 24A: IFN-γ, Figura 24B: TNF-α; a Figura 24C: IL-6; a Figura 24D: IL-2; a Figura 24E: IL-15; a Figura 24F: Células T $CD4^+$ positivas para Ki67; a Figura 24G: Células T $CD8^+$ positivas para Ki67; a Figura 24H: plaquetas; a Figura 24I: Proteína C-reativa; a Figura 24J: nitrogênio de uréia no sangue.

[00141] As Figuras 25A-25G mostram os resultados de um estudo representativo da depleção de explosões de LMA mediado por DART-A-WT, CD123-WT, CD123-M1 e CD123-M18 em amostras de sangue periférico de um paciente com AML. A Figura 25A: Contagem de células blásticas AML 34^+ como porcentagem de controle; a Figura 25B: Expansão de células $CD4^+$; a Figura 25C: Expansão de células $CD8^+$; as Figuras 25D-G: Liberação de citocinas (A Figura 25D: IFN-γ; a Figura 25E: TNF-α; a Figura 25F: IL-6; e a Figura 25G: IL-2).

[00142] As Figuras 26A-26E mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada (ensaio CTL) mediados pelas construções do corpo do dia CD123 x CD3 CD123-WT, CD123-M1, CD123-M13, CD123-M17, CD123-M18 e CD123-M19 com uso de Células efetoras Pan-T e células alvo MOLM-13 AML (E:T= 15:1, 48 a 96 horas). A citotoxicidade em

função de % de LDH liberada está representada na Figura 26A. As respostas de citocinas são representadas nas Figuras 26B-26E (A Figura 26B: IFN-gama; a Figura 26C: TNF-alfa; a Figura 26D: IL-6; a Figura 26E: IL-2).

[00143] As Figuras 27A-27D apresentam os resultados cumulativos de 4 a 7 ensaios de morte celular redirecionada (ensaio CTL) e de liberação de citocinas mediados por diacorpo CD123 x CD3 constrói CD123-WT, CD123-M1, CD123-M13, CD123-M17, CD123-M18, CD123-M19 e DART-A-WT com uso de células efetoras Pan-T e células alvo MOLM-13 AML (E:T= 15:1, 48 a 96 horas). Os valores EC_{50} de atividade CTL em pM estão representados na Figura 27A. A atividade CTL como um múltiplo do valor EC_{50} de CD123-WT é representada na Figura 27B. A atividade CTL Emax como uma porcentagem de CD123-WT) está representada na Figura 27C. O índice terapêutico calculado (TI = E_{max} (CTL): E_{max} (citocina)) normalizada para CD123-WT está representada na Figura 27D.

[00144] As Figuras 28A-28B mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre a capacidade de construções de diacorpo CD123 x CD3 para mediar a redução de tumores *in vivo*. CD123-WT (0,5 mg/kg), CD123-M18 e CD123-M13 (a 0,005, 0,05 0,5 ou 1 mg/kg) foram fornecidos a camundongos que receberam células KG1A, e o volume do tumor foi avaliado em 42 dias. A Figura 28A: CD123-WT e CD123-M18. A Figura 28B: CD123-WT e CD123-M13.

[00145] As Figuras 29A-29B mostram os resultados de estudos *in vivo* sobre a capacidade de construções de diacorpo CD123 x CD3 para mediar a redução de tumores *in vivo*. CD123-WT (0,05 mg/kg), CD123-M18 e CD123-M17 (a 0,005, 0,05 0,5 ou 1 mg/kg) foram fornecidos a camundongos que receberam

células KG1A, e o volume do tumor foi avaliado em 42 dias. A Figura 29A: CD123-WT e CD123-M18. A Figura 29B: CD123-WT e CD123-M17.

[00146] As Figuras 30A-30B mostram os resultados de estudos *in vivo* no perfil de liberação de citocina interleucina-2 induzida por diacorpos do tipo CD123 x CD3 DART-B. Os níveis séricos de citocinas (pg/ml) foram avaliados seis horas após a administração de CD123-WT (0,5 mg/kg), CD123-M13, CD123-M17 ou CD123-M18 (a 0,05, 0,5 e 1 mg/kg) em camundongos que recebeu as células KG1A. A Figura 30A: CD123-WT, CD123-M13, e CD123-M18; e a Figura 30B: CD123-WT, CD123-M17 e CD123-M18.

[00147] As Figuras 31A-31F mostram os resultados de um estudo representativo de depleção autônoma de células B por CD19-WT, CD19.1-M18 e HIV-M18 de PBMCs de humanos e macacos cinomolgos. A depleção de células B $CD20^+$ é representada na Figura 31A (PBMCs humanas) e na Figura 31B (PBMCs de cito). A liberação de citocina a partir de PBMCs de humano tratadas está representada nas Figuras 31C-F (A Figura 31C: IFN-γ; a Figura 31D: TNF-α; a Figura 31E: IL-6; e a Figura 31F: IL-2).

[00148] As Figuras 32A-32D mostram a redução nos níveis de células B observadas no sangue periférico de macacos cinomolgos tratados com CD19.1-M18 (1 mg/kg e 10 mg/kg) ou CD123-WT (0,1 mg/kg). Os níveis de células B pré-determinados são mostrados na Figura 32A (a população de células B é indicada com um oval). Os níveis no dia 1, dia 8 e dia 15 são mostrados nas figuras 32B-32C, respectivamente.

[00149] As Figuras 33A-33C mostram a coloração imuno-histoquímica das células B nos linfonodos do pré-tratamento com macacos cinomolgos e no dia 7 após o tratamento

com o controle positivo CD19–WT (A Figura 33A: 0,1 mg/kg) ou a variante CD3 CD19.1–M18 (A Figura 33B: 10 mg/kg; e a Figura 33C: 30 mg/kg).

[00150] A Figura 34 mostra a redução nos níveis de células B observada no sangue periférico de macacos cinomolgos tratados com CD19.1–M13 (1 mg/kg), CD19.1–M17 (1 mg/kg) ou CD19–WT (0,1 mg/kg).

[00151] As Figuras 35A–35E mostram os níveis séricos de citocinas observados em macacos cinomolgos tratados com CD19.1–M13 (1 mg/kg), CD19.1–M17 (1 mg/kg) ou CD19–WT (0,1 mg/kg). A Figure 35A: TNF–α, a Figura 35B: IFN–γ; a Figura 35C: IL–2, a Figura 35D: IL–6; e a Figura 35E: IL–15.

[00152] As Figuras 36A–36B mostram a proliferação de células T observadas em macacos cinomolgos tratados com CD19.1–M13 (1 mg/kg), CD19.1–M17 (1 mg/kg) ou CD19–WT (0,1 mg/kg) A Figura 36A: Células T positivas para Ki67 células T $CD4^+$; A Figura 36B: Células T $CD8^+$ positivas para Ki67.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00153] A presente invenção é direcionada a moléculas de ligação multiespecíficas (*por exemplo*, um anticorpo biespecífico, um diacorpo, um scFv biespecífico, uma molécula trivalente, um TandAb®, um BiTE® *etc*.) que compreende um domínio de ligação CD3 cm capacidade de se ligar a um epítopo de CD3 e também um domínio de ligação ao antígeno de doença com capacidade de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença (“DA”) (*por exemplo*, uma “molécula de ligação DA x CD3”). A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação CD3 variante (“domínio de ligação vCD3”), que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2, um domínio CDR_H3, um domínio CDR_L1, um

domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3, pelo menos uma das quais difere em sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos do CDR correspondente de um domínio de ligação CD3 de referência (“domínio de ligação rCD3”), e em que a molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação vCD3 exibe uma afinidade alterada for CD3, em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 que exibe afinidade reduzida para CD3 e são capazes de mediar morte redirecionada de células alvo que expressa uma DA e exibe baixos níveis de liberação de citocina em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente ao uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 no tratamento de câncer e doenças associadas a patógenos. A presente invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que compreende tal molécula (ou moléculas).

[00154] Como indicado acima, as moléculas terapêuticas da presente invenção incluem particularmente moléculas de ligação biespecíficas que compreendem um domínio de ligação de epítopo com capacidade de se ligar imunoespecificamente a um epítopo de uma molécula de superfície celular de uma célula efetora e um domínio de ligação de epítopo que tem capacidade de se ligar imunoespecificamente a um epítopo de uma célula alvo que expressa um antígeno de doença. Conforme usado aqui, o termo "Antígeno de doença" (abreviado como "DA") denota um antígeno que é expresso na superfície de uma célula anormal ou infectada e que é

característico de tal anormalidade da infecção ou que é expresso na superfície da uma célula estranha e que é característica da qual compreende origem. Conforme usado no presente documento, uma célula que expressa um antígeno de doença em sua superfície celular e que pode, portanto, se tornar ligada pelas moléculas terapêuticas da presente invenção e, portanto, alvo de morte por essas moléculas terapêuticas é uma "célula alvo". De particular relevância para a presente invenção são os Antígenos de Doenças que são "Antígenos de Câncer" ou "Antígenos Associados a Patógenos".

I. ANTICORPOS E SEUS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO

[00155] As moléculas de ligação DA x CD3 da presente invenção podem ser anticorpos ou deriváveis de anticorpos (*por exemplo*, por fragmentação, clivagem *etc*. de polipeptídeos de anticorpo, ou do uso das sequências de aminoácidos de moléculas de anticorpo ou de polinucleotídeos (ou suas sequências) que codificam esses polinucleotídeos *etc*.).

[00156] Anticorpos são moléculas de imunoglobulina com capacidade de ligação específica a um domínio específico ou fração ou conformação (um "epítopo") de uma molécula, como carboidrato, polinucleotídeo, lipídio, polipeptídeo *etc*. Uma molécula que contém epítopo pode ter atividade imunogênica, como que provoca uma resposta de produção de anticorpos em um animal; essas moléculas são denominadas "antígenos". Conforme usado no presente documento, os termos "anticorpo" e "anticorpos" se referem a anticorpos monoclonais, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos sintéticos, anticorpos quiméricos, anticorpos policlonais, anticorpos camelizados, Fvs de cadeia única

(scFv), cadeia única anticorpos, fragmentos Fab, fragmentos F (ab'), Fvs biespecíficos ligados a dissulfeto (sdFv), intracorpos e domínios de ligação a epítopo de qualquer um dos acima. Em particular, o termo "anticorpo" inclui moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina, *isto é*, moléculas que contêm um domínio de ligação ao epítopo. As moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo, (*por exemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), class (*por exemplo*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) ou subclasse. Os anticorpos são capazes de "ligação imunoespecífica" a um polipeptídeo ou proteína ou molécula não protéica devido à presença nessa molécula de um domínio específico ou fração ou conformação (um "epítopo").

[00157] O termo "anticorpo monoclonal" se refere a uma população de anticorpos homogêneos em que o anticorpo monoclonal é composto de aminoácidos (de ocorrência natural ou não natural) que estão envolvidos na ligação seletiva de um antígeno. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único epítopo (ou local antigênico). O termo "anticorpo monoclonal" abrange não apenas anticorpos monoclonais intactos e anticorpos monoclonais completos, mas também fragmentos dos mesmos (como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, cadeia única (scFv), mutantes dos mesmos), proteínas de fusão que compreende uma porção de anticorpo, anticorpos monoclonais humanizados, anticorpos monoclonais quiméricos e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um local de reconhecimento de antígeno da especificidade necessária e a capacidade de se ligar a um antígeno. Não se pretende que seja limitado no que diz respeito à fonte do anticorpo ou à maneira

pela qual é produzido (*por exemplo*, por hibridoma, seleção de fagos, expressão recombinante, animais transgênicos *etc.*). O termo inclui imunoglobulinas completas, bem como os fragmentos *etc.* descritos acima sob a definição de "anticorpo". Os métodos de produção de anticorpos monoclonais são conhecidos na técnica. Um método que pode ser empregado é o método de Kohler, G. *et al.* (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*," Nature 256:495-497 ou uma modificação do mesmo. Normalmente, os anticorpos monoclonais são desenvolvidos em camundongos, ratos ou coelhos. Os anticorpos são produzidos imunizando um animal com uma quantidade imunogênica de células, extratos celulares ou preparações proteicas que contêm o epítopo desejado. O imunogênio pode ser, mas sem limitação, células primárias, linhas celulares cultivadas, células cancerígenas, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos ou tecido. As células usadas para imunização podem ser cultivadas por um período de tempo (*por exemplo*, pelo menos 24 horas) antes de serem usadas como imunógeno. As células podem ser usadas como imunógenos por si próprias ou em combinação com um adjuvante não desnaturante, como Ribi (consulte, *por exemplo*, Jennings, V.M. (1995) "*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*," ILAR J. 37(3):119-125). Em geral, as células devem ser mantidas intactas e de preferência viáveis quando usadas como imunógenos. As células intactas podem permitir que os antígenos sejam mais bem detectados do que as células rompidas pelo animal imunizado. O uso de adjuvantes desnaturantes ou agressivos, *por exemplo*, adjuvante de Freund, pode romper as células e, portanto, é desencorajado. O imunógeno pode ser administrado várias vezes em intervalos periódicos, como, bi

semanalmente ou semanalmente, ou pode ser administrado de maneira a manter a viabilidade no animal (*por exemplo*, em um tecido recombinante). Alternativamente, os anticorpos monoclonais existentes e quaisquer outros anticorpos equivalentes que sejam imunoespecíficos para um epítopo patogênico desejado podem ser sequenciados e produzidos de forma recombinante por qualquer meio conhecido na técnica. Em uma modalidade, esse anticorpo é sequenciado e a sequência polinucleotídica é então clonada em um vetor para expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida em um vetor em uma célula hospedeira e a célula hospedeira pode então ser expandida e congelada para uso futuro. A sequência de polinucleotídeos de tais anticorpos pode ser usada para manipulação genética para gerar as moléculas monoespecíficas ou multiespecíficas (*por exemplo*, biespecíficas, triespecíficas e tetraespecíficas) da invenção, bem como uma afinidade otimizada, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado e/ou um anticorpo caninizado, para melhorar a afinidade ou outras características do anticorpo, conforme detalhado abaixo.

[00158] As moléculas de ligação da presente invenção ligam epítopos através de seus domínios de ligação de uma maneira "imunoespecífica". Como usado presente documento, um anticorpo, diacorpo ou outra molécula de ligação ao epítopo é chamado "imunoespecificamente" se liga a uma região de outra molécula (*isto é*, um epítopo) se reagir ou se associar mais frequentemente, mais rapidamente, com maior duração e/ou com maior afinidade com esse epítopo em relação a epítopos alternativos. Por exemplo, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um epítopo viral é um anticorpo que se

liga a esse epítopo viral com maior afinidade, avidez, mais prontamente e/ou com maior duração do que se liga imunoespecificamente a outros epítopos virais ou epítopos não virais. Também é entendido lendo-se esta definição que, por exemplo, um anticorpo (ou fração ou epítopo) que se liga imunoespecificamente a um primeiro alvo pode ou não se ligar específica ou preferencialmente a um segundo alvo. Como tal, a "ligação imunoespecífica" não requer necessariamente (embora possa incluir) ligação exclusiva. Geralmente, mas não necessariamente, a referência no presente documento à ligação significa ligação "imunoespecífica".

[00159] As últimas décadas viram um renascimento do interesse no potencial terapêutico dos anticorpos, e os anticorpos se tornaram uma das principais classes de medicamentos derivados da biotecnologia (Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*," Singapore Med. J. 50(7):663-666). Mais de 200 medicamentos à base de anticorpos foram aprovados para uso ou estão em desenvolvimento.

[00160] Os anticorpos naturais (como os anticorpos IgG) são compostos por duas "cadeias leves" complexadas com duas "cadeias pesadas". Cada cadeia leve contém um domínio variável ("VL") e um domínio constante ("CL"). Cada cadeia pesada contém um domínio variável ("VH"), três domínios constantes ("CH1", "CH2" e "CH3") e uma região "de articulação" ("H") localizada entre os domínios CH1 e CH2. Em contraste, os scFvs são moléculas de cadeia única produzidas ligando-se os domínios variáveis das cadeias leve e pesada juntos por meio de um peptídeo de ligação curto.

[00161] A unidade estrutural básica de

imunoglobulinas que ocorrem naturalmente (*por exemplo*, IgG) é, portanto, um tetrâmero com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, geralmente expressas como uma glicoproteína de cerca de 150.000 Da. A porção amino-terminal ("terminal N") de cada cadeia inclui um domínio variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento de antígenos. A parte do terminal carboxila ("terminal C") de cada cadeia define uma região constante, com as cadeias leves com um único domínio constante e as cadeias pesadas geralmente com três domínios constantes e um domínio de articulação. Assim, a estrutura das cadeias leves de uma molécula de IgG é n-VL-CL-c e a estrutura das cadeias pesadas de IgG é n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (em que n e c representam, respectivamente, o terminal N e o terminal C do polipeptídeo). A capacidade de um anticorpo intacto e não modificado (*por exemplo*, um anticorpo IgG) para se ligar a um epítopo de um antígeno depende da presença e sequências dos domínios variáveis. A menos que especificamente indicado, a ordem dos domínios das moléculas de proteína no presente documento descritas está na direção "terminal N para terminal C".

A. CARACTERÍSTICAS DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS DE ANTICORPOS

[00162] Os domínios variáveisde uma molécula de IgG consistem em três regiões determinantes de complementaridade ("CDR"), que contêm os resíduos de aminoácidos do anticorpo que estarão em contato com o epítopo e quatro segmentos não CDR intervenientes, chamado de regiões de estrutura ("FR"), que separam os segmentos de CDR e que, em geral, mantêm a estrutura e determinam o posicionamento dos resíduos de CDR, de modo a permitir que entrem em contato com

o epítopo (embora certos resíduos de estrutura também possam desempenhar um papel nesse contato). Assim, os domínios VL e VH têm a estrutura n–FR1–CDR1–FR2–CDR2–FR3–CDR3–FR4–c, em que n e c representam respectivamente a extremidade do terminal N e a extremidade do terminal C dos domínios. As sequências de aminoácidos dos CDRs determinam se um anticorpo terá capacidade de se ligar a um epítopo específico.

[00163] Os aminoácidos dos domínios variáveis das cadeias pesadas e leves maduras de imunoglobulinas são designados pela posição de um aminoácido na cadeia. Kabat *et al.* (SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DE INTERESSE IMUNOLÓGICO, 5ª ed. O Serviço de Saúde Pública, NH1, MD (1991) ("Kabat"), expressamente incorporado no presente documento por referência), descreveu várias sequências de aminoácidos para anticorpos, identificou uma sequência de consenso de aminoácidos para cada subgrupo e atribuiu um número de resíduo a cada aminoácido. As CDRs são identificadas como definidas por Kabat (será entendido que CDR_H1 como definido por Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*," J. Mol. Biol. 196: 901–917) começa cinco resíduos anteriormente). O esquema de numeração de Kabat é extensível a anticorpos não incluídos em seu compêndio, alinhando-se o anticorpo em questão com uma das sequências de consenso em Kabat por referência a aminoácidos conservados. Este método para atribuir números de resíduos se tornou padrão no campo e identifica prontamente aminoácidos em posições equivalentes em diferentes anticorpos, incluindo variantes quiméricas ou humanizadas. Por exemplo, um aminoácido na posição 50 de uma cadeia leve de anticorpo humano ocupa a posição equivalente a um aminoácido na posição 50 de uma cadeia

leve de anticorpo de camundongo.

[00164] Os polipeptídeos que são (ou podem servir como) o primeiro, segundo e terceiro CDR da cadeia leve de um anticorpo são no presente documento respectivamente designados como: Domínio CDR_L1, Domínio CDR_L2 e Domínio CDR_L3. De modo similar, polipeptídeos que são (ou podem servir como) o primeiro, segundo e terceiro CDR da cadeia pesada de um anticorpo são no presente documento respectivamente designados como: Domínio CDR_H1, Domínio CDR_H2 e Domínio CDR_H3. Assim, os termos domínio CDR_L1, domínio CDR_L2, domínio CDR_L3, domínio CDR_H1, domínio CDR_H2 e domínio CDR_H3 são direcionados a polipeptídeos que, quando incorporados a uma proteína, fazem com que essa proteína tenha capacidade de se ligar a um epítopo específico, independentemente de tal proteína ser um anticorpo com cadeias leves e pesadas ou é um diacorpo ou uma molécula de ligação de cadeia única (*por exemplo*, um scFv, um BiTe *etc.*) ou é outro tipo de proteína. Consequentemente, como usado no presente documento, o termo "Domínio de Ligação ao Epítopo" denota um domínio que compreende um fragmento ou porção de uma molécula de ligação (ou um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de tal fragmento ou porção) que contribui para a capacidade da molécula de ligação para se ligar imunoespecificamente a um epítopo. Um domínio de ligação ao epítopo pode conter 1, 2, 3, 4 ou 5 os domínios CDR de um anticorpo ou pode conter todos os 6 domínios da CDR de um anticorpo e, embora capaz de se ligar imunoespecificamente a esse epítopo, pode exibir um imunoespecificidade, afinidade ou seletividade em relação a esse epítopo que difere daquele de tal anticorpo. Um domínio de ligação ao epítopo pode conter apenas parte de um CDR, a saber, o subconjunto de resíduos de

CDR necessários para a ligação (denominado "Resíduos Determinantes da Especificidade" ou "SDRs;" Kim, J.H. *et al.* (2012) "*Humanization By CDR Grafting And Specificity-Determining Residue Grafting*," Methods Mol. Biol. 907:237-245; Kim, K.S. *et al.* (2010) "*Construction Of A Humanized Antibody To Hepatitis B Surface Antigen By Specificity-Determining Residues (SDR)-Grafting And De-Immunization*," Biochem. Biophys. Res. Commun. 396(2):231-237; Kashmiri, S.V. *et al.* (2005) "*SDR Grafting - A New Approach To Antibody Humanization*," Methods 36(1):25-34; Gonzales, N.R. *et al.* (2004) "*SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity*," Mol. Immunol. 41:863-872). Preferencialmente, no entanto, um Domínio de Ligação ao Epítopo conterá todos os 6 dos Domínios CDR de tal anticorpo. Um domínio de ligação ao epítopo de um anticorpo pode ser uma única cadeia de polipeptídeo (*por exemplo*, um scFv), ou pode compreender duas ou mais cadeias de polipeptídeo, sendo que cada uma tem um terminal amino e um terminal carboxila (*por exemplo*, um diacorpo, um fragmento Fab, um Fragmento Fab_2, *etc*.).

[00165] A invenção também abrange particularmente moléculas de ligação que compreendem um domínio VL e/ou VH de um anticorpo humanizado. O termo "anticorpo humanizado" se refere a uma molécula quimérica, geralmente preparada com uso de técnicas recombinantes, que tem um domínio de ligação ao epítopo de uma imunoglobulina de uma espécie não humana e uma estrutura de imunoglobulina remanescente da molécula que tem por base a estrutura e/ou sequência de uma imunoglobulina humana. A sequência polinucleotídica dos Domínios Variáveis de tais anticorpos pode ser usada para manipulação genética para

gerar tais derivados e para melhorar a afinidade, ou outras características de tais anticorpos. O princípio geral na humanização de um anticorpo envolve a retenção da sequência básica do Domínio de Ligação ao Epítopo do anticorpo, enquanto troca o restante não humano do anticorpo por sequências de anticorpos humanos. Existem quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. Esses são: (1) determinar o nucleotídeo e a sequência de aminoácidos prevista dos Domínios Variáveis leves e pesados do anticorpo de partida (2) projetar o anticorpo humanizado ou anticorpo caninizado, *isto é*, decidir qual região de estrutura do anticorpo usar durante o processo de humanização ou canonização (3) o metodologias/técnicas de humanização ou caninização reais e (4) a transfecção e expressão do anticorpo humanizado. Consulte, por exemplo, as Patentes números U.S. 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; e 6.331.415.

[00166] O Domínio de Ligação ao Epítopo pode compreender um Domínio Variável completo fundido em Domínios Constantes ou apenas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de tal Domínio Variável enxertado em regiões estruturais apropriadas. Os domínios de ligação ao epítopo podem ser de tipo selvagem ou modificados por uma ou mais substituições de aminoácidos. Isso elimina a região constante como um imunógeno em indivíduos humanos, mas a possibilidade de uma resposta imune ao domínio variável estranho permanece (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) **"***Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*,**"** Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 86:4220-4224). Outra abordagem se concentra não apenas em fornecer regiões constantes derivadas de humanos, mas modificar os Domínios

Variáveis, bem como remodelar os mesmos o mais próximo possível da forma humana. É conhecido que os domínios variáveisde ambas as cadeias pesadas e leves contêm três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que variam em resposta aos antígenos em questão e determinam a capacidade de ligação, flanqueada por quatro regiões estruturais (FRs) que são relativamente conservadas em uma determinada espécie e que supostamente fornecem uma estrutura para os CDRs. Quando os anticorpos não humanos são preparados com relação a um antígeno particular, os Domínios Variáveis podem ser "remodelados" ou "humanizados" enxertando-se CDRs derivados de anticorpos não humanos nos FRs presentes no anticorpo humano a ser modificado. A aplicação dessa abordagem a vários anticorpos foi relatada por Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851–856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323–327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534–1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*," Protein Engineering 4:773–3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*," Human Antibodies Hybridoma 2:124–134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 88:4181–4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*," Bio/Technology 9:266–271; Co, M. S. *et al.* (1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 88:2869–2873; Carter, P. *et al.* (1992) "*Humanization Of An*

Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 89:4285-4289; and Co, M.S. *et al.* (1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*," J. Immunol. 148:1149-1154. Em algumas modalidades, os anticorpos humanizados preservam todas as sequências de CDR (por exemplo, um anticorpo de camundongo humanizado que contém todas os seis CDRs dos anticorpos de camundongo). Em outras modalidades, os anticorpos humanizados têm um ou mais CDRs (um, dois, três, quatro, cinco ou seis) que diferem na sequência em relação ao anticorpo original.

[00167] Uma série de moléculas de anticorpo humanizado que compreende um Domínio de ligação ao epítopo derivado de uma imunoglobulina não humana foram descritas, incluindo anticorpos quiméricos com domínio variável de roedor ou roedor modificado e suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) associadas fundidas a domínios constantes humanos (consulte, por exemplo, Winter *et al.* (1991) "*Man-made Antibodies*," Nature 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* (1987) "*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*," J. Immunol. 138:4534-4538, e Brown *et al.* (1987) "*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody*," Cancer Res. 47:3577-3583). Outras referências descrevem CDRs de roedores enxertados em uma região estrutural de suporte humano (FR) antes da fusão com um Domínio Constante de anticorpo humano apropriado (consulte, por exemplo, Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327;

Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536; e Jones *et al.* (1986) "*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*," Nature 321:522-525). Outra referência descreve CDRs roedores sustentados por regiões de framework de roedor recombinantemente revestidas. Consulte, por exemplo, Publicação de Patente Europeia número 519.596. Essas moléculas "humanizadas" são projetadas para minimizar a resposta imunológica indesejada para moléculas de anticorpos anti-humanos de roedores, o que limita a duração e a eficácia das aplicações terapêuticas dessas porções em receptores humanos. Outros métodos de humanização de anticorpos que também podem ser utilizados são divulgados por Daugherty *et al.* (1991) "*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 e nas Patentes número U.S. 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; e 5.866.692.

B. CARACTERÍSTICAS DAS REGIÕES CONSTANTES DE ANTICORPOS

[00168] Ao longo da presente especificação, a numeração dos resíduos na região constante de uma IgG é a do índice EU como em Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), expressamente incorporado no presente documento por referência. O termo "índice EU como em Kabat" se refere à numeração dos Domínios Constantes do anticorpo IgG1 EU humano.

[00169] Polimorfismos foram observados em uma série de posições diferentes dentro de regiões constantes de

anticorpos (*por exemplo*, posições Fc, incluindo, mas sem limitação às posições 270, 272, 312, 315, 356 e 358, numeradas pelo índice EU conforme estabelecido em Kabat), e assim podem existir pequenas diferenças entre a sequência apresentada e as sequências na técnica anterior. As formas polimórficas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas. Atualmente, 18 alotipos de cadeia pesada ("alotipos Gm") são conhecidos: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, "*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.*" Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). É especificamente contemplado que os anticorpos da presente invenção podem incorporar qualquer alótipo, isoalótipo ou haplótipo de qualquer gene de imunoglobulina e não estão limitados ao alótipo, isoalótipo ou haplótipo das sequências fornecidas no presente documento. Além disso, em alguns sistemas de expressão, o resíduo de aminoácido terminal C (em negrito acima) do domínio CH3 pode ser removido pós-traducionalmente. Consequentemente, o resíduo terminal-C do domínio CH3 é um resíduo de aminoácido opcional nas moléculas de ligação da invenção. Especificamente abrangidos pela presente invenção estão as moléculas de ligação sem o resíduo terminal-C do domínio CH3. Também especificamente englobados pela presente invenção estão essas construções que compreendem o resíduo de lisina terminal C do domínio CH3.

1. REGIÕES CONSTANTES DA CADEIA PESADA

[00170] Os domínios CH1 das duas cadeias pesadas de um complexo de anticorpo com a região constante "CL" da

cadeia leve do anticorpo e estão ligados aos domínios CH2 das cadeias pesadas através de um domínio de articulação interveniente.

[00171] Um exemplo de Domínio CH1 é um Domínio CH1 de IgG1 humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG1 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:1):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

[00172] Um exemplo de Domínio CH1 é um Domínio CH1 de IgG2 humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG2 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:2):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

[00173] Um exemplo de Domínio CH1 é um Domínio CH1 de IgG3 humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG3 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:3):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV

[00174] Um exemplo de Domínio CH1 é um Domínio CH1 de IgG4 humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG4 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:4):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

[00175] Um exemplo de Domínio de Articulação é um Domínio de articulação de IgG1 humana. A sequência de aminoácidos de um domínio de articulação de IgG1 humano

exemplificativo é (SEQ ID NO: 5): EPKSCDKTHTCPPCP.

[00176] Outro exemplo de domínio de articulação é um domínio de articulação de IgG2 humano. A sequência de aminoácidos de um domínio de articulação de IgG2 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:6): ERKCCVECPPCP.

[00177] Outro exemplo de domínio de articulação é um domínio de articulação de IgG3 humano. A sequência de aminoácidos de um domínio de articulação de IgG2 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:7):

ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK SCDTPPPCPR CP

[00178] Outro exemplo de domínio de articulação é um domínio de articulação de IgG4 humano. A sequência de aminoácidos de um domínio de articulação de IgG4 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:8): ESKYGPPCPSCP. Conforme descrito no presente documento, um Domínio de articulação de IgG4 pode compreender uma mutação de estabilização, como a substituição S228P. A sequência de aminoácidos de um domínio de articulação de IgG4 humano estabilizado com S228P exemplificativo é (SEQ ID NO:9): ESKYGPPCPPCP.

[00179] Os domínios CH2 e CH3 das duas cadeias pesadas de um anticorpo IgG interagem para formar um "Domínio Fc" de anticorpos IgG que é reconhecido pelos Receptores Fc celulares, incluindo, mas sem limitação a Receptores Fc gama (FcγRs). Conforme usado no presente documento, o termo "Domínio Fc" é usado para definir uma região terminal C de uma Cadeia Pesada de IgG. Diz-se que um domínio Fc é de um isótipo, classe ou subclasse de IgG particular se a sua sequência de aminoácidos for mais homóloga a esse isótipo em relação a outros isótipos de IgG. Além de seus usos conhecidos em

diagnósticos, os anticorpos mostraram ser úteis como agentes terapêuticos.

[00180] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG1 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:10):

```
231       240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

          290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340         350         360         370         380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

           440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

[00181] conforme numerado pelo índice EU conforme estabelecido em Kabat, em que X é lisina (K) ou está ausente.

[00182] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG2 humana exemplificativo é (SEQ ID NO:11):

```
231       240         250         260         270         280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

          290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

          340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

          390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

          440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

[00183] conforme numerado pelo índice EU conforme

estabelecido em Kabat, em que X é lisina (K) ou está ausente.

[00184] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG3 humana exemplificativo é (SEQ ID NO:12):

```
231       240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

          290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390         400         410         420         430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

          440     447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

[00185] conforme numerado pelo índice EU conforme estabelecido em Kabat, em que X é lisina (K) ou está ausente.

[00186] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG4 humano exemplificativo é (SEQ ID NO:13):

```
231       240         250         260         270         280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

          290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

          340         350         360         370         380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

          440     447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

[00187] conforme numerado pelo índice EU conforme estabelecido em Kabat, em que X é lisina (K) ou está ausente.

2. REGIÕES CONSTANTES DA CADEIA LEVE

[00188] Conforme indicado acima, cada cadeia leve de um anticorpo contém um domínio variável ("VL") e um domínio constante ("CL").

[00189] Um domínio CL preferido é um domínio IgG CL Kappa humano. A sequência de aminoácidos de um domínio CL Kappa humano exemplificativo é (SEQ ID NO:14):

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

[00190] Alternativamente, um exemplo de Domínio CL é um Domínio IgG CL Lambda humano. A sequência de aminoácidos de um Domínio Lambda CL humano exemplificativo é (SEQ ID NO:15):

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

II. MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO MULTISPECÍFICAS

[00191] A capacidade de um anticorpo se ligar a um epítopo de um antígeno depende da presença e da sequência de aminoácidos dos domínios VL e VH do anticorpo. A interação da cadeia leve e da cadeia pesada de um anticorpo e, em particular, a interação de seus domínios VL e VH forma um dos dois domínios de ligação ao epítopo de um anticorpo natural, como um IgG. Os anticorpos naturais são capazes de se ligar a apenas uma espécie de epítopo (*isto é*, eles são monoespecíficos), embora possam se ligar a múltiplas cópias dessa espécie (*isto é*, exibindo bivalência ou multivalência).

[00192] A funcionalidade dos anticorpos pode ser aumentada gerando-se moléculas com base em anticorpos

multiespecíficos que podem ligar simultaneamente dois antígenos separados e distintos (ou diferentes epítopos do mesmo antígeno) e/ou gerando-se moléculas com base em anticorpos com maior valência (*isto é.*, mais de dois Domínios de ligação a epítopo) para o mesmo epítopo e/ou antígeno.

[00193] Para fornecer moléculas com maior capacidade do que anticorpos naturais, uma ampla variedade de formatos de anticorpos biespecíficos recombinantes foram desenvolvidos (consulte, *por exemplo*, Publicações PCT números WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), a maioria dos quais usa peptídeos ligantes para fundir um outro domínio de ligação ao epítopo (*por exemplo*, um scFv, VL, VH *etc.*) para, ou dentro do núcleo do anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM), ou para fundir múltiplos domínios de ligação ao epítopo (*por exemplo*, dois fragmentos Fab ou scFvs). Formatos alternativos usam peptídeos de ligação para fundir Domínios de Ligação de Epítopo (*por exemplo*, um scFv, VL, VH *etc.*) a um domínio de dimerização, como o Domínio CH2-CH3 ou polipeptídeos alternativos (WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2006/107617, WO 2007/046893). Publicações PCT números WO 2013/174873, WO 2011/133886 e WO 2010/136172 revelam um anticorpo triespecífico no qual os Domínios CL e CH1 são trocados de suas respectivas posições naturais e os Domínios VL e VH foram diversificados (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitir que se liguem a mais de um antígeno. Publicações PCT números WO 2013/163427 e WO 2013/119903 revelam a modificação do Domínio CH2 para conter um aduto de proteína de fusão que compreende um domínio de ligação. Publicações PCT números WO 2010/028797, WO2010028796 e WO 2010/028795 revelam anticorpos

recombinantes cujos Domínios Fc foram substituídos por Domínios VL e VH adicionais, de modo a formar Moléculas de Ligação trivalentes. Publicações PCT números WO 2003/025018 e WO2003012069 revelam diacorpos recombinantes cujas cadeias individuais contêm domínios scFv. Publicação PCT número WO 2013/006544 revela moléculas Fab multivalentes que são sintetizadas como uma única cadeia de polipeptídeo e depois submetidas a proteólise para produzir estruturas heterodiméricas. Publicações PCT números WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 e WO 1991/003493 revelam a adição de domínios de ligação adicionais ou grupos funcionais a um anticorpo ou uma porção de anticorpo (*por exemplo*, adicionar um diacorpo à cadeia leve do anticorpo, ou adicionar domínios VL e VH adicionais às cadeias leve e pesada do anticorpo, ou adicionar uma proteína de fusão heteróloga ou encadear múltiplos Domínios Fab uns aos outros).

[00194] Adicionalmente foi observado na técnica a capacidade de produzir diacorpos que diferem de tais anticorpos naturais em serem capazes de se ligar a duas ou mais espécies de epítopos diferentes (*isto é*, exibindo biespecificidade ou multiespecificidade além de, ou em troca de, bivalência ou multivalência) (consulte, *por exemplo*, Holliger *et al.* (1993) "'*Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) "*umi Fully Human Recombinant IgG-Like anticorpo biespecífico To Both The Epidermal Growth fator*

Receptor e The Insulin-Like Growth fator Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) "*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano *et al.* (2004) "*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) "*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[00195] Em particular, diacorpos heterodiméricos não monoespecíficos estáveis, covalentemente ligados, denominados diacorpos DART® foram desenvolvidos; consulte, *por exemplo*, Sloan, D.D. *et al.* (2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*," PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. *et al.* (2015) "*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform*," Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. *et al.* (2015) "*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates*," Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. *et al.* (2011)

"*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*," Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. *et al.* (2010) "*Therapeutic Control Of B-Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. *et al.* (2010) "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*," J. Mol. Biol. 399(3):436-449); Patente números US 8.044.180; 8.133.982; 8.187.593; 8.193.318; 8.530.627; 8.669.349; 8.778.339; 8.784.808; 8.795.667; 8.802.091; 8.802.093; 8.946.387; 8.968.730; e 8.993.730; Publicação de Patente números US 2009/0060910; 2010/0174053; 2011/0081347; 2011/0097323; 2011/0117089; 2012/0009186; 2012/0034221; 2012/0141476; 2012/0294796; 2013/0149236; 2013/0295121; 2014/0017237; e 2014/0099318; Documentos de Patente Européia números EP 1868650; EP 2158221; EP 2247304; EP 2252631; EP 2282770; EP 2328934; EP 2376109; EP 2542256; EP 2601216; EP 2714079; EP 2714733; EP 2786762; EP 2839842; EP 2840091; e Publicações PCT números WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/027797; WO 2010/033279; WO 2010/080538; WO 2011/109400; WO 2012/018687; WO 2012/162067; WO 2012/162068; WO 2014/159940; WO 2015/021089; WO 2015/026892; e WO 2015/026894). Esses diacorpos compreendem dois ou mais polipeptídeos covalentemente complexados e envolvem a manipulação de um ou mais resíduos de cisteína em cada uma das espécies polipeptídicas empregadas que permitem que ligações dissulfeto se formem e, assim, liguem covalentemente um ou mais pares de tais cadeias de polipeptídeo entre si. Por

exemplo, a adição de um resíduo de cisteína ao terminal C de tais construtos mostrou permitir a ligação dissulfeto entre as cadeias de polipeptídeo envolvidas, estabilizando o diacorpo resultante sem interferir com as características de ligação do diacorpo.

[00196] O diacorpo DART® mais simples compreende duas cadeias de polipeptídeo, sendo que cada uma compreende três domínios (Figuras 1A-1B). A primeira cadeia de polipeptídeo compreende: (i) um domínio que compreende um domínio de ligação ao epítopo de um domínio variável de cadeia leve de uma primeira imunoglobulina (VL1), (ii) um segundo domínio que compreende um domínio de ligação ao epítopo de um domínio variável de cadeia pesada de uma segunda imunoglobulina (VH2), e (iii) um terceiro domínio que serve para promover a heterodimerização (um "domínio de promoção de heterodímero") com a segunda cadeia de polipeptídeo e para ligar covalentemente o primeiro polipeptídeo à segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo. A segunda cadeia de polipeptídeo contém um primeiro domínio complementar (um domínio VL2), um segundo domínio complementar (um domínio VH1) e um terceiro domínio que se complexifica com o terceiro domínio da primeira cadeia de polipeptídeo para promover a heterodimerização (um "domínio de promoção de heterodímero ”) e ligação covalente com a primeira cadeia de polipeptídeo. Essas moléculas são estáveis, potentes e têm a capacidade de se ligar simultaneamente a dois ou mais antígenos. Em uma modalidade, o Terceiro Domínio da primeira e segunda cadeias de polipeptídeo, cada um contém um resíduo de cisteína (denotado como "©" nas Figuras), que serve para ligar os polipeptídeos juntos por meio de uma ligação de dissulfeto covalente. O

terceiro domínio de uma ou ambas as cadeias de polipeptídeo pode possuir adicionalmente a sequência de um domínio CH2-CH3, de modo que a complexação de um polipeptídeo diacorpo com outro polipeptídeo diacorpo forme um domínio Fc. Esses Domínios Fc podem servir para alterar a meia-vida biológica do diacorpo, diminuir sua imunogenicidade e/ou ter capacidade de se ligar a um Receptor Fc de células (como linfócitos B, células dendríticas, células assassinas naturais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos) para aumentar ou inibir a função efetora. Muitas variações de tais moléculas foram descritas (consulte, *por exemplo*, Publicação de Patente números US 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053; 2009/0060910; 2007/0004909; Publicação de Patente Europeia números EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221; EP 1868650; e Publicações PCT números WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665) e são fornecidos no presente documento.

[00197] Recentemente, estruturas trivalentes que incorporam dois Domínios de ligação do tipo diacorpo e um domínio do tipo não diacorpo e um domínio Fc foram descritas (consulte, *por exemplo*, Publicações PCT números WO 2015/184207 e WO 2015/184203). Tais moléculas de ligação trivalentes podem ser utilizadas para gerar moléculas monoespecíficas, biespecíficas ou triespecíficas, conforme fornecido em mais detalhes abaixo. A capacidade de ligar três epítopos diferentes fornece capacidades aprimoradas.

[00198] Construções alternativas são conhecidas na técnica para aplicações em que uma molécula biespecífica ou tetravalente é desejável, mas um Fc não é necessário incluindo,

mas sem limitação, moléculas Engager de células T biespecíficas, também chamadas de "BiTEs" (consulte, *por exemplo*, PCT Publicação números: WO 1993/11161; e WO 2004/106381) e anticorpos tetravalentes em tandem, também chamados de "TandAbs" (consulte, *por exemplo*, Publicação de Patente número: US 2011-0206672; Publicação de Patente Europeia número EP 2371866, e; Publicações PCT números WO 1999/057150, WO 2003/025018 e WO 2013/013700). BiTEs são formados a partir de uma única cadeia de polipeptídeo que compreende scFvs ligados em tandem, enquanto os TandAbs são formados pela homodimerização de duas cadeias de polipeptídeo idênticas, sendo que cada uma possui um domínio VH1, VL2, VH2 e VL2.

[00199] A capacidade de produzir moléculas de ligação multiespecíficas (*por exemplo*, anticorpos biespecíficos, diacorpos biespecíficos, moléculas trivalentes, *etc*.) levou ao seu uso (em "trans") para coligar duas células, por exemplo, coligando-se receptores que estão presentes na superfície de diferentes células (*por exemplo*, reticulação de células T citotóxicas com células-alvo, como células cancerosas ou células infectadas por patógenos, que expressam um Antígeno de Doença) (Staerz *et al.* (1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,*" Nature 314:628-631, and Holliger *et al.* (1996) "*Specific Killing Of* Lymphoma *Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,*" Protein Eng. 9:299-305; Marvin *et al.* (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658; Sloan *et al.* (2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*,"

PLoS Pathog 11(11): e1005233. doi:10.1371/journal.ppat.1005233)). Alternativamente (ou adicionalmente), moléculas multiespecíficas podem ser usadas (em "cis") para coligar moléculas, tais como receptores etc., que estão presentes na superfície da mesma célula. A coligação de diferentes células e/ou receptores é útil para modular funções efetoras e/ou sinalização de células imunes. Moléculas multiespecíficas (*por exemplo*, diacorpos biespecíficos) que compreende Domínios de Ligação ao Epítopo podem ser direcionadas a um determinante de superfície de qualquer célula imune, como CD2, CD3, CD8, CD16, TCR, o Natural Killer Grupo 2, Receptor Membro D (NKG2D) *etc.*, que são expressos em linfócitos T, células Natural Killer (NK), células que apresentam antígeno ou outras células mononucleares. Em particular, os Domínios de Ligação a Epítopo dirigidos a um receptor de superfície celular que está presente em células efetoras imunes, são úteis na geração de Moléculas de Ligação multiespecíficas capazes de mediar a morte celular redirecionada.

[00200] A presente invenção fornece moléculas de ligação que são capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo (*por exemplo*, uma célula cancerosa ou uma célula infectada por patógeno etc.) que expressam um Antígeno de Doença ("DA"). Essas moléculas de ligação são capazes de se ligar a um "primeiro epítopo" e um "segundo epítopo", em que um desses epítopos é um epítopo de CD3 e o outro de tais epítopos é um epítopo de um antígeno de doença. É irrelevante se um determinado epítopo é designado como o primeiro contra o segundo epítopo; sendo que tal notação tem relevância apenas no que diz respeito à presença e orientação dos domínios das

cadeias de polipeptídeo das Moléculas de Ligação da presente invenção. Assim, as moléculas biespecíficas da presente invenção compreendem domínios "VL_{CD3}"/"VH_{CD3}" que são capazes de se ligar a um epítopo de CD3 e domínios "VL_{DA}"/"VH_{DA}" que são capazes de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença. A presente invenção em particular abrange diacorpos biespecíficos, scFvs biespecíficos, BiTEs, anticorpos, TandAbs e moléculas de ligação trivalentes produzidas com uso de qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento.

A. DIACORPOS BISPECÍFICOS COM FALTA DE DOMÍNIOS FC

[00201] Em uma modalidade, a molécula de ligação DA x CD3 da invenção são diacorpos biespecíficos e compreendem domínios capazes de se ligar a um primeiro e um segundo epítopo, mas não terão um domínio Fc e, portanto, não serão capazes de se ligar a moléculas FcγR por meio de um Interação Fc–FcγR. A primeira cadeia de polipeptídeo de tal modalidade de diacorpos biespecíficos compreende, na direção terminal N para terminal C: um terminal N, o domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar ao primeiro ou ao segundo epítopo (*isto é*, tanto VL_{CD3} quanto VL_{DA}), um primeiro peptídeo espaçador interveniente (Ligante 1), um Domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar ao epítopo do Antígeno da Doença (se essa primeira cadeia de polipeptídeo contiver VL_{CD3}) ou um Domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar CD3 (se tal primeira cadeia de polipeptídeo contiver VL_{DA}), um segundo peptídeo espaçador intermediário (Ligante 2) que contém opcionalmente um resíduo de cisteína, um domínio de promoção de heterodímero e um terminal C (Figuras 1A–1B).

[00202] A segunda cadeia de polipeptídeo dessa modalidade de diacorpos biespecíficos compreende, na direção

do terminal N para o terminal C: um terminal N, o domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar ao primeiro ou segundo epítopo (*isto é*, VL_{CD3} ou VL_{DA}, e sendo o domínio VL não selecionado para inclusão na primeira cadeia de polipeptídeo do diacorpo), um peptídeo espaçador intermediário (Ligante 1), um domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar ao primeiro ou ao segundo epítopo (*isto é*, VH_{CD3} ou VH_{DA}, e sendo que o Domínio VH não é selecionado para inclusão na primeira cadeia de polipeptídeo do diacorpo), um segundo peptídeo espaçador interveniente (Ligante 2) que contém opcionalmente um resíduo de cisteína, um domínio de promoção de heterodímero e um terminal C (Figuras 1A–1B). Os Domínios VL e VH empregados específicos para um determinado epítopo são preferencialmente obtidos ou derivados do mesmo anticorpo monoclonal. No entanto, esses domínios podem ser derivados de diferentes anticorpos monoclonais desde que se associem para formar um local de ligação funcional capaz de se ligar imunoespecificamente a tal epítopo. Esses anticorpos diferentes são chamados de anticorpos "correspondentes" no presente documento.

[00203] O domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo interage com o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo para formar um primeiro domínio de ligação ao epítopo funcional que é específico para um dos epítopos (*por exemplo*, o primeiro epítopo). Da mesma forma, o Domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo interage com o Domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo para formar um segundo Domínio de Ligação ao Epítopo funcional que é específico para o outro epítopo (*isto é*, o segundo epítopo). Assim, a seleção dos Domínios VL e VH da primeira e segunda cadeias de polipeptídeo é "coordenada", de modo que as duas cadeias de polipeptídeo do

diacorpo coletivamente compreendam os Domínios VL e VH capazes de se ligar tanto ao primeiro epítopo quanto ao segundo epítopo (*isto é*, coletivamente compreendem VL_{CD3}/VH_{CD3} e VL_{DA}/VH_{DA}).

[00204] Com a máxima preferência, o comprimento do peptídeo espaçador interveniente (*isto é*, "Ligante 1", que separa tais domínios VL e VH) é selecionado para impedir substancialmente ou completamente que os domínios VL e VH da cadeia de polipeptídeo se liguem (por exemplo, que consiste em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 resíduos de aminoácido ligante intervenientes). Assim, os domínios VL e VH da primeira cadeia de polipeptídeo são substancialmente ou completamente incapazes de se ligarem um ao outro. Da mesma forma, os domínios VL e VH da segunda cadeia de polipeptídeo são substancialmente ou completamente incapazes de se ligarem um ao outro. Um peptídeo espaçador intermediário preferido (Ligante 1) tem a sequência (SEQ ID NO: 16): GGGSGGGG.

[00205] O comprimento e a composição do segundo peptídeo espaçador interveniente ("Ligante 2") são selecionados com base na escolha de um ou mais domínios polipeptídicos que promovem tal dimerização (*isto é*, um "domínio de promoção de heterodímero"). Tipicamente, o segundo peptídeo espaçador interveniente (Ligante 2) compreenderá 3 a 20 resíduos de aminoácidos. Em particular, em que o domínio (ou domínios) de promoção de heterodímero empregue não compreende um resíduo de cisteína, um segundo peptídeo espaçador interveniente que contém cisteína (Ligante 2) é utilizado. Um segundo peptídeo espaçador interveniente que contém cisteína (Ligante 2) conterá 1, 2, 3 ou mais cisteínas. Um peptídeo espaçador que contém cisteína preferido (ligante 2) tem a sequência GGCGGG (SEQ ID NO:17). Alternativamente, o

ligante 2 não compreende uma cisteína (*por exemplo*, GGG, GGGS (SEQ ID NO: 18), LGGGSG (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 20), ASTKG (SEQ ID NO: 21), LEPKSS (SEQ ID NO: 22), APSSS (SEQ ID NO: 23), *etc.*) e um Domínio de Promoção de Heterodímero que contém cisteína, conforme descrito abaixo. Opcionalmente, são usadosum Ligante 2 que contém cisteína e um Domínio de Promoção de Heterodímero que contém cisteína.

[00206] Os domínios de promoção de heterodímero podem compreender ou consistir em GVEPKSC (SEQ ID NO: 24) ou VEPKSC (SEQ ID NO: 25) ou AEPKSC (SEQ ID NO: 26) em uma cadeia de polipeptídeo e GFNRGEC (SEQ ID NO: 27) ou FNRGEC (SEQ ID NO: 28) na outra cadeia de polipeptídeo (US2007/0004909).

[00207] Em uma modalidade preferencial, os Domínios de Promoção de Heterodímero compreenderão domínios de bobina repetidos em tandem de carga oposta, por exemplo, um Domínio de Promoção de Heterodímero de "bobina E" (SEQ ID NO: 29: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), cujos resíduos de glutamato formarão uma carga negativa em pH 7, ou um domínio de promoção de heterodímero de "bobina K" (SEQ ID NO: 30: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), cujos resíduos de lisina formarão uma carga positiva em pH 7. A presença de tais domínios carregados promove a associação entre o primeiro e o segundo polipeptídeos e, assim, promove a formação de heterodímero. Podem ser utilizados domínios de promoção de heterodímero que compreendem modificações das sequências da bobina E da bobina K acima descritas de modo a incluir um ou mais resíduos de cisteína. A presença de tais resíduos de cisteína permite que a bobina presente em uma cadeia de polipeptídeo se torne covalentemente ligada a uma bobina complementar presente em outra cadeia de polipeptídeo, ligando

covalentemente, assim, as cadeias de polipeptídeo umas às outras e aumentando a estabilidade do diacorpo. Exemplos de tais domínios de promoção de heterodímero particularmente preferidos incluem uma bobina E modificada que tem a sequência de aminoácidos EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 31), e uma bobina K modificada que tem a sequência de aminoácidos KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 32).

[00208] Conforme revelado no documento número WO 2012/018687, para melhorar as propriedades farmacocinéticas *in vivo* de diacorpos, um diacorpo pode ser modificado para conter uma porção polipeptídica de uma proteína de ligação ao soro em um ou mais dos terminais do diacorpo. Com a máxima preferência, essa porção polipeptídica de uma proteína de ligação ao soro será instalada no terminal C de uma cadeia de polipeptídeo do diacorpo. A albumina é a proteína mais abundante no plasma e tem meia-vida de 19 dias em humanos. A albumina possui vários locais de ligação de pequenas moléculas que permitem que se ligue de forma não covalente a outras proteínas e, assim, estenda suas meias-vidas séricas. O Domínio de ligação à albumina 3 (ABD3) da proteína G de Streptococcus cepa G148 consiste em 46 resíduos de aminoácidos que formam um feixe de três hélices estáveise tem ampla especificidade de ligação à albumina (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Module*s," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Assim, uma porção polipeptídica particularmente preferida de uma proteína de ligação ao soro para melhorar as propriedades farmacocinéticas *in vivo* de um diacorpo é o Domínio de ligação à albumina (ABD) da proteína G estreptocócica e, mais preferencialmente, o Domínio 3 de ligação à albumina (ABD3) da

proteína G de Streptococcus cepa G148 (SEQ ID NO: 33): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP.

[00209] Conforme revelado no documento número WO 2012/162068 (incorporado no presente por referência), as variantes "desimunizadas" de SEQ ID NO: 33 têm a capacidade de atenuar ou eliminar a ligação de MHC de classe II. Com base nos resultados de mutação combinatória, as seguintes combinações de substituições são consideradas substituições preferidas para formar tal ABD desimunizado: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. ABDs variantes com as modificações L64A, I65A e D79A ou as modificações N66S, T70S e D79A. ABD variante desimunizado que tem a sequência de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI$\underline{D}_{66}$NAK$\underline{S}_{70}$ $\underline{A}_{71}$EGVKALIDE ILAALP

(SEQ ID NO:34),

[00210] ou a sequência de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN$\underline{A}_{64}\underline{A}_{65}$NNAKT VEGVKALI$\underline{A}_{79}$E ILAALP

(SEQ ID NO:35),

[00211] ou a sequência de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI$\underline{S}_{66}$NAK$\underline{S}_{70}$ VEGVKALI$\underline{A}_{79}$E ILAALP

(SEQ ID NO:36),

[00212] são particularmente preferidos uma vez que tais ABD desimunizados exibem ligação substancialmente de tipo selvagem enquanto fornecem ligação atenuada de MHC classe II. Assim, a primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo que

tem um ABD contém um terceiro Ligante (Ligante 3) preferencialmente posicionado no terminal C para o Domínio da bobina E (ou bobina K) de tal cadeia de polipeptídeo de modo a intervir entre o Domínio da bobina E (ou bobina K) e o ABD (que é de preferência um ABD desimunizado). Uma sequência preferida para tal Ligante 3 é SEQ ID NO: 18: GGGS.

B. DIACORPOS QUE COMPREENDEM DOMÍNIOS FC

[00213] Uma modalidade da presente invenção se refere a diacorpos multiespecíficos (*por exemplo*, biespecífico, triespecífico, tetraespecífico *etc*.) que compreendem um Domínio Fc e que são capazes de se ligar simultaneamente a um epítopo de CD3 e um epítopo de um Antígeno de Doença. O domínio Fc de tais moléculas pode ser de qualquer isótipo (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4). As moléculas podem compreender ainda um domínio CH1 e/ou um domínio articulação. Quando presente, o Domínio CH1 e/ou Domínio de articulação pode ser de qualquer isótipo (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) e é de preferência do mesmo isótipo que o Domínio Fc desejado.

[00214] A adição de um Domínio IgG CH2-CH3 a uma ou ambas as cadeias de polipeptídeo de diacorpo, de modo que a complexação das cadeias de diacorpo resulte na formação de um Domínio Fc, aumenta a meia-vida biológica e/ou altera a valência do diacorpo. Esses diacorpos compreendem duas ou mais cadeias de polipeptídeo cujas sequências permitem que as cadeias de polipeptídeo se liguem covalentemente umas às outras para formar um diacorpo associado covalentemente que é capaz de se ligar simultaneamente ao primeiro epítopo e ao segundo epítopo. A incorporação de um Domínio IgG CH2-CH3 em ambos os polipeptídeos diacorpo permitirá a formação de um diacorpo que

contém o Domínio Fc biespecífico de duas cadeias (Figura 2).

[00215] Alternativamente, a incorporação de Domínios IgG CH2-CH3 em apenas um dos polipeptídeos diacorpo permitirá que um diacorpo biespecífico que contém Domínio Fc de quatro cadeias mais complexo se forme (Figuras 3A-3C). A Figura 3C mostra um diacorpo representativo de quatro cadeias que tem o Domínio Constante Leve (CL) e o Domínio Constante Pesado CH1, no entanto fragmentos de tais domínios, bem como outros polipeptídeos podem ser alternativamente empregados (consulte, *por exemplo*, as Figuras 3A e 3B, Publicação de Patente números US 2013-0295121; 2010-0174053 e 2009-0060910; Publicação de Patente Europeia números EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 e Publicação PCT Nº WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Assim, por exemplo, em vez do Domínio CH1, pode-se empregar um peptídeo que tem a sequência de aminoácidos GVEPKSC (SEQ ID NO: 24), VEPKSC (SEQ ID NO: 25) ou AEPKSC (SEQ ID NO: 26), derivado do domínio de articulação de uma IgG humana, e em vez do domínio CL, pode-se empregar os 6 aminoácidos terminais C da cadeia leve kappa humana, GFNRGEC (SEQ ID NO: 27) ou FNRGEC (SEQ ID NO: 28). Um peptídeo representativo que contém diacorpo de quatro cadeias é mostrado na Figura 3A. Alternativamente, ou além disso, pode-se empregar um peptídeo que compreende domínios de bobina E tandem de carga oposta, como os domínios helicoidais de "bobina E" (SEQ ID NO: 29: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK ou SEQ ID NO:31: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); e os domínios de "bobina K" (SEQ ID NO:30: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE ou SEQ ID NO:32: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Um domínio de bobina representativo que contém diacorpo de quatro cadeias é mostrado na Figura 3B.

[00216] Moléculas de diacorpo que contém Domínio Fc da presente invenção podem incluir peptídeos espaçadores intermediários adicionais (Ligantes), geralmente tais Ligantes serão incorporados entre um domínio de promoção de heterodímero (*por exemplo*, uma bobina E ou bobina K) e um Domínio CH2-CH3 e/ou entre um domínio CH2-CH3 e um domínio variável (*isto é*, VH ou VL). Tipicamente, os ligantes adicionais compreenderão 3 a 20 resíduos de aminoácidos e podem conter opcionalmente a totalidade ou uma porção de um Domínio de articulação de IgG (de preferência uma porção que contém cisteína de um Domínio de articulação de IgG que contém 1, 2, 3 ou mais resíduos de cisteína). Os ligantes que podem ser empregados nas moléculas de diacorpo que contém Domínio Fc biespecífico da presente invenção incluem: GGGS (SEQ ID NO:18), LGGGSG (SEQ ID NO:19), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:20), ASTKG (SEQ ID NO:21), LEPKSS (SEQ ID NO:22), APSSS (SEQ ID NO:23), APSSSPME (SEQ ID NO:37), VEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:38), LEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:39), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:40), o ligante scFv: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:41); o ligante "longo": GGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:42), GGC, e GGG. LEPKSS (SEQ ID NO: 22) pode ser usado em vez de GGG ou GGC para facilidade de clonagem. Além disso, os aminoácidos GGG ou LEPKSS (SEQ ID NO: 22) podem ser imediatamente seguidos por DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40) para formar os Ligantes alternativos: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:43); e LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:44). Moléculas que contém Domínio Fc biespecífico da presente invenção podem incorporar um Domínio de Articulação IgG além de ou no lugar de um Ligante. Os domínios de articulação exemplificativos incluem: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5) de IgG1, ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 6) de IgG2, ELKTPLGDTT

HTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (SEQ ID NO: 7) de IgG3, ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 8) de IgG4, e ESKYGPPCPPCP (ID SEQ NO: 9) uma variante de articulação de IgG4 que compreende uma substituição S228P de estabilização (conforme numerado pelo índice de EU conforme estabelecido em Kabat) para reduzir a troca de fita.

[00217] Conforme fornecido na Figura 3A-3C, diacorpos que contêm Domínio Fc da invenção podem compreender quatro cadeias. A primeira e a terceira cadeias de polipeptídeo de tal diacorpo contêm três domínios: (i) um domínio que contém VL1, (ii) um domínio que contém VH2, (iii) um domínio promotor de heterodímero e (iv) um domínio que contém uma sequência CH2-CH3. A segunda e a quarta cadeias de polipeptídeo contêm: (i) um domínio que contém VL2, (ii) um domínio que contém VH1, e (iii) um domínio promotor de heterodímero, em que os domínios de promoção de heterodímero promovem a dimerização da primeira/terceira cadeias de polipeptídeo com o segundo/quarto polipeptídeo correntes. Os domínios VL e/ou VH das terceira e quarta cadeias de polipeptídeo e os domínios VL e/ou VH das primeiras e segundas cadeias de polipeptídeo podem ser iguais ou diferentes de modo a permitir a ligação tetravalente que é monoespecífica, biespecífica ou tetraespecífica. A notação "VL3" e "VH3" denotam, respectivamente, o Domínio Variável da Cadeia Leve e o Domínio Variável da Cadeia Pesada que ligam um "terceiro" epítopo de tal diacorpo. Da mesma forma, a notação "VL4" e "VH4" denotam, respectivamente, o Domínio Variável da Cadeia Leve e o Domínio Variável da Cadeia Pesada que ligam um "quarto" epítopo de tal diacorpo. A estrutura geral das cadeias de polipeptídeo de um diacorpos biespecíficos que contém o Domínio Fc de quatro cadeias representativos da invenção é

fornecida na Tabela 1:

Tabela 1		
Biespecífico	2ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VL1–VH2–HPD–CH2–CH3–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VL1–VH2–HPD–CH2–CH3–COOH
	2ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH
Tetraespecífico	2ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VL1–VH2–HPD–CH2–CH3–COOH
	3ª cadeia	NH_2–VL3–VH4–HPD–CH2–CH3–COOH
	4ª cadeia	NH_2–VL4–VH3–HPD–COOH

HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[00218] Em uma modalidade específica, diacorpos da presente invenção são biespecíficos, tetravalentes (*isto é*, possuem quatro domínios de ligação ao epítopo), diacorpos que contém Fc que são compostos por quatro cadeias de polipeptídeo totais (Figuras 3A–3C). Os diacorpos biespecíficos, tetravalentes, que contém Fc da invenção compreendem dois primeiros domínios de ligação ao epítopo e dois segundos domínios de ligação ao epítopo.

[00219] Em uma outra modalidade, os diacorpos que contém Domínio Fc da presente invenção podem compreender três cadeias de polipeptídeo. O primeiro polipeptídeo de tal diacorpo contém três domínios: (i) um domínio que contém VL1, (ii) um domínio que contém VH2 e (iii) um domínio que contém uma sequência CH2–CH3. O segundo polipeptídeo de tal diacorpo contém: (i) um Domínio que contém VL2, (ii) um Domínio que contém VH1 e (iii) um Domínio que promove heterodimerização e ligação covalente com a primeira cadeia de polipeptídeo do diacorpo. O terceiro polipeptídeo de tal diacorpo compreende uma sequência CH2–CH3. Assim, a primeira e a segunda cadeias de polipeptídeo de tal diacorpo se associam para formar um domínio de ligação ao epítopo VL1/VH1 que é capaz de se ligar

ao primeiro ou ao segundo epítopo, bem como um domínio de ligação ao epítopo VL2/VH2 que é capaz de ligar o outro de tais epítopos. O primeiro e o segundo polipeptídeos estão ligados um ao outro através de uma ligação dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína em seus respectivos Terceiros Domínios. Notavelmente, a primeira e a terceira cadeias de polipeptídeo complexam uma com a outra para formar um domínio Fc que é estabilizado por meio de uma ligação dissulfeto. Esses diacorpos biespecíficos têm potência aumentada. As Figuras 4A e 4B ilustram as estruturas de tais diacorpos. Esses diacorpos que contém Domínio Fc podem ter qualquer uma das duas orientações (Tabela 2):

Tabela 2

Primeira Orientação	3ª cadeia	NH_2–CH2–CH3–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VL1–VH2–HPD–CH2–CH3–COOH
	2ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH
Segunda Orientação	3ª cadeia	NH_2–CH2–CH3–COOH
	1ª cadeia	NH_2–CH2–CH3–VL1–VH2–HPD–COOH
	2ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH

HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[00220] Em uma modalidade específica, diacorpos da presente invenção são biespecíficos, bivalentes (*isto é*, possuem dois domínios de ligação ao epítopo), diacorpos que contém Fc que são compostos por três cadeias de polipeptídeo totais (Figuras 4A–4B). Os diacorpos bivalentes que contêm Fc bivalente da invenção compreendem um Domínio de ligação ao epítopo imunoespecífico para o primeiro ou segundo epítopo, bem como um domínio de ligação ao epítopo VL2/VH2 que é capaz de se ligar ao outro de tais epítopos.

[00221] Em uma outra modalidade, os diacorpos que contém Domínio Fc podem compreender um total de cinco cadeias de polipeptídeo. Em uma modalidade particular, duas das cinco

cadeias de polipeptídeo têm a mesma sequência de aminoácidos. A primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo contém: (i) um domínio que contém VH1, (ii) um domínio que contém CH1 e (iii) um domínio que contém uma sequência CH2–CH3. A primeira cadeia de polipeptídeo pode ser a cadeia pesada de um anticorpo que contém uma região constante de VH1 e uma cadeia pesada. A segunda e a quinta cadeias de polipeptídeo de tal diacorpo contêm: (i) um Domínio que contém VL1 e (ii) um Domínio que contém CL. A segunda e/ou quinta cadeias de polipeptídeo de tal diacorpo podem ser Cadeias Leves de um anticorpo que contém um VL1 complementar ao VH1 da primeira/terceira cadeia de polipeptídeo. A primeira, segunda e/ou quinta cadeias de polipeptídeo podem ser isoladas de um anticorpo de ocorrência natural. Alternativamente, podem ser construídos de forma recombinante. A terceira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo contém: (i) um Domínio que contém VH1, (ii) um Domínio que contém CH1, (iii) um Domínio que contém uma sequência CH2–CH3, (iv) um Domínio que contém VL2, (v) um Domínio que contém VH3 e (vi) um domínio de promoção de heterodímero, em que os domínios de promoção de heterodímero promovem a dimerização da terceira cadeia com a quarta cadeia. O quarto polipeptídeo de tais diacorpos contém: (i) um Domínio que contém VL3, (ii) um Domínio que contém VH2 e (iii) um Domínio que promove a heterodimerização e ligação covalente com a terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo.

[00222] Assim, a primeira e a segunda, e a terceira e quinta cadeias de polipeptídeo de tais diacorpos se associam para formar dois Domínios de Ligação ao Epítopo VL1/VH1 capazes de se ligar a um primeiro epítopo. A terceira e a quarta cadeias de polipeptídeo de tais diacorpos se associam para

formar um domínio de ligação ao epítopo VL2/VH2 que é capaz de se ligar a um segundo epítopo, bem como um local de ligação VL3/VH3 que é capaz de se ligar a um terceiro epítopo. O primeiro e o terceiro polipeptídeos estão ligados um ao outro através de uma ligação dissulfeto que envolve resíduos de cisteína em suas respectivas regiões constantes. Notavelmente, a primeira e a terceira cadeias de polipeptídeo complexam uma com a outra para formar um domínio Fc. Esses diacorpos multiespecíficos têm potência aumentada. A Figura 5 ilustra a estrutura de tais diacorpos. Será entendido que os domínios VL1/VH1, VL2/VH2 e VL3/VH3 podem ser iguais ou diferentes de modo a permitir a ligação que é monoespecífica, biespecífica ou triespecífica.

[00223] Os domínios VL e VH das cadeias de polipeptídeo são selecionados de modo a formar locais de ligação VL/VH específicos para um epítopo desejado. Os locais de ligação VL/VH formados pela associação das cadeias de polipeptídeo podem ser iguais ou diferentes de modo a permitir a ligação tetravalente que é monoespecífica, biespecífica, triespecífica ou tetraespecífica. Em particular, os domínios VL e VH podem ser selecionados de modo que um diacorpo multivalente possa compreender dois locais de ligação para um primeiro epítopo e dois locais de ligação para um segundo epítopo, ou três locais de ligação para um primeiro epítopo e um local de ligação para um segundo epítopo, ou dois locais de ligação para um primeiro epítopo, um local de ligação para um segundo epítopo e um local de ligação para um terceiro epítopo (como representado na Figura 5). A estrutura geral das cadeias de polipeptídeo de diacorpos que contém Domínio Fc de cinco cadeias representativos da invenção é fornecida na Tabela 3:

Tabela 3		
Biespecífico (2x2)	2ª cadeia	NH_2–VL1–CL–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VH1–CH1–CH2–CH3–COOH
	3ª cadeia	NH_2–VH1–CH1–CH2–CH3–VL2–VH2–HPD–COOH
	5ª cadeia	NH_2–VL1–CL–COOH
	4ª cadeia	NH_2–VL2–VH2–HPD–COOH
Biespecífico (3x1)	2ª cadeia	NH_2–VL1–CL–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VH1–CH1–CH2–CH3–COOH
	3ª cadeia	NH_2–VH1–CH1–CH2–CH3–VL1–VH2–HPD–COOH
	5ª cadeia	NH_2–VL1–CL–COOH
	4ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH
Triespecífico (2x1x1)	2ª cadeia	NH_2–VL1–CL–COOH
	1ª cadeia	NH_2–VH1–CH1–CH2–CH3–COOH
	3ª cadeia	NH_2–VH1–CH1–CH2–CH3–VL2–VH3–HPD–COOH
	5ª cadeia	NH_2–VL1–CL–COOH
	4ª cadeia	NH_2–VL3–VH2–HPD–COOH

HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[00224] Em uma modalidade específica, diacorpos da presente invenção são biespecíficos, tetravalentes (*isto é*, possuem quatro domínios de ligação ao epítopo), diacorpos que contém Fc que são compostos por cinco cadeias de polipeptídeo totais com dois domínios de ligação ao epítopo imunoespecíficos para o primeiro epítopo, e dois domínios de ligação a epítopo específicos para o segundo epítopo. Em outra modalidade, os

diacorpos biespecíficos, tetravalentes, que contém Fc da invenção compreendem três domínios de ligação a epítopo imunoespecíficos para o primeiro epítopo e um domínio de ligação a epítopo específico para o segundo epítopo. Conforme fornecido acima, os domínios VL e VH podem ser selecionados para permitir a ligação trispecífica. Consequentemente, a invenção também abrange diacorpos triespecíficos, tetravalentes, que contém Fc. Os diacorpos trispecíficos, tetravalentes, que contém Fc da invenção compreendem dois Domínios de Ligação ao Epítopo imunoespecíficos para o primeiro epítopo, um Domínio de Ligação ao Epítopo imunoespecífico para a segunda molécula e um Domínio de Ligação ao Epítopo imunoespecífico para o terceiro epítopo.

[00225] Na função imunológica tradicional, a interação de complexos anticorpo-antígeno com células do sistema imunológico resulta em uma ampla gama de respostas, que vão desde funções efetoras, como citotoxicidade dependente de anticorpos, desgranulação de mastócitos e fagocitose, até sinais imunomoduladores, como a regulação de linfócitos proliferação e secreção de anticorpos. Todas essas interações são iniciadas através da ligação do Domínio Fc de anticorpos ou complexos imunes a receptores especializados de superfície celular em células hematopoiéticas. A diversidade de respostas celulares desencadeadas por anticorpos e complexos imunes resulta da heterogeneidade estrutural dos três Receptores Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) e FcγRIII (CD16) são receptores de ativação (isto é, intensificadores do sistema imunológico); FcγRIIB (CD32B) é um receptor de inibição (isto é, amortecimento do sistema imunológico). Além disso, a interação com o receptor

Fc neonatal (FcRn) medeia a reciclagem de moléculas de IgG do endossomo para a superfície celular e a liberação no sangue. A sequência de aminoácidos de IgG1 de tipo selvagem exemplificativo (SEQ ID NO: 10), IgG2 (SEQ ID NO: 11), IgG3 (SEQ ID NO: 12) e IgG4 (SEQ ID NO: 13) são apresentadas acima.

[00226] A modificação do domínio Fc pode levar a um fenótipo alterado, por exemplo, meia-vida sérica alterada, estabilidade alterada, suscetibilidade alterada a enzimas celulares ou função efetora alterada. Pode, portanto, ser desejável modificar uma molécula de ligação que contém Domínio Fc da presente invenção em relação à função efetora, por exemplo, de modo a aumentar a eficácia de tal molécula no tratamento de câncer. A redução ou eliminação da função efetora mediada pelo Domínio Fc é desejável em certos casos, por exemplo, no caso de anticorpos cujo mecanismo de ação envolve o bloqueio ou antagonismo, mas não a morte das células portadoras de um antígeno alvo. A função efetora aumentada é geralmente desejável quando direcionada a células indesejáveis, como células tumorais e estranhas, em que os FcγRs são expressos em níveis baixos, por exemplo, células B específicas de tumor com níveis baixos de FcγRIIB (*por exemplo*, linfoma não Hodgkin, CLL e linfoma de Burkitt). As moléculas da invenção que possuem tal atividade de função efetora conferida ou alterada são úteis para o tratamento e/ou prevenção de uma doença, distúrbio ou infecção em que uma eficácia aumentada da atividade de função efetora é desejada.

[00227] Consequentemente, em certas modalidades, o Domínio Fc das moléculas que contém o Domínio Fc da presente invenção pode ser um Domínio Fc variante manipulado. Embora o Domínio Fc das moléculas que contém o Domínio Fc biespecífico

da presente invenção possam possuir a capacidade de se ligar a um ou mais Receptores Fc (*por exemplo*, FcγR (s)), mais preferencialmente, tal Domínio Fc variante tem FcγRIA de ligação alterada (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação exibida por um Domínio Fc de tipo selvagem), *por exemplo*, terá ligação aumentada a um receptor de ativação e/ou terá substancialmente reduzido ou nenhuma capacidade para ligar receptor inibidor (ou receptores inibidores). Assim, o Domínio Fc das moléculas que contém o Domínio Fc da presente invenção pode incluir algum ou todo o Domínio CH2 e/ou algum ou todo o Domínio CH3 de um Domínio Fc completo, ou pode compreender um CH2 variante e/ou uma sequência CH3 variante (que pode incluir, por exemplo, uma ou mais inserções e/ou uma ou mais deleções em relação aos domínios CH2 ou CH3 de um domínio Fc completo). Tais Domínios Fc podem compreender porções de polipeptídeo não Fc, ou podem compreender porções de Domínios Fc não naturalmente completos, ou podem compreender orientações de ocorrência não natural de Domínios CH2 e/ou CH3 (como, por exemplo, dois Domínios CH2 ou dois Domínios CH3, ou na direção do terminal N para o terminal C, um domínio CH3 ligado a um domínio CH2 *etc.*).

[00228] As modificações do domínio Fc identificadas como alterando a função efetora são conhecidas na técnica, incluindo modificações que aumentam os receptores ativadores de ligação (*por exemplo*, FcγRIIA (CD16A) e reduzem os receptores inibidores de ligação (*por exemplo*, FcγRIIB (CD32B) (consulte, *por exemplo*, Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor*

Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors," Cancer Res. 57(18):8882-8890). A Tabela 4 lista substituições exemplificativas simples, duplas, triplas, quádruplas e quíntuplas (numeração (de acordo com o índice EU) e as substituições são relativas à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 como apresentado acima) de modificação exemplificativa que aumenta os receptores de ativação de ligação e/ou reduzir os receptores inibitórios de ligação.

Tabela 4
Variações de domínios Fc de ativação preferidos †

Variações de local único			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Variações de local duplo			
F243L e R292P	F243L e Y300L	F243L e P396L	R292P e Y300L
D270E e P396L	R292P e V305I	P396L e Q419H	P247L e N421K
R292P e P396L	Y300L e P396L	R255L e P396L	R292P e P305I
K392T e P396L			
Variações de local triplo			
F243L, P247L e N421K		P247L, D270E e N421K	
F243L, R292P e Y300L		R255L, D270E e P396L	
F243L, R292P e V305I		D270E, G316D e R416G	
F243L, R292P e P396L		D270E, K392T e P396L	
F243L, Y300L e P396L		D270E, P396L e Q419H	
V284M, R292L e K370N		R292P, Y300L e P396L	
Variações de local quádruplo			
L234F, F243L, R292P e Y300L		F243L, P247L, D270E e N421K	
L234F, F243L, R292P e Y300L		F243L, R255L, D270E e P396L	
L235I, F243L, R292P e Y300L		F243L, D270E, G316D e R416G	
L235Q, F243L, R292P e Y300L		F243L, D270E, K392T e P396L	
P247L, D270E, Y300L e N421K		F243L, R292P, Y300L e P396L	
R255L, D270E, R292G e P396L		F243L, R292P, V305I e P396L	
R255L, D270E, Y300L e P396L		F243L, D270E, P396L e Q419H	
D270E, G316D, P396L e R416G			
Variações de local quíntuplo			
L235V, F243L, R292P, Y300L e P396L		F243L, R292P, V305I, Y300L e P396L	

Tabela 4 Variações de domínios Fc de ativação preferidos †	
L235P, F243L, R292P, Y300L e P396L	
† A numeração está de acordo com o índice EU como em Kabat	

[00229] Variantes exemplificativas de Domínios Fc de IgG1 humana com CD32B de ligação reduzido e/ou CD16A de ligação aumentada contêm substituições de F243L, R292P, Y300L, V305I ou P396L, em que a numeração é aquela do índice EU como em Kabat. Essas substituições de aminoácidos podem estar presentes em um Domínio Fc de IgG1 humano em qualquer combinação. Em uma modalidade, o domínio Fc de IgG1 humano variante contém uma substituição F243L, R292P e Y300L. Em outra modalidade, o domínio Fc de IgG1 humano variante contém uma substituição de F243L, R292P, Y300L, V305I e P396L.

[00230] Em certas modalidades, é preferido que os Domínios Fc das Moléculas de Ligação que contém Domínio Fc da presente invenção exibam FcγRIA (CD64) de ligação diminuída (ou substancialmente nenhuma), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação exibida pelo Domínio Fc de IgG1 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10)). Em uma modalidade específica, as moléculas de ligação que contém domínio Fc da presente invenção compreendem um domínio Fc de IgG que exibe função efetora de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo reduzida (ADCC). Em uma modalidade preferida, os domínios CH2-CH3 de tais moléculas de ligação incluem qualquer 1, 2, 3 ou 4 das substituições: L234A, L235A, D265A, N297Q e N297G, em que a numeração é aquela do índice EU como em Kabat. Em outra modalidade, os domínios CH2-CH3 contêm uma substituição N297Q, uma substituição N297G, substituições L234A e L235A ou uma

substituição D265A, uma vez que essas mutações abolem a ligação FcR. Alternativamente, um domínio CH2–CH3 de um domínio Fc de ocorrência natural que exibe inerentemente FcγRIIIA (CD16a) de ligação diminuída (ou substancialmente nenhuma) e/ou função efetora reduzida (em relação à função de ligação e efetora exibida pelo domínio Fc de IgG1 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10)) é utilizado. Em uma modalidade específica, as moléculas de ligação que contêm o domínio Fc da presente invenção compreendem um domínio Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 11), um domínio Fc de IgG3 (SEQ ID NO: 12) ou um domínio Fc de IgG4 (SEQ ID NO: 13). Quando um Domínio Fc de IgG4 é utilizado, a presente invenção também abrange a introdução de uma mutação de estabilização, tal como a substituição da região de articulação S228P descrita acima (consulte, *por exemplo*, SEQ ID NO: 9). Visto que as substituições N297G, N297Q, L234A, L235A e D265A abolem a função efetora, em circunstâncias em que a função efetora é desejada, essas substituições preferencialmente não seriam empregadas.

[00231] Uma sequência de IgG1 preferida para os domínios CH2 e CH3 das moléculas que conêm o domínio Fc da presente invenção com função efetora reduzida ou abolida compreenderá as substituições L234A/L235A (SEQ ID NO: 45):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00232] A meia-vida sérica das proteínas que compreendem os domínios Fc pode ser aumentada aumentando-se a

afinidade de ligação do domínio Fc para FcRn. O termo "meia-vida", tal como usado no presente documento, significa uma propriedade farmacocinética de uma molécula que é uma medida do tempo médio de sobrevivência das moléculas após sua administração. A meia-vida pode ser expressa como o tempo necessário para eliminar cinquenta por cento (50%) de uma quantidade conhecida da molécula do corpo de um indivíduo (*por exemplo*, um paciente humano ou outro mamífero) ou um compartimento específico do mesmo, por exemplo, conforme medido no soro, *isto é*, meia-vida circulante ou em outros tecidos. Em geral, um aumento na meia-vida resulta em um aumento no tempo médio de residência (MRT) em circulação para a molécula administrada.

[00233] Em algumas modalidades, as moléculas de ligação que contém um domínio Fc da presente invenção compreendem um domínio Fc variante que compreende pelo menos uma modificação de aminoácido em relação a um domínio Fc de tipo selvagem, de modo que a molécula tenha uma meia-vida aumentada (em relação a tal molécula se compreende um Domínio Fc de tipo selvagem). Em algumas modalidades, as moléculas de ligação que contêm o domínio Fc da presente invenção compreendem um domínio Fc de IgG variante que compreende uma substituição de aminoácidos que prolonga a meia-vida em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste em 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 e 436, em que a numeração é a do índice EU como em Kabat. Numerosas mutações capazes de aumentar a meia-vida de uma molécula que contém o domínio Fc são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, M252Y, S254T,

T256E e suas combinações. Por exemplo, consulte as mutações descritas nas Patentes números US 6.277.375, 7.083.784; 7.217.797, 8.088.376; Publicações números US 2002/0147311; 2007/0148164; e Publicações PCT números WO 98/23289; WO 2009/058492; e WO 2010/033279, que são incorporados no presente documento por referência em sua totalidade.

[00234] Em algumas modalidades, as moléculas de ligação que contêm o domínio Fc da presente invenção exibindo meia-vida aumentada possuem um domínio Fc variante que compreende substituições em dois ou mais dos resíduos do domínio Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 e 436. Em particular, duas ou mais substituições selecionadas a partir de: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K e Y436I. Em uma modalidade específica, tais moléculas podem possuir um Domínio Fc de IgG variante que compreende a substituição:

[00235] (A) M252Y, S254T e T256E;

[00236] (B) M252Y e S254T;

[00237] (C) M252Y e T256E;

[00238] (D) T250Q e M428L;

[00239] (E) T307Q e N434A;

[00240] (F) A378V e N434A;

[00241] (G) N434A e Y436I;

[00242] (H) V308P e N434A; ou

[00243] (I) K288D e H435K.

[00244] Em uma modalidade preferida, uma molécula de ligação que contém Domínio Fc da presente invenção possui um Domínio Fc IgG variante que compreende qualquer 1, 2 ou 3 das substituições: M252Y, S254T e T256E. A invenção abrange ainda tais moléculas de ligação que possuem um domínio Fc

variante que compreende:

[00245] (A) uma ou mais mutações que alteram a função efetora e/ou ligação de FcγR; e

[00246] (B) uma ou mais mutações que estendem a meia-vida sérica.

[00247] Uma sequência de IgG1 para os domínios CH2 e CH3 das moléculas que contêm o domínio Fc da presente invenção que fornece uma meia-vida aumentada (e que tem um aumento de 10 vezes na ligação a ambos os macacos cinomolgos e FcRn humano) (Dall'Acqua, W.F. *et al*. (2006) "*Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn)*," J. Biol. Chem. 281(33):23514-23524) compreenderá as substituições M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO:46):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

[00248] em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00249] Uma sequência IgG1 alternativa para os domínios CH2 e CH3 das moléculas que contêm o domínio Fc da presente invenção combinando a função efetora reduzida ou abolida fornecida pelas substituições L234A/L235A e a meia-vida sérica aumentada fornecida pelas substituições M252Y/S254T/T256E é fornecido pela SEQ ID NO: 47:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

[00250] em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00251] Para certos anticorpos, diacorpos e moléculas de ligação trivalentes que se deseja ter cadeias de polipeptídeo que contêm Domínio Fc de sequências de aminoácidos diferentes (*por exemplo*, cujas cadeias de polipeptídeo que contêm Domínio Fc são desejadas que não sejam idênticas), é desejável reduzir ou evitar que a homodimerização ocorra entre os domínios CH2–CH3 de cadeias idênticas (*por exemplo*, duas primeiras cadeias de polipeptídeo ou entre os domínios CH2–CH3 das duas terceiras cadeias de polipeptídeo). Os domínios CH2 e/ou CH3 de tais cadeias de polipeptídeo não precisam ser idênticos em sequência e, com vantagem, são modificados para promover a complexação entre as duas cadeias de polipeptídeo. Por exemplo, uma substituição de aminoácido (de preferência uma substituição com um aminoácido que compreende um grupo lateral volumoso formando uma "protuberância", *por exemplo,* triptofano) pode ser introduzida no domínio CH2 ou CH3 de modo que a interferência estérica evite a interação com um domínio mutado de forma semelhante e obrigará o domínio mutado a emparelhar com um domínio no qual uma mutação complementar ou acomodativa foi projetada, *isto é*, "o orifício" (*por exemplo*, uma substituição por glicina). Esses conjuntos de mutações podem ser projetados em qualquer par de polipeptídeos que compreende domínios CH2–CH3 que formam um domínio Fc para promover a heterodimerização. Os métodos de engenharia de proteínas para favorecer a heterodimerização em relação à homodimerização são bem conhecidos na técnica, em particular no que diz respeito à engenharia de moléculas do tipo imunoglobulina, e são abrangidos no presente documento

(consulte *por exemplo,* Ridgway *et al.* (1996) "'*Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,*" Protein Engr. 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) "*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,*" J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie *et al.* (2005) "*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,*" J. Immunol. Methods 296:95-101; cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade).

[00252] Uma protuberância preferida é criada modificando-se um Domínio Fc de IgG para conter a modificação T366W. Um orifício preferido é criado modificando-se um Domínio Fc de IgG para conter a modificação T366S, L368A e Y407V. Para auxiliar na purificação de um homodímero de cadeia de polipeptídeo portadora de orifício da molécula que contém o Domínio Fc heterodimérico biespecífico final, o local de ligação da proteína A dos Domínios CH2 e CH3 portadores de orifício, uma cadeia de polipeptídeo é preferencialmente mutada por substituição de aminoácido na posição 435 (H435R). Assim, o homodímero de cadeia de polipeptídeo portadora de orifício não se ligará à proteína A, enquanto o heterodímero biespecífico manterá sua capacidade de se ligar à proteína A por meio do local de ligação da proteína A na cadeia de polipeptídeo portadora de protuberância. Em uma modalidade alternativa, a cadeia de polipeptídeo com orifício pode incorporar substituições de aminoácidos nas posições 434 e 435 (N434A/N435K).

[00253] Uma sequência de aminoácidos IgG1 preferida para os domínios CH2 e CH3 de uma cadeia de

polipeptídeo que contém Domínio Fc de uma molécula que contém um Domínio Fc da presente invenção terá a sequência "portadora de protuberância" (SEQ ID NO: 48):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

[00254] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00255] Uma sequência de aminoácidos IgG1 alternativa para os Domínios CH2 e CH3 de uma cadeia de polipeptídeo contendo Domínio Fc de uma molécula contendo Domínio Fc da presente invenção que tem uma substituição M252Y/S254T/T256E e uma sequência "portadora de protuberância" é SEQ ID NO: 49:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX

[00256] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00257] Uma sequência de aminoácidos de IgG1 preferida para os domínios CH2 e CH3 da outra cadeia de polipeptídeo que contém um Domínio Fc de uma molécula que contém um Domínio Fc da presente invenção terá a sequência "portadora de orifício" (SEQ ID NO: 50):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG

NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGX

[00258] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00259] Uma sequência de aminoácidos IgG1 alternativa para os Domínios CH2 e CH3 da outra cadeia de polipeptídeo que contém Domínio Fc de uma molécula que contém um Domínio Fc da presente invenção com uma substituição M252Y/S254T/T256E e uma sequência "portadora de orifício" é SEQ ID NO: 51:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGX

[00260] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00261] Como será observado, os domínios CH2-CH3 da SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 e SEQ ID NO: 51 incluem uma substituição na posição 234 com alanina e 235 com alanina e, assim, forma um domínio Fc exibe FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação exibida pelo Domínio Fc de tipo selvagem (SEQ ID NO: 10)). A invenção também abrange tais domínios CH2-CH3, que compreendem os resíduos de alanina de tipo selvagem, substituições alternativas e/ou adicionais que modificam a função efetora e/ou atividade de ligação FγR do domínio Fc. A invenção também abrange tais domínios CH2-CH3, que compreendem ainda uma ou mais substituições de aminoácidos extensíveis de meia-vida. Em particular, a invenção engloba tais domínios CH2-CH3 com portadora de orifício e portadora de protuberância que compreendem ainda o M252Y/S254T/T256E.

[00262] Uma sequência de aminoácidos IgG4 para os

domínios CH2 e CH3 da primeira cadeia de polipeptídeo de uma molécula que contém o domínio Fc da presente invenção aumentou a meia-vida sérica (em relação aos domínios IgG1 CH2 e CH3) devido à sua posse de Y252/T254/E256 (SEQ ID NO: 52):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGX

[00263] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00264] Uma variante "portadora de protuberância" de tal sequência de aminoácidos IgG4 CH2-CH3 tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 53:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGX

[00265] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00266] Uma variante "portadora de orifício" de tal sequência de aminoácidos IgG4 CG2-CH3 tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 54:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSLGX

[00267] em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00268] É preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo tenha uma sequência CH2-CH3 "portadora de

protuberância", tal como a da SEQ ID NO: 48 ou SEQ ID NO: 49. No entanto, como será reconhecido, um domínio CH2-CH3 "portador de orifício" (*por exemplo*, SEQ ID NO: 50 ou SEQ ID NO: 51) poderia ser empregado na primeira cadeia de polipeptídeo, caso em que, um domínio "portador de protuberância "Domínio CH2-CH3 (*por exemplo*, SEQ ID NO: 48 ou SEQ ID NO: 49) seria empregado na segunda cadeia de polipeptídeo de uma molécula que contém o Domínio Fc da presente invenção que tem duas cadeias de polipeptídeo (ou na terceira cadeia de polipeptídeo de uma molécula que tem um Domínio Fc com três, quatro ou cinco cadeias de polipeptídeo).

[00269] Em outras modalidades, a invenção abrange Moléculas de Ligação que contêm Domínio Fc que compreende Domínios CH2 e/ou CH3 que foram projetados para favorecer a heterodimerização em vez da homodimerização usando mutações conhecidas na técnica, tais como aquelas reveladas nas Publicações PCT números WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, todos os quais são incorporados no presente documento por referência em sua totalidade.

III. MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO TRIVALENTES QUE CONTÉM DOMÍNIOS FC

[00270] Uma outra modalidade da presente invenção se refere a moléculas de ligação trivalentes que compreendem um domínio Fc capaz de ligar simultaneamente um primeiro epítopo, um segundo epítopo e um terceiro epítopo, em que pelo menos um de tais epítopos não é idêntico a outro. Essas moléculas de ligação trivalentes compreendem três domínios de ligação de epítopo, dois dos quais são domínios de ligação do tipo diacorpo, que fornecem local de ligação A e local de ligação B, e um dos quais é um domínio de ligação do tipo Fab

ou um domínio de ligação do tipo scFv, que fornece Local C de ligação (consulte, *por exemplo*, as Figuras 6A-6F, Publicações PCT números WO 2015/184207 e WO 2015/184203). Tais moléculas de ligação trivalentes compreendem, portanto, domínios "VL1"/"VH1" que são capazes de se ligar ao primeiro epítopo e domínios "VL2"/"VH2" que são capazes de se ligar ao segundo epítopo e domínios "VL3" e "VH3" que são capazes de se ligarem ao "terceiro" epítopo de tal molécula de ligação trivalente. Um "Domínio de ligação do tipo diacorpo" é o tipo de domínio de ligação ao epítopo presente em um diacorpo, conforme descrito acima. Cada um dentre "Domínio de ligação do tipo Fab" e "Domínio de ligação do tipo scFv" são domínios de ligação do epítopo que são formados pela interação do domínio VL de uma cadeia leve de imunoglobulina e um domínio VH complementar de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Os domínios de ligação do tipo Fab diferem dos domínios de ligação do tipo diacorpo em que as duas cadeias de polipeptídeo que formam um domínio de ligação do tipo Fab compreendem apenas um único domínio de ligação do epítopo, enquanto as duas cadeias de polipeptídeo que formam um domínio de ligação do tipo diacorpo compreendem pelo menos dois domínios de ligação ao epítopo. Da mesma forma, os domínios de ligação do tipo scFv também diferem dos domínios de ligação do tipo diacorpo porque compreendem apenas um único domínio de ligação ao epítopo. Assim, como usado no presente documento, os domínios de ligação do tipo Fab e scFv são distintos dos domínios de ligação do tipo diacorpo.

[00271] Normalmente, as moléculas de ligação trivalentes da presente invenção compreenderão quatro cadeias de polipeptídeo diferentes (consulte as Figuras 6A-6B), no

entanto, as moléculas podem compreender um número menor ou maior de cadeias de polipeptídeo, por exemplo, fundindo-se tais cadeias de polipeptídeo umas às outras (*por exemplo*, através de uma ligação peptídica) ou dividindo-se tais cadeias de polipeptídeo para formar cadeias de polipeptídeo adicionais, ou associando-se menos cadeias de polipeptídeo ou adicionais por meio de ligações dissulfeto. As Figuras 6C-6F ilustram esse aspecto da presente invenção, representando-se esquematicamente essas moléculas com três cadeias de polipeptídeo. Conforme fornecido nas Figuras 6A-6F, as moléculas de ligação trivalentes da presente invenção podem ter orientações alternativas em que os domínios de ligação do tipo diacorpo são terminal N (Figuras 6A, 6C e 6D) ou terminal C (Figuras 6B, 6E e 6F) para um domínio Fc. Os domínios CH2 e CH3 úteis para a geração de moléculas de ligação trivalentes são fornecidos acima e incluem domínios portador de protuberância e portador de orifício.

[00272] Em certas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo de tais moléculas de ligação trivalentes da presente invenção contém: (i) um domínio que contém VL1, (ii) um domínio que contém VH2, (iii) um domínio de promoção de heterodímero e (iv) um domínio que contém uma sequência CH2-CH3. Os domínios VL1 e VL2 estão localizados no terminal N ou terminal C do domínio que contém CH2-CH3, conforme apresentado na Tabela 4 (consulte também, Figuras 6A e 6B). A segunda cadeia de polipeptídeo de tais modalidades contém: (i) umi VL2-containing domínio, (ii) umi VH1-containing domínio, e (iii) um domínio de promoção de heterodímero. A terceira cadeia de polipeptídeo de tais modalidades contém: (i) um domínio que contém VH3, (ii) um domínio que contém CH1 e (iii) um domínio

que contém uma sequência CH2-CH3. A terceira cadeia de polipeptídeo pode ser a cadeia pesada de um anticorpo que contém um VH3 e uma região constante da cadeia pesada, ou um polipeptídeo que contém tais domínios. O quarto polipeptídeo de tais modalidades contém: (i) um Domínio que contém VL3 e (ii) um Domínio que contém CL. As quartas cadeias de polipeptídeo podem ser uma cadeia leve de um anticorpo que contém um VL3 complementar ao VH3 da terceira cadeia de polipeptídeo, ou um polipeptídeo que contém esses domínios. A terceira ou quarta cadeias de polipeptídeo podem ser isoladas de anticorpos de ocorrência natural. Alternativamente, podem ser construídos de forma recombinante, sintética ou por outros meios.

[00273] O Domínio Variável da Cadeia Leve das primeiras e segundas cadeias de polipeptídeo é separado dos Domínios Variáveis da Cadeia Pesada de tais cadeias de polipeptídeo por um peptídeo espaçador interveniente com um comprimento que é muito curto para permitir seus domínios VL1/VH2 (ou seus VL2/VH1) para se associarem para formar o domínio de ligação ao epítopo capaz de se ligar ao primeiro ou ao segundo epítopo. Um peptídeo espaçador intermediário preferido (Ligante 1) para esse propósito tem a sequência (SEQ ID NO: 16): GGGSGGGG. Outros domínios das moléculas de ligação trivalentes podem ser separados por um ou mais peptídeos espaçadores intervenientes (ligantes), opcionalmente que compreende um resíduo de cisteína. Em particular, conforme fornecido acima, tais ligantes serão tipicamente incorporados entre Domínios Variáveis (*isto é*, VH ou VL) e Domínios de Promoção de Heterodímero de peptídeo (*por exemplo*, uma bobina E ou bobina K) e entre tais Domínios de Promoção de

Heterodímero de peptídeo (*por exemplo*, uma bobina E ou bobina K) e domínios CH2-CH3. Ligantes exemplificativos úteis para a geração de moléculas de ligação trivalentes são fornecidos acima e também são fornecidos nos pedidos PCT números: PCT/US15/33081; e PCT/US15/33076. Assim, a primeira e a segunda cadeias de polipeptídeo de tais moléculas de ligação trivalentes se associam para formar um local de ligação VL1/VH1 capaz de se ligar a um primeiro epítopo, bem como um local de ligação VL2/VH2 que é capaz de se ligar a um segundo epítopo. A terceira e quarta cadeias de polipeptídeo de tais moléculas de ligação trivalentes associam-se para formar um local de ligação VL3/VH3 que é capaz de se ligar a um terceiro epítopo.

[00274] Conforme descrito acima, as moléculas de ligação trivalentes da presente invenção podem compreender três polipeptídeos. As moléculas de ligação trivalente que compreende três cadeias de polipeptídeo podem ser obtidas ligando-se os domínios do quarto terminal N de polipeptídeo ao domínio que contém VH3 do terceiro polipeptídeo (*por exemplo*, usando um peptídeo espaçador interveniente (Linker 4)). Alternativamente, é utilizada uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma molécula de ligação trivalente da invenção que contém os seguintes domínios: (i) um Domínio que contém VL3, (ii) um Domínio que contém VH3 e (iii) um Domínio que contém uma sequência CH2-CH3, em que VL3 e VH3 são espaçados um do outro por um peptídeo espaçador interveniente que é suficientemente longo (pelo menos 9 ou mais resíduos de aminoácidos) de modo a permitir a associação desses domínios para formar um Domínio de Ligação ao Epítopo. Um peptídeo espaçador intermediário preferido para essa finalidade tem a sequência: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:41).

[00275] Será entendido que os domínios VL1/VH1, VL2/VH2 e VL3/VH3 de tais moléculas de ligação trivalentes podem ser diferentes de modo a permitir a ligação que é monoespecífica, biespecífica ou triespecífica. Em particular, os domínios VL e VH podem ser selecionados de modo que uma molécula de ligação trivalente compreenda dois locais de ligação para um primeiro epítopo e um local de ligação para um segundo epítopo, ou um local de ligação para um primeiro epítopo e dois locais de ligação para um segundo epítopo, ou um local de ligação para um primeiro epítopo, um local de ligação para um segundo epítopo e um local de ligação para um terceiro epítopo.

[00276] A estrutura geral das cadeias de polipeptídeo de moléculas de ligação trivalentes representativas da invenção é fornecida nas Figuras 6A-6F e na Tabela 5:

Tabela 5		
Quatro cadeias 1ª orientação	2ª cadeia	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª cadeia	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3ª cadeia	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	2ª cadeia	NH_2-VL3-CL-COOH
Quatro cadeias 2a orientação	2ª cadeia	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª cadeia	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	3ª cadeia	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	2ª cadeia	NH_2-VL3-CL-COOH
Três cadeias	2ª cadeia	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH

Tabela 5		
1a orientação	1ª cadeia	NH_2–VL1–VH2–HPD–CH2–CH3–COOH
	3ª cadeia	NH_2–VL3–VH3–HPD–CH2–CH3–COOH
Três cadeias 2ª orientação	2ª cadeia	NH_2–VL2–VH1–HPD–COOH
	1ª cadeia	NH_2–CH2–CH3–VL1–VH2–HPD–COOH
	3ª cadeia	NH_2–VL3–VH3–HPD–CH2–CH3–COOH

[00277] HPD = Domínio de Promoção de Heterodímero

[00278] Como fornecido acima, essas moléculas de ligação trivalentes podem compreender três, quatro, cinco ou mais cadeias de polipeptídeo.

IV. MODALIDADES DA INVENÇÃO

[00279] Como afirmado acima, a presente invenção é direcionada a moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2, um domínio CDR_H3, um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3, pelo menos um dos quais difere na sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de CDR correspondente de um domínio de ligação rCD3. O domínio de ligação a rCD3 que deve ser empregado em tal comparação com um domínio de ligação a vCD3 particular é o domínio de ligação a CD3 de um anticorpo de ligação a CD3 isolado que exibe a maior identidade de sequência de CDR com tal domínio de ligação a vCD3 particular. O domínio de ligação de rCD3 também exibe, de preferência, pelo menos 95% a 100% de identidade nas regiões estruturais. Um domínio de ligação de rCD3 preferido compreende o domínio CDR_H1, domínio CDR_H2, domínio CDR_H3, domínio CDR_L1, domínio CDR_L2 e domínio CDR_L3 de CD3 mAb-1. As moléculas de ligação DA x CD3 da presente invenção que compreendem tal

domínio de ligação vCD3 exibem uma afinidade alterada para CD3, em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 que exibe afinidade reduzida para CD3 e são capazes de mediar a morte redirecionada de células alvo que expressam um antígeno de doença e exibem níveis reduzidos de liberação de citocina em relação a uma Molécula de ligação a DA xCD3 que compreende um domínio de ligação a rCD3. A invenção se refere particularmente ao uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 no tratamento de câncer e doenças associadas a patógenos. A presente invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que compreende tal molécula (ou moléculas).

[00280] A invenção abrange, assim, moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um ou mais dos domínios VH e/ou VL de um domínio de ligação vCD3, ou mais preferencialmente, o CDR_H1, CDR_H2 e CDR_H3, e as porções CDR_L1, CDR_L2 e CDR_L3 de tais Domínios. Em uma modalidade preferida da invenção, tais moléculas de ligação de moléculas de ligação DA x CD3 conterão adicionalmente domínios de ligação suficientes para permitir que tais moléculas se liguem a epítopo (ou epítopos) de um, dois ou mais antígenos de doença. Em outra modalidade preferida da invenção, tais moléculas de ligação DA x CD3 irão conter adicionalmente domínios de ligação suficientes para permitir que tais moléculas se liguem a epítopo (ou epítopos) de outra molécula expressa na superfície de uma célula efetora, como CD2, CD8, CD16, Receptor de células T (TCR), NKp46, NKG2D *etc.*, que são expressos em linfócitos T,

células assassinas naturais (NK), Células Apresentadoras de Antígenos ou outras células mononucleares).

[00281] A presente invenção também se refere a composições farmacêuticas que compreendem tal molécula (ou moléculas) de ligação DA x CD3.

[00282] Por possuir domínios de ligação suficientes para ligar imunoespecificamente CD3 e um Antígeno de Doença, as moléculas da presente invenção têm a capacidade de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo (*por exemplo*, uma célula cancerosa ou uma célula infectada por patógeno) que organiza o Antígeno de Doença em sua superfície. A presença combinada de ambas as afinidades de ligação serve para localizar a célula efetora que expressa CD3 no local da célula alvo (*isto é*, para "redirecionar" a célula efetora) de modo que possa mediar a morte da célula alvo. Conforme discutido acima, tais moléculas podem ser biespecíficas ou podem ser capazes de se ligar a mais de dois epítopos (*por exemplo*, triespecíficos).

[00283] Os esforços para empregar as moléculas de ligação a CD3 foram prejudicados pela alta magnitude da ativação imunológica causada por tais terapias e pela produção concomitante e adversa de altos níveis de citocinas em alguns pacientes. Assim, embora as terapias anti-CD3 tenham resultado em um grau significativo de ativação imunológica em pacientes receptores, o que se correlacionou com um grande aumento da eficácia, o uso de tais moléculas foi associado a uma toxicidade notável (Frey, N.V. *et al*. (2016) "*Cytokine Release Syndrome With Novel Therapeutics For Acute Lymphoblastic Leukemia*," Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ Program. (1):567-572; Teachey, D.T. *et al*. (2013) "*Cytokine Release Syndrome*

After Blinatumomab Treatment Related To Abnormal Macrophage Activation And Ameliorated With Cytokine-Directed Therapy," Blood 121(26):5154-5157; Le Jeune, C. *et al*. (2016) "*Potential For Bispecific T-Cell Engagers: Role Of Blinatumomab In Acute Lymphoblastic Leukemia*," Drug Des. Devel. Ther. 10:757-765; Newman, M.J. *et al*. (2016) "*A Review Of Blinatumomab, A Novel Immunotherapy*," J. Oncol. Pharm. Pract. 22(4):639-645; Fitzgerald, J.C. *et al*. (2017) "*Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia*," Crit. Care Med. 45(2):e124-e131; Teachey, D.T. *et al*. (2016) "*Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia*," Cancer Discov. 6(6):664-679; Goebeler, M.E. *et al*. (2016) "*Blinatumomab: A CD19/CD3 Bispecific T Cell Engager (Bite) With Unique Anti-Tumor Efficacy*," Leuk. Lymphoma 57(5):1021-1032; Barrett, D.M. *et al*. (2014) "*Toxicity Management For Patients Receiving Novel T-Cell Engaging Therapies*," Curr. Opin. Pediatr. 26(1):43-49).

[00284] A presente invenção aborda tal estorvo, demonstrando-se que os domínios de ligação de CD3 parentais (*isto é*, domínios de ligação de rCD3) que exibem tanto alta citotoxicidade quanto alta liberação de citocinas quando incorporados em moléculas de ligação DA x CD3 podem ser projetados para produzir variantes (*isto é*, vCD3- Domínios de ligação) com afinidade alterada para CD3 que são capazes de mediar a morte redirecionada e exibem níveis reduzidos de liberação de citocinas em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. Em particular, as moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de

ligação de vCD3 da invenção exibem níveis reduzidos de liberação de qualquer um ou mais dentre: IFN-γ, TNF-α, IL-2 e/ou IL-6.

[00285] A presente invenção decorre, em parte, do reconhecimento de que a citotoxicidade e a liberação de citocinas são propriedades separáveis de moléculas de ligação DA x CD3. A presente invenção abrange domínios de ligação a CD3 variantes (*isto é*, domínios de ligação a vCD3) que retêm altos níveis de citotoxicidade enquanto exibem níveis reduzidos de liberação de citocinas e o uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende tais domínios de ligação a vCD3 no tratamento de doença. Tal como aqui utilizado, o termo "variante" com respeito a tais domínios de ligação a CD3 destina-se a referir-se a domínios de ligação a CD3 com pelo menos um CDR_H, e/ou pelo menos um CDR_L, que difere do CDR_H "correspondente" e/CDR_L de um domínio de ligação a CD3 de "referência" (*isto é*, domínio de ligação rCD3). Conforme usado no presente documento, o termo CDR_H "correspondente" e/CDR_L denota uma comparação entre duas sequências de CDR em que ambos os CDRs são Domínios CD_H1, ambos os CDRs são Domínios CD_H2, ambos os CDRs são Domínios CD_H3, ambos os CDRs são Domínios CD_L1, ambos tais CDRs são domínios CD_L2, ou ambos os CDRs são domínios CD_L3. Um domínio de ligação de rCD3 preferido para os domínios de ligação de vCD3 exemplificativos descritos no presente documento é um domínio de ligação de CD3 com pelo menos 5, pelo menos 4, pelo menos 3, pelo menos 2 ou pelo menos 1 dos CDRs: CD_H1, CDR_H2, CDR_H3 e CD_L1, CDR_L2, e CDR_L3 de CD3 mAb 1. Preferencialmente, tais domínios de ligação a vCD3 exemplificativos possuirão pelo menos 5 dos CDRs: CD_H1, CDR_H2, CDR_H3 e CD_L1, CDR_L2, e CDR_L3 de CD3 mAb 1. Os domínios de ligação

vCD3 podem ser obtidos através da modificação química de um ou mais CDRs do domínio de ligação de rCD3, mas serão mais preferencialmente obtidos formando-se um ou mais polinucleotídeos que codificam um ou mais CDRs do Domínio de ligação de rCD3, exceto que são alterados para codificar o domínio de ligação vCD3 desejado e, em seguida, expressando tal polinucleotídeo em um sistema de expressão de proteína apropriado (*por exemplo*, uma célula, ou sistema de tradução in vitro) A citotoxicidade pode ser medida de qualquer maneira adequada (*por exemplo*, um ensaio de CTL para determinar o EC_{50}, máximo *etc*.). A liberação de citocinas pode ser medida por ensaio para qualquer um ou mais de: IFN-gama, TNF-alfa, IL-6 ou IL-2 de qualquer maneira adequada (*por exemplo*, um ensaio de CTL para determinar o EC_{50}, máximo *etc*.).

[00286] Notavelmente, os níveis absolutos de citotoxicidade máxima e liberação de citocina não são os únicos critérios usados para avaliar se um candidato a domínio de ligação CD3 é um domínio de ligação vCD3 adequado abrangido pela presente invenção. Além disso, ou alternativamente, os valores de EC_{50} podem ser empregados. Conforme fornecido no presente documento, um domínio de ligação vCD3 adequado é aquele que, quando incorporado em uma molécula de ligação DA x CD3, é capaz de mediar altos níveis de citotoxicidade (*isto é*, uma baixa concentração de EC_{50}) enquanto exibe níveis reduzidos de liberação de citocina.

[00287] Em certas modalidades, a presente invenção fornece um domínio de ligação vCD3 que, quando incorporado em uma molécula de ligação DA x CD3, medeia a morte celular redirecionada para uma citotoxicidade máxima (*por exemplo*, conforme medido em um ensaio de CTL em 18 a 48 horas) que é

pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 100% do que é mediado por uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. Adicionalmente, ou alternativamente, uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação de vCD3 da invenção exibe uma EC_{50} de citotoxicidade (*por exemplo*, uma medida em um ensaio de CTL em 18 a 48 horas) que é aumentada em menos de cerca de 10%, menos do que cerca de 20%, menos do que cerca de 30%, menos do que cerca de 40%, menos do que cerca de 50%, menos do que cerca de 60%, menos do que cerca de 70%, menos do que cerca de 80%, menos do que cerca de 90%, menos do que cerca de 100%, menos do que cerca de 200%, menos do que cerca de 300%, menos do que cerca de 400%, ou menos do que cerca de 500% do que é exibido por uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. Adicionalmente, ou alternativamente, a razão da EC_{50} de citotoxicidade (*por exemplo*, conforme medido em um ensaio de CTL em 18 a 24 horas) de uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 da invenção para uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende o domínio de ligação rCD3 (variante EC_{50} /referência EC_{50}) é menos do que cerca de 2, é menos do que cerca de 5, é menos do que cerca de 10, é menos do que cerca de 20, é menos do que cerca de 40, é menos do que cerca de 60, é inferior do que cerca de 80, é menos do que cerca de 100 ou é menos do que cerca de 200.

[00288] Em certas modalidades, uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 da invenção exibe uma liberação máxima de uma ou mais citocinas (*por exemplo*, conforme medido em um ensaio de CTL em 18 a 24

horas) que é reduzida em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou mais daquele exibido por uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. Adicionalmente, ou alternativamente, as moléculas de ligação DA x CD3 que compreende os domínios de ligação vCD3 da invenção exibem um EC_{50} de liberação de uma ou mais citocinas (*por exemplo*, conforme medido em um ensaio de CTL em 18 a 48 horas) que é aumentado em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 90%, ou mais daquele exibido por uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. Em modalidades particulares, a citocina liberada é selecionada do grupo que consiste em: IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-6. Adicionalmente, ou alternativamente, a razão de EC_{50} de liberação de uma ou mais citocinas (*por exemplo*, conforme medido em um ensaio de CTL em 18 a 24 horas) de uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 da invenção a uma Molécula de ligação DA x CD3 que compreende o domínio de ligação rCD3 (variante EC_{50} / referência EC_{50}) é mais que cerca de 1, é mais do que cerca de 2, é mais do que cerca de 5, é mais do que cerca de 10, é mais do que cerca de 20, é mais do que cerca de 40, é mais do que cerca de 60, é mais do que cerca de 80, é mais do que cerca de 100 ou é mais do que cerca de 200.

[00289] Adicionalmente, as moléculas de ligação DA

x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 da invenção retêm pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 100%, de uma atividade *in vivo* (*por exemplo*, atividade antitumoral, antipatógeno) exibida por uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. Em vista da presente revelação, será entendido que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 podem ser administradas em uma dose mais elevada para atingir uma atividade *in vivo* que é pelo menos cerca de 50% ou mais daquela exibida por uma Molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3, mas essa dose mais elevada exibirá níveis reduzidos de liberação de citocina em comparação com a molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3.

[00290] Em uma modalidade, tais moléculas de ligação DA x CD3 da presente invenção serão monoespecíficas de modo a possuir a capacidade de se ligar a apenas um único epítopo de CD3 e apenas um único epítopo do antígeno de doença.

[00291] Alternativamente, tais moléculas de ligação DA x CD3 podem ser multiespecíficas, *isto é*, capazes de se ligar a 1, 2, 3, 4 ou mais de 4 epítopos, que podem ser repartidos de qualquer maneira para ligar 1, 2 ou mais epítopo (ou epítopos) de CD3 e 1, 2, 3, 4 ou mais de 4 epítopo (ou epítopos) de um ou mais Antígeno (ou antígenos) de Doença.

[00292] Em certas modalidades, em que tais moléculas de ligação DA x CD3 são capazes de se ligar imunoespecificamente a apenas um único antígeno de doença, podem ser capazes de se ligar imunoespecificamente a apenas um epítopo CD3 e a um, dois epítopo (ou epítopos) desse antígeno

de doença (que dois epítopos de Antígeno de Doença podem ser iguais ou diferentes), ou podem ser capazes de se ligar imunoespecificamente a apenas um epítopo CD3 e a três epítopo (ou epítopos) desse Antígeno da Doença (em que três epítopos de Antígeno de Doença podem ser os mesmos, ou podem ser diferentes ou podem ser dois epítopos iguais e um epítopo diferente).

[00293] Em outras modalidades, em que tais moléculas de ligação DA x CD3 são capazes de se ligar imunoespecificamente a dois antígenos de doença diferentes (*por exemplo*, um primeiro antígeno de doença e um segundo antígeno de doença), podem ser capazes de se ligar imunoespecificamente a apenas um epítopo de CD3 e a um ou dois epítopo (ou epítopos) de Antígeno de Primeira Doença (em que os dois epítopos do Antígeno da Primeira Doença podem ser iguais ou diferentes) e dois ou um epítopo (ou epítopos) de Antígeno de Segunda Doença (em que dois epítopos de Antígeno de Segunda Doença podem ser iguais ou diferentes).

[00294] Em ainda outras modalidades, tais moléculas de ligação DA x CD3 podem ser capazes de se ligar imunoespecificamente a três antígenos de doença diferentes (*por exemplo*, um antígeno de primeira doença, um antígeno de segunda doença e um antígeno de terceira doença) e apenas um epítopo CD3.

[00295] Em ainda outras modalidades, tais moléculas de ligação DA x CD3 podem ser capazes de se ligar imunoespecificamente a um ou dois antígenos de doença diferentes (*por exemplo*, um primeiro antígeno de doença e um segundo antígeno de doença), apenas um epítopo CD3 e uma ou duas superfícies celulares diferentes moléculas (que podem ser

a mesma molécula de superfície celular ou podem ser moléculas de superfície diferentes) de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora ou pode ser um tipo diferente de célula efetora).

[00296] Assim, por exemplo, tais moléculas de ligação DA x CD3 podem se ligar:

[00297] (1) um único epítopo de CD3 e um único epítopo de um antígeno de doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo;

[00298] (2) um único epítopo de CD3 e dois epítopos do mesmo Antígeno de Doença que estão dispostos em matriz na superfície da célula alvo;

[00299] (3) um único epítopo de CD3, um epítopo de um Antígeno da Primeira Doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo e um epítopo de um Antígeno da Segunda Doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo;

[00300] (4) um único epítopo de CD3 e três epítopos do mesmo Antígeno de Doença que estão dispostos em matriz na superfície da célula alvo;

[00301] (5) um único epítopo de CD3, dois epítopos de um Antígeno da Primeira Doença que está disposto na superfície da célula alvo e um epítopo de um Antígeno da Segunda Doença que está disposto na superfície da célula alvo;

[00302] (6) um único epítopo de CD3, um epítopo de um Antígeno da Primeira Doença que está disposto na superfície da célula alvo e um epítopo de um Antígeno da Segunda Doença que está disposto na superfície da célula alvo;

[00303] (7) um único epítopo CD3, um único epítopo de um antígeno de doença que está disposto em matriz na

superfície da célula alvo e um único epítopo de uma molécula de superfície celular diferente de CD3 que está disposto em matriz na superfície de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora que o CD3 matricial ou pode ser um tipo diferente de célula efetora);

[00304] (8) um único epítopo de CD3, dois epítopos de um antígeno de doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo e um único epítopo de uma molécula de superfície celular diferente de CD3 que está disposto em matriz na superfície de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora que o CD3 matricial ou pode ser um tipo diferente de célula efetora);

[00305] (9) um único epítopo de CD3, um epítopo de um Antígeno de Primeira Doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo, um epítopo de um Antígeno de Segunda Doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo e um único epítopo de uma molécula de superfície celular diferente de CD3 que está disposta em matriz na superfície de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora que aquela de CD3 ou pode ser um tipo diferente de célula efetora);

[00306] (10) um único epítopo de CD3, um epítopo de um antígeno de doença que está disposto em matriz na superfície da célula alvo, e dois epítopos de uma molécula de superfície celular diferente de CD3 que está disposta em matriz na superfície de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora que o CD3 matricial ou pode ser um tipo diferente de célula efetora); ou

[00307] (11) um único epítopo de CD3, um epítopo de um antígeno de doença que está disposto em matriz na

superfície da célula alvo, um epítopo de uma primeira molécula de superfície celular diferente de CD3 que está disposto em matriz na superfície de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora que o CD3 matricial ou pode ser um tipo diferente de célula efetora), e um epítopo de uma segunda molécula de superfície celular diferente de CD3 que está disposto em matriz na superfície de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora como aquela que distribui CD3 ou pode ser um tipo diferente de célula efetora).

[00308] A invenção contempla, assim, moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um primeiro domínio de ligação ao epítopo capaz de se ligar imunoespecificamente a um epítopo de CD3 e um segundo domínio de ligação ao epítopo que é capaz de se ligar imunoespecificamente a um epítopo de um antígeno de doença que está disposto em matriz na superfície de tal célula alvo e um terceiro domínio de ligação ao epítopo capaz de se ligar imunoespecificamente a um epítopo de uma molécula de superfície celular diferente de uma célula efetora (que pode ser o mesmo tipo de célula efetora ou pode ser um tipo diferente de célula efetora). Em uma modalidade específica, a molécula de superfície celular diferente de uma célula efetora é CD8. A Tabela 6 ilustra especificidades de ligação de combinação possível de moléculas exemplificativas da invenção.

Tabela 6					
Número de epítopos reconhecidos por moléculas exemplificativas da invenção capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo					
Número total de domínios de ligação	Epítopo CD3	Outro epítopo de célula efetor	1° Epítopo de Antígeno de Doença	2° Epítopo de Antígeno de Doença	3° Epítopo de Antígeno de Doença
2	1	0	1	0	0
3	1	0	1	1	0
3	1	1	1	0	0
3	1	0	1	1	0
3	2	0	1	0	0
4	1	0	1	1	1
4	1	0	1	2	0
4	1	0	2	1	0
4	1	1	2	0	0
4	1	1	1	1	0
4	1	2	1	0	0
4	2	0	1	1	0
4	2	0	1	1	0
4	2	1	1	0	0

[00309] Ao formar moléculas mais complexas, podem ser obtidas moléculas de ligação DA x CD3 que são capazes de se ligar a CD3 e um ou mais antígenos de doença e, opcionalmente, uma molécula de superfície celular diferente de uma célula efetora que possui mais de quatro domínios de ligação ao epítopo. Nenhuma limitação é colocada na natureza ou número de epítopos ou epítopos adicionais que podem ser ligados pelas moléculas da presente invenção, exceto que tal capacidade de ligação adicional não impede a molécula ou Domínio de Ligação da mesma que é capaz de se ligar a um epítopo de CD3 de tal ligação e não impede a molécula ou Domínio de Ligação da mesma que é capaz de se ligar a um epítopo de um Antígeno de Doença de tal ligação, de modo que

a molécula (ou moléculas) possa mediar a morte redirecionada da célula alvo.

V. MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO EXEMPLIFICATIVAS

[00310] A presente invenção é direcionada a moléculas de ligação DA x CD3 (*por exemplo*, um diacorpo, um anticorpo biespecífico, um biespecífico, uma molécula trivalente, um BiTe, um TandAb *etc*.) capazes de se ligar a CD3 e um Antígeno de Doença, tal como um Antígeno de câncer ou um antígeno associado a patógenos. Essas moléculas de ligação podem ser prontamente produzidas a partir dos CDRs de anticorpos e dos domínios VL e VH de anticorpos. Listados abaixo estão anticorpos exemplificativos que podem ser usados para produzir as moléculas de ligação e a terapia de combinação da presente invenção.

A. ANTICORPO CD3 MAB 1 ANTI-CD3

[00311] A presente invenção emprega domínios de ligação CD3 variantes (*isto é*, domínios de ligação a vCD3) que compreendem o domínio variável de cadeia leve (VL) e o domínio variável de cadeia pesada (VH) de anticorpos CD3 anti-humanos, ou suas porções de ligação a CD3, e que medeiam a ligação da variante a CD3. Tal como usado no presente documento, o termo "ligação variante" destina-se a referir-se à ligação comparativa exibida pelos Domínios de ligação a CD3 de um anticorpo de referência cujas CDRs exibem a identidade de sequência mais elevada para as CDRs do Domínio de ligação a CD3 variante. O anticorpo de referência de ligação CD3 para os domínios de ligação a vCD3 ilustrativos da presente invenção é o CD3 mAb 1, cujo domínio de ligação rCD3 é capaz de se ligar a CD3 humano e CD3 de primatas não humanos (*por exemplo*, macaco Cinomolgo).

[00312] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO:55) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00313] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00314] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO:56) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

CD3 mAb 1		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

[00315] O domínio de ligação rCD3 de "CD3 mAb 1" compreende um Domínio VH de CD3 mAb 1 que tem aspartato (D) ou glicina (G) na posição 65 de Kabat, que corresponde ao resíduo 68 da SEQ ID NO: 55) (*isto é*, X em SEQ ID NO: 55 é aspartato (D) ou glicina (G)) e o Domínio VL de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 56). Assim, por exemplo, quando tal Domínio VH do CD3 mAb 1 tem uma glicina (G) como seu resíduo 68, sua sequência é SEQ ID NO: 63, mostrado abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados, a posição Kabat 65 é mostrada em sublinhado duplo):

[00316] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00317] As moléculas de ligação CD3 que possuem um domínio de ligação a vCD3 da presente invenção podem ser reconhecidas com uso de um ensaio de CTL no qual:

[00318] (1) um diacorpo de Antígeno de Câncer biespecífico x CD3 (por exemplo, um diacorpo CD123 x CD3 ou um diacorpo 5T4 x CD3) que potencialmente tem um Domínio de Ligação vCD3, e

[00319] (2) um antígeno biespecífico de câncer x CD3 diacorpo que tem um domínio de ligação rCD3 correspondente (*por exemplo*, o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1),

[00320] são incubados separadamente com células efetoras Pan-T (ou PBMCs) e células tumorais alvo (por exemplo, células MOLM-13 ou A498), por exemplo, em uma efetora: razão de célula alvo de 5:1 (ou 15:1 para PBMCs) por 18, 24 ou 42 horas, e a porcentagem de citotoxicidade (*isto é*, morte celular) e/ou EC_{50} é determinada (por exemplo, medindo-se a liberação de lactato desidrogenase (LDH) na mídia por células danificadas usando-se o CytoTox 96® Kit de ensaio de citotoxicidade não radioativa (Promega)). Em uma modalidade, a liberação de citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-2 pode ser determinada no final do ensaio de CTL. As populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ também podem ser avaliadas quanto à regulação positiva dos marcadores de ativação CD69 e CD25 no final do ensaio de CTL. Uma comparação da porcentagem de citotoxicidade e/ou EC_{50} para o antígeno biespecífico de câncer x diacorpo CD3 que potencialmente tem um domínio de ligação vCD3 com aquele do antígeno de câncer x diacorpo CD3 que tem

os domínios de ligação rCD3 identifica os domínios de ligação vCD3 que exibem a variante desejada Ligação de CD3 e/ou nível reduzido de liberação de citocinas.

[00321] As moléculas de ligação CD3 que possuem um domínio de ligação a vCD3 da presente invenção podem ser alternativamente reconhecidas com uso de um ensaio de ligação no qual:

[00322] (1) um antígeno biespecífico de câncer x CD3 diacorpo que potencialmente tem um domínio de ligação vCD3 e

[00323] (2) um antígeno biespecífico de câncer x CD3 diacorpo que tem um domínio de ligação rCD3 (*por exemplo*, o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1),

[00324] são avaliados separadamente quanto à sua capacidade de se ligarem à superfície de células de linhas de células que expressam antígeno tumoral (células MOLM-13 ou A498) por análise FACS. Resumidamente, as células são incubadas com as moléculas de diacorpo (em tampão FACS que contém 10% de soro AB humano) em placas de microtitulação. As células são então lavadas e incubadas com um anticorpo secundário Fc anti-humano marcado ou com um anticorpo antibobina EK de camundongo conjugado com biotina que reconhece o domínio de promoção de heterodímero bobina E/bobina K (EK) dos diacorpos, misturado com estreptavidina-ficoeritrina. As células são então lavadas e suspensas novamente com tampão FACS e analisadas por citometria de fluxo e comparadas.

[00325] As moléculas de ligação a CD3 que possuem um domínio de ligação a vCD3 da presente invenção podem, alternativamente, ser reconhecidas com uso de, por exemplo, um modelo de xenoenxerto de Comistura, como camundongos NOD/SCID.

Em tal ensaio, os camundongos são injetados com células tumorais (*por exemplo*, células KG1A (AML)) Comisturadas com células T CD4+ ou CD8+ humanas ativadas (E:T = 1:5). O antígeno biespecífico de câncer x diacorpo CD3 que potencialmente tem um domínio de ligação vCD3 ou o antígeno de câncer x diacorpo CD3 que tem o domínio de ligação rCD3 é injetado nos animais e a extensão do crescimento do tumor é monitorada e comparada.

[00326] Alternativamente, qualquer uma, duas ou mais dentre duas das variantes exemplificativas de CD3 mAb 1, designadas no presente documento como "CD3 mAb 1 M3" – "CD3 mAb 1 M26" podem ser empregadas para fornecer o domínio de ligação vCD3 das moléculas de ligação DA x CD3 da presente invenção. A invenção contempla totalmente os anticorpos anti-CD3 com os domínios VL e VH de formiga de CD3 mAb 1 M3 – CD3 mAb 1 M26, em que o domínio VH possui um aspartato (D) na posição 65 de Kabat ou uma glicina (G) na posição 65 de Kabat. As variantes exemplificativas de CD3 mAb 1, CD3 mAb 1 M3 – CD3 mAb 1 M26 possuem domínios de ligação vCD3 que compreendem um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2, um domínio CDR_H3, um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3, em pelo menos um dos quais difere na sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de CDR correspondente do domínio de ligação rCD3 (CD3 mAb 1); e em relação a um domínio de ligação DA x CD3 que compreende o dito domínio de ligação rCD3. Uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende o dito domínio de ligação vCD3 liga CD3 com uma afinidade alterada e tem capacidade de mediar a morte redirecionada e exibir níveis mais baixos de liberação de citocinas.

[00327] As sequências de aminoácidos dos domínios VH anti-CD3 variantes preferidos da presente invenção são

variantes da SEQ ID NO: 55 e são representadas pela SEQ ID NO: 207 (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS $X_1X_2X_3$MNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKX_4RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HX_5NX_6X_7NSX_8ST X_9FAX_{10}WGQGTL VTVSS

[00328] em que: X_1 é T, D, ou E; X_2 é Y, D ou T; X_3 é A ou G; X_4 é D ou G; X_5 é G, D, E, ou K; X_6 é F ou I; X_7 é G ou I; X_8 é Y, A, G, ou Q; X_9 é W, F, ou Y; e X_{10} é Y ou E.

[00329] As sequências de aminoácidos dos domínios VL anti-CD3 variantes preferidos da presente invenção são variantes da SEQ ID NO: 56 e são representadas pela SEQ ID NO: 208 (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GX_1TNX_2RAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC AX_3WYSNLWVF GGGTKLTVLG

[00330] em que: X_1 é G ou D; X_2 é K ou G; e X_3 é L, E ou Q.

B. ANTICORPOS ANTI-CD3 VARIANTE

1. CD3 MAB 1 M1

[00331] O CD3 mAb 1 M1 é uma variante de baixa afinidade do CD3 mAb 1 e, portanto, também é referido como "CD3 mAb 1 baixo". A sequência de aminoácidos do Domínio VH do CD3 mAb 1 M1 é mostrada abaixo como SEQ ID NO: 64 (os resíduos de CDR_H estão sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64 contém uma substituição S100dT (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:64, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT

EDTAVYYCVR HGNFGNSYVT WFAYWGQGTL VTVSS

[00332] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00333] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M1 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M1		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVTWFAY	SEQ ID NO:65
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

2. CD3 MAB 1 M2

[00334] CD3 mAb 1 M2 tem uma taxa de desativação mais rápida do que CD3 mAb 1 e, portanto, também é referido como "CD3 mAb 1 rápido". A sequência de aminoácidos do Domínio VH do CD3 mAb 1 M2 é mostrada abaixo como SEQ ID NO: 66 (os resíduos de CDR_H estão sublinhados). Em relação à SEQ ID NO: 55, a SEQ ID NO: 66 contém substituições G96K e S100dT, numeradas como em Kabat (resíduo de sequência 110, mostrado em sublinhado duplo); adicionalmente, a posição 65, numerada como em Kabat, da SEQ ID NO: 66, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNFGNSYVT WFAYWGQGTL VTVSS

[00335] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00336] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M2 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M2		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57

CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HKNFGNSYVTWFAY	SEQ ID NO:67
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

3. CD3 MAB 1 M3

[00337] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M3 (SEQ ID NO:68) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:68 contém uma substituição G99I (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:68, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFINSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00338] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00339] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M3 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M3		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFINSYVSWFAY	SEQ ID NO:69
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

4. CD3 MAB 1 M4

[00340] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M4 (SEQ ID NO:70) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 contém uma substituição Y100bA (mostrada em sublinhado

duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:70, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSAVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00341] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00342] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M4 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M4		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSAVSWFAY	SEQ ID NO:71
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

5. CD3 MAB 1 M5

[00343] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M5 (SEQ ID NO:72) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:72 contém uma substituição Y100bG (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:72, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSGVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00344] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00345] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M5 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M5		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSGVSWFAY	SEQ ID NO:73
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

6. CD3 MAB 1 M6

[00346] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M6 (SEQ ID NO:74) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:74 contém uma substituição Y100bQ (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:74, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSQVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00347] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00348] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M6 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M6		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSQVSWFAY	SEQ ID NO:75
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

7. CD3 MAB 1 M7

[00349] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M7 (SEQ ID NO:76) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H

são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:76 contém uma substituição G96D (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:76, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HDNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00350] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00351] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M7 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M7		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HDNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:77
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

8. CD3 MAB 1 M8

[00352] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M8 (SEQ ID NO:78) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:78 contém uma substituição G99E (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:78, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HENFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00353] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00354] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M8 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M8		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HENFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:79
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

9. CD3 MAB 1 M9

[00355] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M9 (SEQ ID NO:80) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:80 contém uma substituição G99K (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:80, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G)):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00356] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00357] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M9 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M9		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HKNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:81
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

10. CD3 MAB 1 M10

[00358] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M10 (SEQ ID NO:82) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:82 contém uma substituição F98I (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:82, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNIGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00359] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00360] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M10 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M10		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNIGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:83
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

11. CD3 MAB 1 M11

[00361] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M11 (SEQ ID NO:84) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:84 contém uma substituição W100eF (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:84, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS FFAYWGQGTL VTVSS

[00362] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00363] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M11 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M11		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSFFAY	SEQ ID NO:85
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

12. CD3 MAB 1 M12

[00364] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M12 (SEQ ID NO:86) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:86 contém uma substituição W100eY (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:86, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS YFAYWGQGTL VTVSS

[00365] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00366] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M12 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M12		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57

CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSYFAY	SEQ ID NO:87
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

13. CD3 MAB 1 M13

[00367] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M13 (SEQ ID NO:88) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:88 contém uma substituição Y102E (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:88, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAEWGQGTL VTVSS

[00368] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00369] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M13 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M13		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAE	SEQ ID NO:89
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

14. CD3 MAB 1 M14

[00370] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M14 (SEQ ID NO:90) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55,

SEQ ID NO:90 contém uma substituição T31D (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:90, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00371] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00372] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M14 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M14		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	DYAMN	SEQ ID NO:91
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

15. CD3 MAB 1 M15

[00373] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M15 (SEQ ID NO:92) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:92 contém uma substituição T31E (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:92, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS EYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00374] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00375] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M15 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M15		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	EYAMN	SEQ ID NO:93
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

16. CD3 MAB 1 M16

[00376] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M16 (SEQ ID NO:94) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:94 contém uma substituição Y32D (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:94, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TDAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00377] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00378] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M16 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M16		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TDAMN	SEQ ID NO:95
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61

CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

17. CD3 MAB 1 M17

[00379] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M17 (SEQ ID NO:96) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:96 contém uma substituição Y32T (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:96, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TTAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00380] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00381] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M17 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M17		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TTAMN	SEQ ID NO:97
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

18. CD3 MAB 1 M18

[00382] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M18 (SEQ ID NO:98) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:98 contém uma substituição A33G (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:98, também

mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYGMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00383] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00384] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M18 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M18		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYGMN	SEQ ID NO:99
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

19. CD3 MAB 1 M19

[00385] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M19 (SEQ ID NO:100) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:100 contém substituições G96K e F98I (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:100, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNIGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00386] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00387] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M19 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M19		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HKNIGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:101
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

20. CD3 MAB 1 M20

[00388] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M20 (SEQ ID NO:102) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:102 contém substituições G96K e Y100bG (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:102, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNFGNSGVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00389] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00390] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M20 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M20		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HKNFGNSGVSWFAY	SEQ ID NO:103
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

21. CD3 MAB 1 M21

[00391] A sequência de aminoácidos do domínio VH

de CD3 mAb 1 M21 (SEQ ID NO:104) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:104 contém substituições G96K e W100eF (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:104, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNFGNSYVS FFAYWGQGTL VTVSS

[00392] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00393] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M21 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M21		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HKNFGNSYVSFFAY	SEQ ID NO:105
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

22. CD3 MAB 1 M22

[00394] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD3 mAb 1 M22 (SEQ ID NO:106) é mostrada abaixo (resíduos CDR_H são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:106 contém substituições G96K e W100eY (mostrada em sublinhado duplo e numeradas como em Kabat); adicionalmente, posição 65, numerada como em Kabat, de SEQ ID NO:106, também mostrada em sublinhado duplo, pode ser aspartato (D) ou glicina (G):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA

PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKXRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HKNFGNSYVS YFAYWGQGTL VTVSS

[00395] em que X é aspartato (D) ou glicina (G)

[00396] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VL de CD3 mAb 1 M22 é SEQ ID NO:56.

CD3 mAb 1 M22		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HKNFGNSYVSYFAY	SEQ ID NO:107
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

23. CD3 MAB 1 M23

[00397] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VH de CD3 mAb 1 M23 é SEQ ID NO:55 ou SEQ ID NO:63.

[00398] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD3 mAb 1 M23 (SEQ ID NO:108) é mostrada abaixo (resíduos CDR_L são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:108 contém uma substituição L95E (mostrada em sublinhado duplo e numerada com em Kabat):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC AEWYSNLWVF GGGTKLTVLG

CD3 mAb 1 M23		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	AEWYSNLWV	SEQ ID NO:109
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

24. CD3 MAB 1 M24

[00399] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VH de CD3 mAb 1 M24 é SEQ ID NO:55 ou SEQ ID NO:63.

[00400] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD3 mAb 1 M24 (SEQ ID NO:110) é mostrada abaixo (resíduos CDR_L são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:110 contém uma substituição L95Q (mostrada em sublinhado duplo e numerada com em Kabat):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC AQWYSNLWVF GGGTKLTVLG

CD3 mAb 1 M24		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:61
CDR_L3	AQWYSNLWV	SEQ ID NO:111
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

25. CD3 MAB 1 M25

[00401] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VH de CD3 mAb 1 M25 é SEQ ID NO:55 ou SEQ ID NO:63.

[00402] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD3 mAb 1 M25 (SEQ ID NO:112) é mostrada abaixo (resíduos CDR_L são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:112 contém uma substituição G50D (mostrada em sublinhado duplo e numerada com em Kabat):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GDTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

CD3 mAb 1 M25		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57

CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	DTNKRAP	SEQ ID NO:113
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

26. CD3 MAB 1 M26

[00403] Uma sequência de aminoácidos preferida do domínio VH de CD3 mAb 1 M26 é SEQ ID NO:55 ou SEQ ID NO:63.

[00404] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD3 mAb 1 M26 (SEQ ID NO:114) é mostrada abaixo (resíduos CDR_L são mostrados sublinhados). Em relação à SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:114 contém uma substituição K53G (mostrada em sublinhado duplo):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNGRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

CD3 mAb 1 M26		
CDR	Sequência	SEQ ID NO
CDR_H1	TYAMN	SEQ ID NO:57
CDR_H2	RIRSKYNNYATYYADSVKX	SEQ ID NO:58
CDR_H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:59
CDR_L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:60
CDR_L2	GTNGRAP	SEQ ID NO:115
CDR_L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:62
em que X é aspartato (D) ou glicina (G)		

C. ANTICORPOS EXEMPLIFICATIVOS QUE SE LIGAM A MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR DE UMA CÉLULA EFETORA

[00405] Como usado no presente documento, o termo "célula efetora" denota uma célula que medeia direta ou indiretamente a morte de células alvo (por exemplo, células estranhas, células infectadas ou células cancerosas). Exemplos de células efetoras incluem células T auxiliares, células T citotóxicas, células assassinas naturais (NK), células

plasmáticas (células B secretoras de anticorpos), macrófagos e granulócitos. As moléculas de superfície celular preferidas de tais células incluem CD2, CD3, CD8, CD16, TCR e o receptor NKG2D. Consequentemente, as moléculas capazes de se ligar imunoespecificamente a um epítopo de tais moléculas, ou a outras moléculas da superfície celular efetoras, podem ser utilizadas de acordo com os princípios da presente invenção. Anticorpos exemplificativos, cujos Domínios VH e VL podem ser usadospara construir moléculas capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo são fornecidos abaixo.

1. ANTICORPOS ANTI-CD2 EXEMPLIFICATIVOS

[00406] Em uma modalidade, as moléculas da presente invenção que são capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo se ligarão a uma célula efetora por ligação imunoespecífica a um epítopo CD2 presente na superfície de tal célula efetora. As moléculas que se ligam especificamente ao CD2 incluem o anticorpo anti-CD2 "CD2 mAb Lo-CD2a".

[00407] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de CD2 mAb Lo-CD2a (Número de Acesso ATCC: 11.423); SEQ ID NO: 116) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLQQSGPE LQRPGASVKL SCKASGYIFT EYYMYWVKQR PKQGLELVGR IDPEDGSIDY VEKFKKKATL TADTSSNTAY MQLSSLTSED TATYFCARGK FNYRFAYWGQ GTLVTVSS

[00408] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD2 mAb Lo-CD2a (Número de acesso ATCC: 11.423; SEQ ID NO:117) é mostrado abaixo (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DVVLTQTPPT LLATIGQSVS ISCRSSQSLL HSSGNTYLNW

LLQRTGQSPQ PLIYLVSKLE SGVPNRFSGS GSGTDFTLKI SGVEAEDLGV YYCMQFTHYP YTFGAGTKLE LK

2. ANTICORPOS ANTI-CD8 EXEMPLIFICATIVOS

[00409] Em uma modalidade, as moléculas da presente invenção que são capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo se ligarão a uma célula efetora por ligação imunoespecífica a um epítopo CD8 presente na superfície de tal célula efetora. Os anticorpos que se ligam especificamente ao CD8 incluem os anticorpos anti-CD8 "OKT8" e "TRX2".

[00410] A sequência de aminoácidos do domínio VH de OKT8 (SEQ ID NO:118) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKASGYTFT DYNMHWVKQS HGKSLEWIGY IYPYTGGTGY NQKFKNKATL TVDSSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARNF RYTYWYFDVW GQGTTVTVSS

[00411] A sequência de aminoácidos do domínio VL de OKT8 (SEQ ID NO:119) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYDNSLMHWY QQKPGQPPKV LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI KR

[00412] A sequência de aminoácidos do domínio VH de TRX2 (SEQ ID NO:120) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH YDGYYHFFDS WGQGTLVTVS S

[00413] A sequência de aminoácidos do domínio VL de TRX2 (SEQ ID NO:121) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L

são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIK

VI. CÂNCER EXEMPLIFICATIVO E ANTÍGENOS ASSOCIADOS A PATÓGENO

A. ANTÍGENOS DE CÂNCER EXEMPLIFICATIVOS DISPOSTOS EM MATRIZ NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DE CÂNCER

[00414] Como usado no presente documento, o termo "Antígeno de Câncer" denota um antígeno que é expresso caracteristicamente na superfície de uma célula cancerosa e que pode, assim, ser tratado com uma Molécula com base em Anticorpo ou uma Molécula Imunomoduladora. Exemplos de antígenos de câncer incluem, mas sem limitação: 19,9 como encontrado no câncer de cólon, mucinas do câncer gástrico; 4,2; ADAM-9 (Publicação de Patente número US 2006/0172350; Publicação PCT número WO 06/084075); AH6 como encontrado no câncer gástrico; ALCAM (Publicação PCT número WO 03/093443); APO-1 (antígeno de linfócitos humanos malignos) (Trauth, B.C. *et al.* (1989) *"Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis,"* Science 245:301-304); B1 (Egloff, A.M. *et al.* (2006) *"Cyclin B1 And Other Cyclins As Tumor Antigens In Immunosurveillance And Immunotherapy Of Cancer," Cancer Res.* 66(1):6-9); B7-H3 (Collins, M. *et al.* (2005) *"The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,"* Genome Biol. 6:223.1-223.7). Chapoval, A. *et al.* (2001) *"B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production,"* Nature Immunol. 2:269-274; Sun, M. *et al.* (2002) *"Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes,"* J. Immunol. 168:6294-6297); BAGE (Bodey, B. (2002) *"Cancer-Testis Antigens: Promising Targets*

For Antigen Directed Antineoplastic Immunotherapy," Expert Opin. Biol. Ther. 2(6):577-584); beta-catenin (Prange W. *et al*. (2003) "*Beta-Catenin Accumulation In The Progression Of Human Hepatocarcinogenesis Correlates With Loss Of E-Cadherin And Accumulation Of P53, But Not With Expression Of Conventional WNT-1 Target Genes*," J. Pathol. 201 (2): 250-259); grupo sanguíneo ALe^b/Le^y conforme encontrado no adenocarcinoma de cólon; Antígeno de linfoma de Burkitt-38,13; C14 como encontrado no adenocarcinoma de cólon; CA125 (antígeno de carcinoma de ovário) (Bast, R.C. Jr. *et al*. (2005) "*New Tumor Markers: CA125 And Beyond*," Int. J. Gynecol. Cancer 15(Suppl 3):274-281; Yu *et al.* (1991) "*Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants,*" Cancer Res. 51(2):468-475); Carboxypeptidase M (Publicação de Patente número US 2006/0166291); CD5 (Calin, G.A. *et al*. (2006) "*Genomics Of Chronic Lymphocytic Leukemia MicroRNAs As New Players With Clinical Significance*," Semin. Oncol. 33(2):167-173; CD19 (Ghetie *et al.* (1994) "*Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest,*" Blood 83:1329-1336; Troussard, X. *et al*. 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48); CD20 (Reff *et al.* (1994) "*Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20,*" Blood 83:435-445; Thomas, D.A. *et al*. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. (2006) "*Immunotoxins For Targeted Cancer Therapy*," AAPS J. 8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. *et al*. (2005) "*Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Review Of The Immuno-Architecture*," Curr. Top. Microbiol. Immunol. 294:91-107); CD25 (Troussard, X. *et al*. (1998) "*Hairy Cell Leukemia. What Is New Forty Years After The*

First Description?" Hematol. Cell. Ther. 40(4):139–148); CD27 (Bataille, R. (2006) "*The Phenotype Of Normal, Reactive And Malignant Plasma Cells. Identification Of "Many And Multiple Myelomas" And Of New Targets For Myeloma Therapy*," Haematologica 91(9):1234–1240); CD28 (Bataille, R. (2006) "*The Phenotype Of Normal, Reactive And Malignant Plasma Cells. Identification Of "Many And Multiple Myelomas" And Of New Targets For Myeloma Therapy*," Haematologica 91(9):1234–1240); CD33 (Sgouros *et al.* (1993) "*Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti–CD33) In Acute Myelogenous Leukemia,*" J. Nucl. Med. 34:422–430); CD36 (Ge, Y. (2005) "*CD36: A Multiligand Molecule*," *Lab Hematol.* 11(1):31–7); CD40/CD154 (Messmer, D. *et al.* (2005) "*CD154 Gene Therapy For Human B–Cell Malignancies*," Ann. N. Y. Acad. Sci. 1062:51–60); CD45 (Jurcic, J.G. (2005) "*Immunotherapy For Acute Myeloid Leukemia*," Curr. Oncol. Rep. 7(5):339–346); CD56 (Bataille, R. (2006) "*The Phenotype Of Normal, Reactive And Malignant Plasma Cells. Identification Of "Many And Multiple Myelomas" And Of New Targets For Myeloma Therapy*," Haematologica 91(9):1234–1240); CD46 (Patente número US 7,148,038; PCT Publicação número WO 03/032814); CD52 (Eketorp, S.S. *et al.* (2014) "*Alemtuzumab (Anti–CD52 Monoclonal Antibody) As Single–Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)–A Single Region Experience On Consecutive Patients*," Ann Hematol. 93(10):1725–1733; Suresh, T. *et al.* (2014) "*New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy*," J. Hematol. Oncol. 7:58; Hoelzer, D. (2013) "*Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia*," Curr. Opin. Oncol. 25(6):701–706); CD56 (Bataille, R. (2006) "*The Phenotype Of Normal, Reactive And Malignant Plasma Cells.*

Identification de "Many e Multiple Myelomas" e de New Targets For Myeloma Therapy," Haematologica 91(9):1234-1240); CD79a/CD79b (Troussard, X. *et al.* (1998) "*Hairy Cell Leukemia. What Is New Forty Years After The First Description?*" Hematol. Cell. Ther. 40(4):139-148; Chu, P.G. *et al.* (2001) "*CD79: A Review,*" Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. *et al.* (1998) "*Hairy Cell Leukemia. What Is New Forty Years After The First Description?*" Hematol. Cell. Ther. 40(4):139-148); CD317 (Kawai, S. *et al.* (2008) "*Interferon-A Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models,*" Cancer Science 99(12):2461-2466; Wang, W. *et al.* (2009) *HM1.24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody,*" Cancer Immunology, Immunotherapy 58(6):967-976; Wang, W. *et al.* (2009) "*Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer,*" 63(1):23-31; Sayeed, A. *et al.* (2013) "*Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells,*" PLoS ONE 8(6)e67191, pp. 1-10); CDK4 (Lee, Y.M. *et al.* (2006) "*Targeting Cyclins And Cyclin-Dependent Kinases In Cancer: Lessons From Mice, Hopes For Therapeutic Applications In Human,*" Cell Cycle 5(18):2110-2114); CEA (carcinoembryonic antigen; Foon *et al.* (1995) "*Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine,*" J. Clin. Invest. 96(1):334-42); Mathelin, C. (2006) "*Circulating Proteinic Biomarkers And Breast Cancer,*" Gynecol. Obstet. Fertil. 34(7-8):638-646; Tellez-Avila, F.I. *et al.* (2005) "*The*

Carcinoembryonic Antigen: Apropos Of An Old Friend," Rev. Invest. Clin. 57(6):814–819); CEACAM5/CEACAM6 (Zheng, C. *et al*. (2011) "*A Novel Anti–CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells–Mediated Tumor Immunity*," PLoS One 6(6):e21146, pp. 1–11); CO17–1A (Ragnhammar *et al.* (1993) "*Effect Of Monoclonal Antibody 17–1A And GM–CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma – Long–Lasting, Complete Remissions Can Be Induced,*" Int. J. Cancer 53:751–758); CO–43 (blood group Le^b); CO–514 (blood group Le^a) as found in adenocarcinoma; CTA–1; CTLA–4 (Peggs, K.S. *et al*. (2006) "*Principles And Use Of Anti–CTLA4 Antibody In Human Cancer Immunotherapy*," Curr. Opin. Immunol. 18(2):206–13); Cytokeratin 8 (PCT Publicação número WO 03/024191); D1.1; $D_1$56–22; DR5 (Abdulghani, J. *et al*. (2010) "*TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics*," Expert Opin. Ther. Targets 14(10):1091–1108; Andera, L. (2009) "*Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family*," Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3):173–180; Carlo–Stella, C. *et al*. (2007) "*Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy*," Clin, Cancer 13(8):2313–2317; Chaudhari, B.R. *et al*. (2006) "*Following the TRAIL to Apoptosis*," Immunologic Res. 35(3):249–262); E_1 series (blood group B) as found in pancreatic cancer; EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor; Adenis, A. *et al*. (2003) "*Inhibitors Of Epidermal Growth Factor Receptor And Colorectal Cancer*," Bull. Cancer. 90 Spec No:S228–S232); Ephrin receptors (and in particular EphA2 (Patente número US 7,569,672; PCT Publicação número WO 06/084226); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *et al*. (2002) "*Lung Tumorigenesis Associated With Erb–B–2 And Erb–B–3 Overexpression In Human Erb–B–3 Transgenic Mice Is*

Enhanced By Methylnitrosourea," *Oncogene* 21(57):8732-8740; Rimon, E. *et al.* (2004) "*Gonadotropin-Induced Gene Regulation In Human Granulosa Cells Obtained From IVF Patients: Modulation Of Genes Coding For Growth Factors And Their Receptors And Genes Involved In Cancer And Other Diseases,*" Int. J. Oncol. 24(5):1325-1338); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *et al.* (2006) "*Heterogeneous Expression Of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX Proteins In Esophageal Cancer: Implications For Immunotherapy,*" Int. J. Cancer. 118(1):123-128); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. *et al.* (2005) "*Selection Of GM2, Fucosyl GM1, Globo H And Polysialic Acid As Targets On Small Cell Lung Cancers For Antibody-Mediated Immunotherapy,*" Cancer Immunol. Immunother. 54(10):1018-1025); ganglioside GD2 (G_{D2}; Saleh *et al.* (1993) "*Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen,*" J. Immunol., 151, 3390-3398); ganglioside GD3 (G_{D3}; Shitara *et al.* (1993) "*A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities,*" Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380); ganglioside GM2 (G_{M2}; Livingston *et al.* (1994) "*Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside,*" J. Clin. Oncol. 12:1036-1044); ganglioside GM3 (G_{M3}; Hoon *et al.* (1993) "*Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers,*" Cancer Res. 53:5244-5250); GICA 19-9 (Herlyn *et al.* (1982) "*Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma,*" J. Clin. Immunol. 2:135-140); gp100 (Lotem, M. *et al.* (2006) "*Presentation Of Tumor Antigens By Dendritic Cells Genetically*

Modified With Viral And Nonviral Vectors," J. Immunother. 29(6):616-27); Gp37 (human leukemia T-cell antigen; Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) "*Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3),*" J. Immunol. 141:1398-1403); gp75 (melanoma antigen; Vijayasardahl *et al.* (1990) "*The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product,*" J. Exp. Med. 171(4):1375-1380); gpA33 (Heath, J.K. *et al.* (1997) "*The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin* Superfamily," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 94(2):469-474; Ritter, G. *et al.* (1997) "*Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium*," Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686; Wong, N.A. *et al.* (2006) "*EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia*," J. Clin. Pathol. 59(3):260-263; Almqvist, Y. (2006) "*In vitro and in vivo Characterization of 177Lu-huA33: A Radioimmunoconjugate Against Colorectal Cancer*," Nucl. Med. Biol. 33(8):991-998); HER2 antigen (HER2/neu, $p185^{HER2}$; Pal, S.K. *et al.* (2006) "*Targeting HER2 Epitopes*," Semin. Oncol. 33(4):386-391); HMFG (human milk fat globule antigen; WO1995015171); Human Papillomavirus-E6/Human Papillomavirus-E7 (DiMaio, D. *et al.* (2006) "*Human Papillomaviruses And Cervical Cancer*," Adv. Virus Res. 66:125-59; HMW-MAA (high molecular weight melanoma antigen; Natali *et al.* (1987) "*Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance,*" Cancer 59:55-63; Mittelman *et al.* (1990)

"Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies," J. Clin. Invest. 86:2136-2144); I antigen (differentiation antigen; Feizi (1985) *"Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens,"* Nature 314:53-57); IL13Rα2 (PCT Publicação número WO 2008/146911; Brown, C.E. *et al.* (2013) *"Glioma IL13Rα2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis,"* PLoS One. 18;8(10):e77769; Barderas, R. *et al.* (2012) *"High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis,"* Cancer Res. 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. *et al.* (2011) *"IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Rα2,"* J. Immunol. 187(1):561-569; Bozinov, O. *et al.* (2010) *"Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ralpha2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas,"* Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621; Fujisawa, T. *et al.* (2009) *"A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis,"* Cancer Res. 69(22):8678-8685); Integrin β6 (Publicação PCT número WO 03/087340); JAM-3 (Publicação PCT número WO 06/084078); KID3 (Publicação PCT número WO 05/028498); KID31 (Publicação PCT número WO 06/076584); KS 1/4 antígeno pan-carcinoma (Perez *et al.* (1989) *"Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,"* J. Immunol. 142:3662-3667; Möller *et al.* (1991) *"biespecífico-Monoclonal-anticorpo-Directed Lysis de Ovarian Carcinoma*

células By Activated Human T Lymphocytes," câncer Immunol. Immunother. 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80); L6 and L20 (human lung carcinoma antigens; Hellström *et al.* (1986) "*Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma,"* Cancer Res. 46:3917-3923); LEA; LUCA-2 (Publicação de Patente número US 2006/0172349; Publicação PCT número WO 06/083852); M1:22:25:8; M18; M39; MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. (2002) "*Cancer-Testis Antigens: Promising Targets For Antigen Directed Antineoplastic Immunotherapy*," Expert Opin. Biol. Ther. 2(6):577-584); MART (Kounalakis, N. *et al*. (2005) "*Tumor Cell And Circulating Markers In Melanoma: Diagnosis, Prognosis, And Management*," Curr. Oncol. Rep. 7(5):377-382; mesothelin (Chang, K. *et al*. (1996) "*Molecular Cloning Of Mesothelin, A Differentiation Antigen Present On Mesothelium, Mesotheliomas, And Ovarian Cancers*," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 93:136-140); MUC-1 (Mathelin, C. (2006) "*Circulating Proteinic Biomarkers And Breast Cancer*," Gynecol. Obstet. Fertil. 34(7-8):638-646); MUM-1 (Castelli, C. *et al*. (2000) "*T-Cell Recognition Of Melanoma-Associated Antigens*," J. Cell. Physiol. 182(3):323-331); Myl; N-acetylglucosaminyltransferase (Dennis, J.W. (1999) "*Glycoprotein Glycosylation And Cancer Progression*," Biochim. Biophys. Acta. 6; 1473 (1): 21-34); neoglicoproteína; NS-10 como encontrado em adenocarcinomas; OFA-1; OFA-2; Oncostatina M (Oncostatina Receptor Beta; Patente número US 7.572.896; Publicação PCT número WO 06/084092); p15 (Gil, J. *et al*. (2006) "*Regulation Of The INK4b-ARF-INK4a Tumour Suppressor Locus: All For One Or One For All*," Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7(9):667-677); p97 (melanoma-associated antigen; Estin *et al.* (1989)

"Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97," J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454); PEM (polymorphic epithelial mucin; Hilkens *et al.* (1992) *"Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property,"* Trends in Biochem. Sci. 17: 359-363); PEMA (antígeno de mucina epitelial polimórfico); PIPA (Patente número US 7.405.061; Publicação PCT número WO 04/043239); PSA (antígeno específico da próstata; Henttu *et al.* (1989) *"cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes,"* Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli *et al.* (1993) *"Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen,"* Cancer Res. 53:227-230; Cracco, C.M. *et al.* (2005) *"Immune Response In Prostate Cancer,"* Minerva Urol. Nefrol. 57(4):301-311); PSMA (prostate-specific membrane antigen; Ragupathi, G. (2005) *"Antibody Inducing Polyvalent Cancer Vaccines,"* Cancer Treat. Res. 123:157-180); prostatic acid phosphate (Tailor *et al.* (1990) *"Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone,"* Nucl. Acids Res. 18(16):4928); R_{24} como encontrado no melanoma; ROR1 (Patente número US 5.843.749); esfingolípidos; SSEA-1; SSEA-3; SSEA-4; sTn (Holmberg, L.A. (2001) *"Theratope Vaccine (STn-KLH),"* Expert Opin. Biol. Ther. 1 (5): 881-91); Peptídeo derivado de receptor de células T de um linfoma cutâneo de células T (*consulte* Edelson (1998) *"Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy,"* Cancer J. Sci. Am. 4:62-71); T_5A_7 encontrado em células mieloides; TAG-72 (Yokota *et al.* (1992) *"Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms,"* Cancer Res. 52:3402-3408);

TL5 (grupo sanguíneo A); Receptor de TNF (receptor de TNF-α, receptor de TNF-ß; receptor de TNF-γ (van Horssen, R. *et al.* (2006) "*TNF-Alpha In Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, And Clinical Utility*," Oncologist 11(4):397-408; Gardnerova, M. *et al.* (2000) "*The Use Of TNF Family Ligands And Receptors And Agents Which Modify Their Interaction As Therapeutic Agents*," Curr. Drug Targets 1(4):327-364); TRA-1-85 (grupo sanguíneo H); Receptor de Transferrina (Patente dos número US 7.572.895; Publicação PCT número WO 05/121179); 5T4 (TPBG, glicoproteína trofoblástica; Boghaert, E.R. *et al.* (2008) "*The Oncofetal Protein,* 5T4*, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin*," Int. J. Oncol. 32(1):221-234; Eisen, T. *et al.* (2014) "*Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin*," Curr. Oncol. Rep. 16:370, pp. 1-6); TSTA (antígeno de transplante específico de tumor), como antígenos de tumor induzidos por vírus, incluindo vírus de tumor de DNA de antígeno T e antígenos de envelope de vírus de tumor de RNA, antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína, como CEA de cólon, antígeno oncofetal de tumor de bexiga (Hellström *et al.* (1985) "*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas,*" Cancer. Res. 45:2210-2188); VEGF (Pietrantonio, F. *et al.* (2015) "*Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians*," Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95(3):272-281; Grabowski, J.P. (2015) "*Current Management Of Ovarian Cancer*," Minerva Med. 106(3):151-156; Field, K.M. (2015) "*Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies*," Cancer

121(7):997–1007; Suh, D.H. *et al*. (2015) "*Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014*," J. Gynecol. Oncol. 26(2):156–167; Liu, K.J. *et al*. (2015) "*Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*," Tumour Biol. 36(3):1323-1327; Di Bartolomeo, M. *et al*. (2015) "*Bevacizumab Treatment In The Elderly Patient With Metastatic Colorectal Cancer*," Clin. Interv. Aging 10:127–133); VEGF Receptor (O'Dwyer. P.J. (2006) "*The Present And Future Of Angiogenesis-Directed Treatments Of Colorectal Cancer*," Oncologist 11(9):992–998); VEP8; VEP9; VIM-D5; and Y hapten, Le^y as found in embryonal carcinoma cells. Antígenos de câncer adicionais e moléculas (por exemplo, anticorpos) que os ligam são revelados na Tabela 7. 5T4, B7-H3, CEACAM5/CEACAM6, CD123, DR5, EGFR, um receptor de Efrina, gpA33, HER2/neu, IL13Rα2, ROR1, e VEGF são "Antígenos do Câncer" particularmente preferidos da presente invenção.

Tabela 7
Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo

Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
3F8	Gd2	Neuroblastoma
8H9	B7-H3	Neuroblastoma, Sarcoma, Cânceres Metastáticos de Cérebro
Abagovomab	CA-125	Câncer de Ovário
Adecatumumab	Epcam	Câncer de Mama e Próstata
Afutuzumab	CD20	Linfoma
Alacizumab	VEGFR2	Câncer
Altumomab	CEA	Câncer Colorretal
Amatuximab	Mesotelina	Câncer
Anatumomab Mafenatox	TAG-72	Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Anifrolumab	Receptor A/B de interferão	Lúpus Eritematoso Sistêmico
Anrukinzumab	IL-13	Câncer
Apolizumab	HLA-DR	Cânceres hematológicos
Arcitumomab	CEA	Câncer Gastrointestinal
Atinumab	RTN4	Câncer
Bectumomab	CD22	Linfoma não Hodgkin (detecção)
Belimumab	BAFF	Linfoma não Hodgkin
Bevacizumab	VEGF-A	Câncer Metastático, Retinopatia da Prematuridade
Bivatuzumab	CD44 V6	Carcinoma de Célula Escamosa
Blinatumomab	CD19	Câncer
Brentuximab	CD30 (TNFRSF8)	Cânceres hematológicos
Cantuzumab	MUC1	Cânceres
Cantuzumab Mertansine	Mucin Canag	Câncer Colorretal
Caplacizumab	VWF	Cânceres
Capromab	Células de Carcinoma Prostático	Câncer de Próstata (detecção)
Carlumab	MCP-1	Oncologia/Indicações Imunes
Catumaxomab	Epcam, CD3	Câncer de Ovário, Ascite Maligna, Câncer Gástrico
Cc49	Tag-72	Detecção de tumor
Cetuximab	EGFR	Câncer colorretal metastático e câncer de cabeça e pescoço
Ch.14.18	Indeterminado	Neuroblastoma
Citatuzumab	Epcam	Câncer de ovário e outros tumores sólidos
Cixutumumab	Receptor IGF-1	Tumores Sólidos:
Clivatuzumab	MUC1	Câncer pancreático
Conatumumab	TRAIL-R2	Câncer
Dacetuzumab	CD40	Cânceres hematológicos
Dalotuzumab	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1	Câncer

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Daratumumab	CD38	Câncer
Demcizumab	DLL4	Câncer
Detumomab	Célula de Linfoma B	Linfoma
Drozitumab	DR5	Câncer
Duligotumab	HER3	Câncer
Dusigitumab	ILGF2	Câncer
Ecromeximab	GD3 Ganglioside	Malignant Melanoma
Eculizumab	C5	Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria
Edrecolomab	Epcam	Colorectal Carcinoma
Elotuzumab	SLAMF7	Multiple Myeloma
Elsilimomab	IL-6	Câncer
Enavatuzumab	TWEAK Receptor	Câncer
Enlimomab	ICAM-1 (CD54)	Câncer
Enokizumab	IL9	Asthma
Enoticumab	DLL4	Câncer
Ensituximab	5AC	Câncer
Epitumomab Cituxetan	Episialin	Câncer
Epratuzumab	CD22	câncer, SLE
Ertumaxomab	HER2/Neu, CD3	Câncer de mama
Etaracizumab	Integrin $A_v\beta_3$	Melanoma, Prostate câncer, Ovarian câncer
Faralimomab	Receptor de interferão	Câncer
Farletuzumab	Receptor de Folato 1	Câncer de ovário
Fasinumab	HNGF	Câncer
Fbta05	CD20	Leucemia Linfocítica Crônica
Ficlatuzumab	HGF	Câncer
Figitumumab	Receptor IGF-1	Carcinoma adrenocortical, carcinoma de pulmão de células não pequenas
Flanvotumab	TYRP1 (Glicoproteína 75)	Melanoma

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Fontolizumab	IFN-γ	Doença de Crohn
Fresolimumab	TGF-B	Fibrose Pulmonar Idiopática, Glomerulosclerose Segmentar Focal, Câncer
Futuximab	EGFR	Câncer
Galiximab	CD80	Linfoma de célula B
Ganitumab	IGF-I	Câncer
Gemtuzumab Ozogamicin	CD33	Leucemia Mielóide Aguda
Gevokizumab	IL-1β	Diabetes
Girentuximab	Anidrase carbônica 9 (CA-IX)	Carcinoma de células renais de células claras
Glembatumumab Vedotin	GPNMB	Melanoma, câncer de mama
Golimumab	TNF-A	Artrite Reumatóide, Artrite Psoriática, Espondilite Anquilosante
Ibritumomab Tiuxetan	CD20	Linfoma não Hodgkin
Icrucumab	VEGFR-1	Câncer
Igovomab	CA-125	Câncer de ovário (Diagnóstico)
Imab362	Cldn18.2	Adenocarcinomas Gastrointestinais e Tumor Pancreático
Imgatuzumab	EGFR	Câncer
Inclacumab	Selectina P	Câncer
Indatuximab Ravtansine	SDC1	Câncer
Inotuzumab Ozogamicin	CD22	Câncer
Intetumumab	CD51	Tumores Sólidos (câncer de próstata, Melanoma)
Ipilimumab	CD152	Melanoma
Iratumumab	CD30 (TNFRSF8)	Linfoma de Hodgkin
Itolizumab	CD6	Câncer
Labetuzumab	CEA	Câncer Colorretal

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Lambrolizumab	PDCD1	Agente antineoplásico
Lampalizumab	CFD	Câncer
Lexatumumab	TRAIL-R2	Câncer
Libivirumab	Antígeno de superfície de hepatite B	Hepatite B
Ligelizumab	IGHE	Câncer
Lintuzumab	CD33	Câncer
Lirilumab	KIR2D	Câncer
Lorvotuzumab	CD56	Câncer
Lucatumumab	CD40	Mieloma múltiplo, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin
Lumiliximab	CD23	Leucemia Linfocítica Crônica
Mapatumumab	TRAIL-R1	Câncer
Margetuximab	Ch4d5	Câncer
Matuzumab	EGFR	Câncer colorretal, pulmonar e de estômago
Milatuzumab	CD74	Mieloma múltiplo e outras malignidades hematológicas
Minretumomab	TAG-72	Câncer
Mitumomab	Gangliosídeo GD3	Carcinoma de Pulmão de Células Pequenas
Mogamulizumab	CCR4	Câncer
Morolimumab	Fator rhesus	Câncer
Moxetumomab Pasudotox	CD22	Câncer
Nacolomab Tafenatox	Antígeno C242	Câncer Colorretal
Namilumab	CSF2	Câncer
Naptumomab Estafenatox	5T4	Carcinoma de pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais
Narnatumab	RON	Câncer
Nebacumab	Endotoxina	Sepse
Necitumumab	EGFR	Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas
Nerelimomab	TNF-A	Câncer

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Nesvacumab	Angiopoietina 2	Câncer
Nimotuzumab	EGFR	Carcinoma de células escamosas, Câncer de cabeça e pescoço, Câncer nasofaríngeo, Glioma
Nivolumab	PD-1	Câncer
Nofetumomab Merpentan	Indeterminado	Câncer
Ocaratuzumab	CD20	Câncer
Ofatumumab	CD20	Leucemia Linfocítica Crônica
Olaratumab	PDGF-R A	Câncer
Olokizumab	IL6	Câncer
Onartuzumab	Quinase de Receptor de fator de dispersão humano	Câncer
Ontuxizumab	TEM1	Câncer
Oportuzumab Monatox	Epcam	Câncer
Oregovomab	CA-125	Câncer de ovário
Orticumab	Oxldl	Câncer
Otlertuzumab	CD37	Câncer
Panitumumab	EGFR	Câncer Colorretal
Pankomab	Glicosilação tumoral específica de MUC1	Câncer de ovário
Parsatuzumab	EGFL7	Câncer
Patritumab	HER3	Câncer
Pembrolizumab	PD-1	Câncer
Pemtumomab	MUC1	Câncer
Perakizumab	IL17A	Artrite
Pertuzumab	HER2/Neu	Câncer
Pidilizumab	PD-1	Câncer e doenças infecciosas
Pinatuzumab Vedotin	CD22	Câncer

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Pintumomab	Antígeno de Adenocarcinoma	Adenocarcinoma
Placulumab	TNF Humano	Câncer
Polatuzumab Vedotin	CD79B	Câncer
Pritoxaximab	Toxina *E. Coli* Shiga Tipo-1	Câncer
Pritumumab	Vimentina	Câncer de cérebro
Quilizumab	IGHE	Câncer
Racotumomab	Ácido N-glicolilneuramínico	Câncer
Radretumab	Domínio B de Fibronectina Extra	Câncer
Ramucirumab	VEGFR2	Tumores Sólidos
Rilotumumab	HGF	Tumores Sólidos
Rituximab	CD20	Linfomas, leucemias, alguns distúrbios autoimunes
Robatumumab	Receptor IGF-1	Câncer
Roledumab	RHD	Câncer
Samalizumab	CD200	Câncer
Satumomab Pendetide	TAG-72	Câncer
Seribantumab	ERBB3	Câncer
Setoxaximab	Toxina *E. Coli* Shiga Tipo-1	Câncer
Sgn-CD19a	CD19	Leucemia linfoblástica aguda e linfoma não Hodgkin de célula B
Sgn-CD33a	CD33	Leucemia mielóide aguda
Sibrotuzumab	FAP	Câncer
Siltuximab	IL-6	Câncer
Solitomab	Epcam	Câncer
Sontuzumab	Episialin	Câncer
Tabalumab	BAFF	Cânceres de célula B

Tabela 7 Anticorpo e Moléculas com base em anticorpo		
Nome de anticorpo	Antígenos de câncer	Aplicação terapêutica alvo
Tacatuzumab Tetraxetan	Fetoproteína alfa	Câncer
Taplitumomab Paptox	CD19	Câncer
Telimomab	Indeterminado	Câncer
Tenatumomab	Tenascina C	Câncer
Teneliximab	CD40	Câncer
Teprotumumab	CD221	Tumores Hematológicos
Ticilimumab	CTLA-4	Câncer
Tigatuzumab	TRAIL-R2	Câncer
Tnx-650	Il-13	Linfoma de Hodgkin
Tositumomab	CD20	Linfoma Folicular
Tovetumab	CD140a	Câncer
Trastuzumab	HER2/Neu	Câncer de mama
Trbs07	Gd2	Melanoma
Tremelimumab	CTLA-4	Câncer
Tucotuzumab Celmoleukin	Epcam	Câncer
Ublituximab	MS4A1	Câncer
Urelumab	4-1BB	Câncer
Vantictumab	Receptor Frizzled	Câncer
Vapaliximab	AOC3 (VAP-1)	Câncer
Vatelizumab	ITGA2	Câncer
Veltuzumab	CD20	Linfoma não Hodgkin
Vesencumab	NRP1	Câncer
Volociximab	Integrina A5β1	Tumores Sólidos
Vorsetuzumab	CD70	Câncer
Votumumab	Tumor antígeno CTAA16.88	Tumores colorretais
Zalutumumab	EGFR	Carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço
Zatuximab	HER1	Câncer
Ziralimumab	CD147	Câncer

[00415] Anticorpos exemplificativos, cujos domínios VH e VL podem ser usados para construir as moléculas

de ligação da presente invenção que são capazes de se ligar a um antígeno de câncer disposto em matriz na superfície de uma célula cancerosa e mediar a morte redirecionada de tais células cancerosas estão listados na Tabela 7 acima, anticorpos adicionais que podem ser usados para construir moléculas capazes de se ligar a um antígeno de câncer disposto em matriz na superfície de uma célula de câncer e mediar a morte redirecionada de tais células de câncer são fornecidos abaixo.

1. ANTICORPOS ANTI-B7-H3 EXEMPLIFICATIVOS

[00416] B7-H3 é um antígeno de câncer que é superexpresso em uma ampla variedade de tipos de tumor sólido e é um membro da família B7 de moléculas que estão envolvidas na regulação imunológica (consulte Patente números US 8.802.091; US 2014/0328750; US 2013/0149236; Loo, D. *et al.* (2012) "*Development Of An Fc-Enhanced Anti-B7-H3 Monoclonal Antibody With Potent Antitumor Activity*," Clin. Cancer Res. 18(14):3834-3845). Em particular, vários estudos independentes mostraram que as células cancerosas malignas humanas (*por exemplo*, células cancerosas de neuroblastomas e cânceres gástrico, de ovário, pancreático e de células não pequenas do pulmão) exibem um aumento acentuado na expressão da proteína B7-H3 e que isso aumentou a expressão foi associada ao aumento da gravidade da doença (Zang, X. *et al.* (2007) "*The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition*," Clin. Cancer Res. 13: 5271-5279), sugerindo que B7-H3 é explorado por tumores como uma via de evasão imune (Hofmeyer, K. *et al.* (2008) "*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 105(30):10277-10278).

[00417] B7-H3 também foi encontrado para coestimular a proliferação de células T CD4+ e CD8+. B7-H3

também estimula a produção de IFN-γ e a atividade lítica de CD8+ (Chapoval, A. *et al.* (2001) "*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production*," Nature Immunol. 2:269-274; Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126). No entanto, a proteína também possivelmente atua através dos fatores NFAT (fator nuclear para células T ativadas), NF-κB (fator nuclear kappa B) e AP-1 (Proteína Ativadora-1) para inibir a ativação de células T (Yi. K.H. *et al.* (2009) "Fine *Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*," Immunol. Rev. 229:145-151). Também se acredita que B7-H3 inibe Th1, Th2 ou Th17 *in vivo* (Prasad, D.V. *et al.* (2004) "*Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells*," J. Immunol. 173:2500-2506; Fukushima, A. *et al.* (2007) "*B7-H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice*," Immunol. Lett. 113:52-57; Yi. K.H. *et al.* (2009) "Fine *Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*," Immunol. Rev. 229:145-151).

[00418] As moléculas de ligação de B7-H3 preferidas possuem os domínios VL e/ou VH, de anticorpo monoclonal B7-H3 anti-humano humanizado "B7-H3 mAb-B", "B7-H3 mAb-C," "B7-H3 mAb- D "ou qualquer um dos anticorpos anti-B7-H3 fornecidos no presente documento; e mais preferencialmente possuem 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do Domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do Domínio VH de tais anticorpos monoclonais anti-B7-H3.

[00419] Após a humanização, o anticorpo B7-H3 mAb-B produziu dois domínios VH variantes, B7-H3 mAb-B VH1 e B7-H3 mAb-B VH2; e dois domínios VL variantes B7-H3 mAb-B VH1 VL1 e B7-H3 mAb-B VL2, que podem ser usados em qualquer combinação de domínios VH/VL para produzir um domínio de ligação B7-H3

funcional.

[00420] A sequência de aminoácidos do domínio VH de B7-H3 mAb-B VH1 é SEQ ID NO:122 (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

[00421] A sequência de aminoácidos do domínio VH de B7-H3 mAb-B VH2 é SEQ ID NO:123 (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT IYPGGGDTRY TQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

[00422] A sequência de aminoácidos do domínio VL de B7-H3 mAb-B VL1 é SEQ ID NO:124 (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

[00423] A sequência de aminoácidos do domínio VL de B7-H3 mAb-B VL2 é SEQ ID NO:125 (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

[00424] A sequência de aminoácidos do domínio VH de B7-H3 mAb-C humanizado é SEQ ID NO:126 (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED

TAVYYCARHD GGAMDYWGQG TTVTVSS

[00425] A sequência de aminoácidos do domínio VL de B7-H3 mAb-C humanizado é SEQ ID NO:127 (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASESIY SYLAWYQQKP GKAPKLLVYN TKTLPEGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYGTPPWTFG QGTRLEIK

[00426] A sequência de aminoácidos do domínio VH de B7-H3 mAb-D (SEQ ID NO:128) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados).

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHG YRYEGFDYWG QGTTVTVSS

[00427] A sequência de aminoácidos do domínio VL de B7-H3 mAb-D (SEQ ID NO:129) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados).

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGQ GTKLEIK

[00428] Particularmente preferidas, são as moléculas de ligação B7-H3 que possuem um domínio VH e/ou VL humanizado, incluindo, mas sem limitação "Enoblituzumab" (também conhecido como MGA271; CAS Reg número 1353485-38-7). Enoblituzumab é um anticorpo monoclonal otimizado para Fc que se liga a HER2/neu e medeia a atividade ADCC aumentada. As sequências de aminoácidos das Cadeias Pesadas e Leves completas de Enoblituzumab são conhecidas na técnica (consulte, por exemplo, WHO Drug Information, 2017, Recommended INN: List 77, 31(1):49). A sequência de aminoácidos do domínio VH de Enoblituzumab é (SEQ ID NO:130) (CDR_Hs são sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

[00429] A sequência de aminoácidos do domínio VL de Enoblituzumab é (SEQ ID NO:131) (CDR_Ls são sublinhados):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ GTKLEIK

[00430] Além das moléculas de ligação anti-B7-H3 preferidas identificadas acima, a invenção contempla o uso de qualquer uma das seguintes moléculas de ligação anti-B7-H3: LUCA1; BLA8; PA20; ou SKN2 (consulte Patentes US números 7.527.969; 8.779.098 e Publicação de Patente PCT WO 2004/001381); M30; cM30; M30-H1-L1; M30-H1-L2; M30-H1-L3; M30-H1-L4; M30-H1-L5; M30-H1-L6; M30-H1-L7; M30-H4-L1; M30-H4-L2; M30-H4-L3; e M30-H4-L4 (consulte, Publicação de Patente US 2013/0078234 e Publicação de Patente PCT WO 2012/147713); e 8H9 (consulte Patentes números US 7.666.424; 7.737.258; 7.740.845; 8.148.154; 8.414.892; 8.501.471; 9.062.110; Publicação de Patente US 2010/0143245 e Publicação de Patente PCT WO 2008/116219).

2. ANTICORPOS ANTI-CEACAM5 E ANTI-CEACAM6 EXEMPLIFICATIVOS

[00431] Foi constatado que as moléculas de adesão celular 5 (CEACAM5) e 6 (CEACAM6) relacionadas ao antígeno carcinoembrionário estão associadas a vários tipos de câncer, incluindo câncer medular da tireoide, câncer colorretal, câncer pancreático, carcinoma hepatocelular, câncer gástrico, câncer de pulmão, cânceres de cabeça e pescoço, câncer de bexiga urinária, câncer de próstata, câncer uterino, câncer

endometrial, câncer de mama, câncer hematopoiético, leucemia e câncer de ovário (Publicação PCT número WO 2011/034660), e particularmente câncer colorretal, gastrointestinal, pancreático, de células não pequenas (NSCL), carcinomas de mama, tireóide, estômago, ovário e uterino (Zheng, C. *et al*. (2011) "*A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity*," PLoS One 6(6):e21146, pp. 1-11).

[00432] CEACAM5 foi encontrado para ser superexpresso em 90% dos cânceres gastrointestinais, colorretais e pancreáticos, 70% das células de câncer de pulmão de células não pequenas e 50% dos cânceres de mama (Thompson, J.A. *et al*. (1991) "*Carcinoembryonic Antigen Gene Family: Molecular Biology And Clinical Perspectives*," J. Clin. Lab. Anal. 5:344-366). A molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário superexpresso 6 (CEACAM6) desempenha papéis importantes na invasão e metástase de uma variedade de cânceres humanos, incluindo câncer medular da tireoide, câncer colorretal, câncer pancreático, carcinoma hepatocelular, câncer gástrico, câncer de pulmão, cânceres de cabeça e pescoço, câncer da bexiga urinária, câncer da próstata, câncer do útero, câncer do endométrio, câncer da mama, câncer hematopoiético, leucemia e câncer do ovário (Publicação PCT número WO 2011/034660; Deng, X. *et al*. (2014) "*Expression Profiling Of CEACAM6 Associated With The Tumorigenesis And Progression In Gastric Adenocarcinoma*," Genet. Mol. Res. 13(3):7686-7697; Cameron, S. *et al*. (2012) "*Focal Overexpression Of CEACAM6 Contributes To Enhanced Tumourigenesis In Head And Neck Cancer Via Suppression Of Apoptosis*," Mol. Cancer 11:74, pp. 1-11; Chapin, C. *et al*.

(2012) "*Distribution And Surfactant Association Of Carcinoembryonic Cell Adhesion Molecule 6 In Human Lung*," Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 302(2):L216-L25; Riley, C.J. *et al.* (2009) "*Design And Activity Of A Murine And Humanized Anti-CEACAM6 Single-Chain Variable Fragment In The Treatment Of Pancreatic Cancer*," Cancer Res. 69(5):1933-1940; Lewis-Wambi, J.S. *et al.* (2008) "*Overexpression Of CEACAM6 Promotes Migration And Invasion Of Oestrogen-Deprived Breast Cancer Cells*," Eur. J. Cancer 44(12):1770-1779; Blumenthal, R.D. *et al.* (2007) "*Expression Patterns Of CEACAM5 And CEACAM6 In Primary And Metastatic Cancers*," BMC Cancer. 7:2, pp. 1-15). Os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a CEACAM5 e CEACAM6 estão disponíveis comercialmente (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Novus Biologicals LLC; Abnova Corporation).

[00433] A sequência de aminoácidos do Domínio VH do anticorpo 16C3 anti-CEACAM5/ANTI-CEACAM6 humanizado (EP 2585476) (SEQ ID NO: 132) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_H estão sublinhados):

QVQLQQSGPE VVRPGVSVKI SCKGSGYTFT DYAMHWVKQS HAKSLEWIGL ISTYSGDTKY NQNFKGKATM TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCARGD YSGSRYWFAY WGQGTLVTVS S

[00434] A sequência de aminoácidos do Domínio VL do anticorpo 16C3 anti-CEACAM5/ANTI-CEACAM6 humanizado (EP 2585476) (SEQ ID NO: 133) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_L estão sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCGASENIY GALNWYQRKP GKSPKLLIWG ASNLADGMPS RFSGSGSGRQ YTLTISSLQP EDVATYYCQN VLSSPYTFGG GTKLEIK

[00435] A sequência de aminoácidos do Domínio VH

do anticorpo anti-CEACAM5/CEACAM6 humanizado hMN15 (WO 2011/034660) (SEQ ID NO: 134) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSSSGFALT DYYMSWVRQA PGKGLEWLGF IANKANGHTT DYSPSVKGRF TISRDNSKNT LFLQMDSLRP EDTGVYFCAR DMGIRWNFDV WGQGTPVTVS S

[00436] A sequência de aminoácidos do Domínio VL do anticorpo anti-CEACAM5/CEACAM6 humanizado hMN15 (WO 2011/034660) (SEQ ID NO: 135) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT MTCSASSRVS YIHWYQQKPG KAPKRWIYGT STLASGVPAR FSGSGSGTDF TFTISSLQPE DIATYYCQQW SYNPPTFGQG TKVEIKR

[00437] A presente invenção inclui e abrange especificamente moléculas de ligação CEACAM5/CEACAM6 (por exemplo, moléculas de ligação biespecíficas CEACAM5/CEACAM6 x CD3) que são capazes de se ligar a CEACAM5 e/ou CEACAM6, e particularmente tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Ls do Domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Hs do Domínio VH dos anticorpos monoclonais anti-CEACAM5/CEACAM6 16C3 ou hMN15.

3. ANTICORPOS ANTI-EGRF EXEMPLIFICATIVOS

[00438] O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um antígeno de câncer de determinado câncer colorretal metastático, câncer de pulmão de células não pequenas metastático e câncer de cabeça e pescoço. Anticorpos exemplificativos que se ligam ao EGRF humano são "Cetuximab" e "Panitumumab". Cetuximab é um receptor de fator de crescimento epidérmico quimérico humano-camundongo (EGFR) IgG1 anticorpo monoclonal (Govindan R. (2004) "*Cetuximab In*

Advanced Non-Small Cell Lung Cancer," Clin. Cancer Res. 10(12 Pt 2):4241s-4244s; Bou-Assaly, W. *et al*. (2010) "*Cetuximab (Erbitux)*," Am. J. Neuroradiol. 31(4):626-627). Panitumumab (Vectibix®, Amgen) é um anticorpo monoclonal IgG2 receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) totalmente humanizado (Foon, K.A. *et al*. (2004) "*Preclinical And Clinical Evaluations Of ABX-EGF, A Fully Human Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody*," Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58(3):984-990; Yazdi, M.H. *et al*. (2015) "*A Comprehensive Review of Clinical Trials on EGFR Inhibitors Such as Cetuximab and Panitumumab as Monotherapy and in Combination for Treatment of Metastatic Colorectal Cancer*," Avicenna J. Med. Biotechnol. 7(4):134-144).

[00439] A sequência de aminoácidos do Domínio VH do anticorpo anti-EGFR quimérico Cetuximab (SEQ ID NO: 136) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLKQSGPG LVQPSQSLSI TCTVSGFSLT NYGVHWVRQS PGKGLEWLGV IWSGGNTDYN TPFTSRLSIN KDNSKSQVFF KMNSLQSNDT AIYYCARALT YYDYEFAYWG QGTLVTVSA

[00440] A sequência de aminoácidos do Domínio VL do anticorpo anti-EGFR quimérico Cetuximab (SEQ ID NO: 137) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DILLTQSPVI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TNIHWYQQRT NGSPRLLIKY ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ NNNWPTTFGA GTKLELKR

[00441] A sequência de aminoácidos do domínio VH de Panitumumab (SEQ ID NO:138) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SGDYYWTWIR QSPGKGLEWI GHIYYSGNTN YNPSLKSRLT ISIDTSKTQF SLKLSSVTAA DTAIYYCVRD RVTGAFDIWG QGTMVTVSS

[00442] A sequência de aminoácidos do domínio VL de Panitumumab (SEQ ID NO:139) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYFCQH FDHLPLAFGG GTKVEIKR

[00443] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação EGFR (por exemplo, moléculas de ligação biespecíficas EGFR x CD3) que são capazes de se ligar a EGFR, e particularmente tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Hs do domínio VH dos anticorpos monoclonais anti-EGFR Cetuximab ou Panitumumab.

4. ANTICORPOS ANTI-EPHA2 EXEMPLIFICATIVOS

[00444] O receptor tirosina quinase, receptor 2 de Efrina tipo A (EphA2), é normalmente expresso em locais de contato célula a célula em tecidos epiteliais adultos, no entanto, estudos recentes têm mostrado que também é superexpresso em vários tipos de carcinomas epiteliais, com o maior nível de expressão de EphA2 observado em lesões metastáticas. Altos níveis de expressão de EphA2 foram encontrados em uma ampla gama de cânceres e em várias linhas de células cancerosas, incluindo câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão de células não pequenas e melanoma (Xu, J. *et al*. (2014) "*High EphA2 Protein Expression In Renal Cell Carcinoma Is Associated With A Poor Disease Outcome*," Oncol. Lett. Aug 2014; 8(2): 687-692; Miao, B. *et al*. (2014) "*EphA2*

is a Mediator of Vemurafenib Resistance and a Novel Therapeutic Target in Melanoma," Cancer Discov. pii: CD-14-0295). EphA2 não parece ser meramente um marcador de câncer, mas parece ser persistentemente superexpresso e funcionalmente alterado em vários cânceres humanos (Chen, P. *et al*. (2014) "*EphA2 Enhances The Proliferation And Invasion Ability Of LnCap Prostate Cancer Cells*," Oncol. Lett. 8(1):41-46). Anticorpos exemplificativos que se ligam ao EphA2 humano são "EphA2 mAb 1", "EphA2 mAb 2" e "EphA2 mAb 3".

[00445] A sequência de aminoácidos do domínio VH de EphA2 mAb 1 (SEQ ID NO:140) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLS RYSVHWVRQP PGKGLEWLGM IWGGGSTDYN SALKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT AMYYCARKHG NYYTMDYWGQ GTSVTVSS

[00446] A sequência de aminoácidos do domínio VL de EphA2 mAb 1 (SEQ ID NO:141) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQMTQTTSS LSASLGDRIT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GYTLYTFGGG TKLEIK

[00447] A sequência de aminoácidos do domínio VH de EphA2 mAb 2 (SEQ ID NO:142) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGFTFT NYGMNWVKQA PGKGLKWMGW INTYIGEPTY ADDFKGRFVF SLETSASTAY LQINNLKNED MATYFCAREL GPYYFDYWGQ GTTLTVSS

[00448] A sequência de aminoácidos do domínio VL de EphA2 mAb 2 (SEQ ID NO:143) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSSGNTYLHW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP TFGSGTKLEI K

[00449] A sequência de aminoácidos do domínio VH de EphA2 mAb 3 (SEQ ID NO:144) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG SVKPGGSLKL SCAASGFTFT DHYMYWVRQT PEKRLEWVAT ISDGGSFTSY PDSVKGRFTI SRDIAKNNLY LQMSSLKSED TAMYYCTRDE SDRPFPYWGQ GTLVTVSS

[00450] A sequência de aminoácidos do domínio VL de EphA2 mAb 3 (SEQ ID NO:145) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DIVLTQSHRS MSTSVGDRVN ITCKASQDVT TAVAWYQQKP GQSPKLLIFW ASTRHAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISSVQA GDLALYYCQQ HYSTPYTFGG GTKLEIK

[00451] O presente pedido inclui especificamente e abrange as moléculas de ligação EphA2 (*por exemplo*, moléculas de ligação biespecíficas EphA2 x CD3) que são capazes de se ligar a EphA2 e, particularmente, tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do domínio VH de anticorpos monoclonais anti-EphA2 EphA2 mAb 1, EphA2 mAb 2 e EphA2 mAb 3. Domínio VH de anti-EphA2 monoclonal anticorpos EphA2 mAb 1, EphA2 mAb 2 e EphA2 mAb 3.

5. ANTICORPOS ANTI-GPA33 EXEMPLIFICATIVOS

[00452] A glicoproteína transmembranar A33 de 43kD (gpA33) é expressa em >95% de todos os carcinomas colorretais (Heath, J.K. *et al.* (1997) "*The Human A33 Antigen Is A Transmembrane* Glycoprotein *And A Novel Member Of The*

Immunoglobulin Superfamily," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 94(2):469-474; Ritter, G. *et al*. (1997) "*Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium*," Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686; Wong, N.A. *et al*. (2006) "*EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia*," J. Clin. Pathol. 59(3):260-263). Um anticorpo exemplificativo que se liga a gpA33 humano é "gpA33 mAb 1".

[00453] A sequência de aminoácidos do domínio VH de gpA33 mAb 1 (SEQ ID NO:146) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GSWMNWVRQA PGQGLEWIGR IYPGDGETNY NGKFKDRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARIY GNNVYFDVWG QGTTVTVSS

[00454] A sequência de aminoácidos do domínio VL de gpA33 mAb 1 (SEQ ID NO:147) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCSARSSIS FMYWYQQKPG KAPKLLIYDT SNLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLEAE DAATYYCQQW SSYPLTFGQG TKLEIK

[00455] O presente pedido inclui especificamente e abrange as moléculas de ligação gpA33 (*por exemplo*, moléculas de ligação biespecíficas gpA33x CD3) que são capazes de se ligar a gpA33, e particularmente tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos 3 dos CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Hs do domínio VH de anticorpos monoclonais anti-gpA33 gpA33 mAb 1, ou de qualquer um dos anticorpos monoclonais anti-gpA33 fornecidos em WO 2015/026894. A presente invenção inclui adicionalmente

e abrange as moléculas de ligação biespecíficas gpA33 x CD3 exemplificativas fornecidas em WO 2015/026894.

6. ANTICORPOS ANTI-HER2/NEU EXEMPLIFICATIVOS

[00456] HER2/neu é uma proteína receptora de 185 kDa que foi originalmente identificada como o produto do gene transformador de neuroblastomas de ratos tratados quimicamente. HER2-neu foi extensivamente investigado devido ao seu papel em vários carcinomas humanos (incluindo câncer de mama e gástrico) e no desenvolvimento de mamíferos (Hynes *et al*. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1198:165-184; Dougall *et al*. (1994) Oncogene 9:2109-2123; Lee *et al*. (1995) Nature 378:394-398). Anticorpos exemplificativos que se ligam a HER2/neu humano incluem "Margetuximab", "Trastuzumab" e "Pertuzumab". Margetuximab (também conhecido como MGAH22; CAS Reg número 1350624-75-7) é um anticorpo monoclonal otimizado para Fc que se liga a HER2/neu e medeia a atividade ADCC aumentada. Trastuzumab (também conhecido como rhuMAB4D5, e comercializado como HERCEPTIN®; CAS Reg número 180288-69-1; consulte Patente número US 5.821.337) é a versão humanizada do anticorpo 4D5, tendo regiões constantes IgG1/kappa. Pertuzumab (também conhecido como rhuMAB2C4 e comercializado como PERJETA™; CAS Reg número 380610-27-5; consulte por exemplo, WO2001/000245) é uma versão humanizada do anticorpo 2C4 que tem regiões constantes IgG1/kappa.

[00457] O presente pedido inclui especificamente e abrange a molécula de ligação Her2/Neu (*por exemplo*, Moléculas de ligação biespecíficas Her2/Neu x CD3) que são capazes de se ligar a Her2/Neu, e particularmente tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Ls do Domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Hs do Domínio

VH dos anticorpos monoclonais anti-Her2/Neu Margetuximab, Trastuzumab ou Pertuzumab.

[00458] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de Margetuximab é (SEQ ID NO: 148) (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGASVTVSS

[00459] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de Margetuximab é (SEQ ID NO: 149) (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIK

[00460] As sequências de aminoácidos das cadeias pesadas e leves completas de Margetuximab são conhecidas na técnica (consulte, *por exemplo*, WHO Drug Information, 2014, Recommended INN: Lista 71, 28(1):93 a 94).

[00461] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de Trastuzumab é (SEQ ID NO: 150) (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK **DTYIH**WVRQA PGKGLEWVA**R IYPTNGYTRY ADSVKG**RFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSR**WG GDGFYAMDY**W GQGTLVTVSS

[00462] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de Trastuzumab é (SEQ ID NO: 151) (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQDVN TAVA**WYQQKP GKAPKLLIY**S ASFLY**SGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QQ HYTTPPT**FGQ GTKVEIK

[00463] A sequência de aminoácidos do Domínio VH de Pertuzumab é (SEQ ID NO: 152) (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT DYTMDWVRQA PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPSFYFDYWG QGTLVTVSS

[00464] A sequência de aminoácidos do Domínio VL de Pertuzumab é (SEQ ID NO: 153) (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ GTKVEIK

[00465] Além das moléculas de ligação anti-HER2/neu preferidas acima identificadas, a invenção contempla as moléculas de ligação Her2/Neu que compreendem o domínio VL e/ou VH e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do Domínio VH de qualquer uma das seguintes moléculas de ligação anti-Her-2: 1,44,1; 1,140; 1,43; 1,14,1; 1,100,1; 1,96; 1,18,1; 1,20; 1,39; 1,24; e 1,71,3 (Patentes números US 8.350.011; 8.858.942; e Publicação de Patente PCT WO 2008/019290); F5 e C1 (Patentes números US 7.892.554; 8.173.424; 8.974.792; e Publicação de Patente PCT WO 99/55367); e também as moléculas de ligação anti-Her-2 da Publicação de Patente US2013017114 e Publicação de Patente PCT números WO2011 / 147986 e WO 2012/143524). A presente invenção inclui adicionalmente e abrange as moléculas de ligação biespecíficas Her2/Neu x CD3 exemplificativas fornecidas em WO 2012/143524.

7. ANTICORPOS ANTI-VEGF EXEMPLIFICATIVOS

[00466] VEGF-A é um sinal químico que estimula a

angiogênese em uma variedade de doenças, especialmente em certos cânceres metastáticos, como câncer de cólon metastático, e em certos cânceres de pulmão, câncer renal, câncer de ovário e glioblastoma multiforme do cérebro. Um anticorpo exemplificativo que se liga ao VEGF-A humano é "Bevacizumab" (Avastin®). Bevacizumab é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante (Midgley, R. *et al* (2005) "*Bevacizumab - Current Status And Future Directions*," Ann. Oncol. 16(7):999-1004; Hall, R.D. *et al*. (2015) "*Angiogenesis Inhibition As A Therapeutic Strategy In Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)*," Transl. Lung Cancer Res. 4(5):515-523; Narita, Y. (2015) "*Bevacizumab For Glioblastoma*," Ther. Clin. Risk Manag. 11:1759-1765).

[00467] A sequência de aminoácidos do domínio VH de Bevacizumab (SEQ ID NO:154) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS

[00468] A sequência de aminoácidos do domínio VL de Bevacizumab (SEQ ID NO:155) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR

[00469] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação VEGF (por exemplo, moléculas de ligação biespecíficas VEGF x CD3) que são capazes de se ligar a VEGF, e particularmente tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Ls

do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Hs do domínio VH dos anticorpo monoclonal anti-VEGF Bevacizumab.

8. ANTICORPOS ANTI-5T4 EXEMPLIFICATIVOS

[00470] A proteína oncofetal, 5T4, é uma proteína associada a tumor exibida na membrana celular de muitos carcinomas, incluindo rim, cólon, próstata, pulmão, carcinoma e na leucemia linfoblástica aguda (consulte, Boghaert, E.R. *et al*. (2008) "*The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin*," Int. J. Oncol. 32(1):221-234; Eisen, T. *et al*. (2014) "*Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin*," Curr. Oncol. Rep. 16:370, pp. 1-6). Anticorpos exemplificativos que se ligam ao 5T4 humano incluem "5T4 mAb 1" e "5T4 mAb 2."

[00471] A sequência de aminoácidos do domínio VH de 5T4 mAb 1 (SEQ ID NO:156) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SFWMHWVRQA PGQGLEWMGR IDPNRGGTEY NEKAKSRVTM TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAGGN PYYPMDYWGQ GTTVTVSS

[00472] A sequência de aminoácidos do domínio VL de 5T4 mAb 1 exemplificativo (SEQ ID NO:157) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIK

[00473] A sequência de aminoácidos do domínio VH de 5T4 mAb 2 (SEQ ID NO:158) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYWITWVKQR

PGQGLEWIGD IYPGSGRANY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYNCARYG PLFTTVVDPN SYAMDYWGQG TSVTVSS

[00474] A sequência de aminoácidos do domínio VL de 5T4 mAb 2 (SEQ ID NO:159) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP FTFGSGTKLE IK

[00475] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação 5T4 (*por exemplo*, moléculas de ligação biespecíficas 5T4 x CD3) que são capazes de se ligar a 5T4 que compreende o domínio VL e/ou VH e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls de o domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do domínio VH dos anticorpos monoclonais anti-5T4 5T4 mAb 1 ou 5T4 mAb 2, ou de qualquer um dos anticorpos anti-5T4 fornecidos no documento WO 2013/041687 ou WO 2015/184203. A presente invenção inclui adicionalmente e abrange as moléculas de ligação biespecíficas 5T4 x CD3 exemplificativas fornecidas em WO 2015/184203.

[00476] O presente pedido inclui, adicionalmente, especificamente e abrange moléculas de ligação triespecíficas 5T4 x CD3 x CD8 que são capazes de se ligar a 5T4, a CD3 e a CD8, e particularmente tais moléculas de ligação triespecíficas que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Ls do Domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Hs do Domínio VH dos anticorpos monoclonais anti-5T4 5T4 mAb 1 ou 5T4 mAb 2 ou de qualquer um dos anti-5T4 anticorpos monoclonais fornecidos em WO 2015/184203, e/ou o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Hs do Domínio VH de qualquer um dos

anticorpos monoclonais anti-CD8 fornecidos no presente documento.

9. ANTICORPOS ANTI-IL13Rα2 EXEMPLIFICATIVOS

[00477] O receptor α2 da interleucina-13 (IL-13Rα2) é superexpresso em uma variedade de cânceres, incluindo glioblastoma, câncer colorretal, câncer cervical, câncer pancreático, melanoma múltiplo, osteossarcoma, leucemia, linfoma, câncer de próstata e câncer de pulmão (Publicação PCT número WO 2008/146911; Brown, CE *et al.* (2013) "*Glioma IL13Rα2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis*," PLoS One. 18;8(10):e77769; Barderas, R. *et al.* (2012) "*High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis*," Cancer Res. 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. *et al.* (2011) "*IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Rα2*," J. Immunol. 187(1):561-569; Bozinov, O. *et al.* (2010) "*Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ralpha2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas*," Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621; Fujisawa, T. *et al.* (2009) "*A Novel Role Of Interleukin-13 Receptor Alpha2 In Pancreatic Cancer Invasion And Metastasis*," Cancer Res. 69(22):8678-8685). Os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a IL13Rα2 estão comercialmente disponíveis e foram descritos na técnica (Abnova Corporation, Biorbyt, LifeSpan BioSciences, United States Biologicals; consulte também Publicação PCT número WO 2008/146911). Anticorpos exemplificativos que se ligam ao IL-13Rα2 humano incluem "hu08" (consulte, *por exemplo*, Publicação PCT número WO 2014/072888).

[00478] A sequência de aminoácidos do domínio VH

de hu08 (SEQ ID NO:160) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RNGMSWVRQA PGKGLEWVAT VSSGGSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG TTALATRFFD VWGQGTLVTV SS

[00479] A sequência de aminoácidos do domínio VL de hu08 (SEQ ID NO:161) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRSTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYSAPWTFGG GTKVEIK

[00480] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação IL13Rα2 (por exemplo, moléculas de ligação biespecíficas IL13Rα2 x CD3) que são capazes de se ligar a IL13Rα2, e particularmente tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 CDR_Hs do domínio VH dos anticorpo monoclonal anti-IL13Rα2 hu08.

10. ANTICORPOS ANTI-CD123 EXEMPLIFICATIVOS

[00481] CD123 (receptor alfa de interleucina 3, IL-3Ra) é uma molécula de 40 kDa e faz parte do complexo de receptor de interleucina 3 (Stomski, F.C. *et al*. (1996) "*Human Interleukin-3 (IL-3) Induces Disulfide-Linked IL-3 Receptor Alpha- And Beta-Chain Heterodimerization, Which Is Required For Receptor Activation But Not High-Affinity Binding*," Mol. Cell. Biol. 16(6):3035-3046). A interleucina 3 (IL-3) conduz a diferenciação precoce de células-tronco multipotentes em células dos progenitores eritróides, mielóides e linfóides. Foi relatado que CD123 está superexpresso em células malignas em uma ampla gama de doenças hematológicas, incluindo leucemia

mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (CML), leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B), leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitóides blásticas (BPDCN), leucemia mielóide crônica (CML), leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B), leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitóides blásticas (BPDCN) e síndrome mielodisplásica (MDS) (Muñoz, L. *et al*. (2001) "*Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies*," Haematologica 86(12):1261-1269). A superexpressão de CD123 está associada a um prognóstico menos satisfatório em AML (Tettamanti, M.S. *et al*. (2013) "*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor*," Br. J. Haematol. 161:389-401).

[00482] Um anticorpo exemplificativo que se liga a CD123 humano, e que pode ser empregado na presente invenção, é "CD123 mAb 1" (consulte, *por exemplo*, Publicação de Patente PCT WO 2015/026892).

[00483] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD123 mAb 1 (SEQ ID NO:162) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMKWVRQA PGQGLEWIGD IIPSNGATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSH LLRASWFAYW GQGTLVTVSS

[00484] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD123 mAb 1 (SEQ ID NO:163) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIK

[00485] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação de CD123 (*por exemplo*, moléculas de ligação biespecíficas de CD123 x CD3) que são capazes de se ligar a CD123 e, particularmente, tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do domínio VH do anticorpo monoclonal anti-CD123 CD123 mAb 1, e também qualquer um dos anticorpos anti-CD123 revelados nos documentos números em US 2017/081424 e WO 2016/036937. A presente invenção inclui adicionalmente e abrange moléculas de ligação biespecíficas exemplificativas de CD123 x CD3, incluindo: flotetuzumab (também conhecido como MGD007; Registro CAS número 1664355-28-5), JNJ-63709178 (Johnson & Johnson, consulte também WO 2016/036937) e XmAb14045 (Xencor, consulte também, US 2017/081424).

11. ANTICORPOS ANTI-CD19 EXEMPLIFICATIVOS

[00486] CD19 (antígeno de superfície de linfócito B B4, número de acesso do Genbank M28170) é um componente do complexo receptor de células B (BCR) e é um regulador positivo da sinalização de células B que modula o limite para ativação de células B e imunidade humoral. CD19 é um dos antígenos mais ubiquamente expressos na linhagem de células B e é expresso em >95% das malignidades de células B, incluindo leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crônica (CLL) e linfoma não Hodgkin (NHL). Notavelmente, a expressão de CD19 é mantida em linfomas de células B que se tornam resistentes à terapia anti-CD20 (Davis *et al.* (1999) *"Therapy of B-Cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression."* Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999). CD19 também foi sugerido como um alvo para tratar doenças

autoimunes (Tedder (2009) "*CD19: A Promising B-Cell Target For Rheumatoid Arthritis*," Nat. Rev. Rheumatol. 5:572-577).

[00487] Um anticorpo humanizado exemplificativo que se liga ao CD19 humano, e que pode ser empregado na presente invenção, é o anticorpo anti-CD19 revelado no documento WO 2016/048938 (chamado de "CD19 mAb 1" no presente documento).

[00488] A sequência de aminoácidos do domínio VH de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO:164) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_H são mostrados sublinhados):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMGVGWIR QPPGKALEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM ELWSYYFDYW GQGTTVTVSS

[00489] A sequência de aminoácidos do domínio VL de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO:165) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIK

[00490] A sequência de aminoácidos de um domínio VL alternativo de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO:195) é mostrada abaixo (os resíduos CDR_L são mostrados sublinhados):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKVT ITCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTDH FLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIK

[00491] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação de CD19 (*por exemplo*, moléculas de ligação biespecíficas de CD19 x CD3) que são capazes de se ligar a CD19 e, particularmente, tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs

do domínio VH do anticorpo monoclonal anti-CD19 CD19 mAb 1 ou qualquer um dos anticorpos anti-CD19 revelados na Patente US 7.112.324. A presente invenção inclui especificamente e abrange moléculas de ligação biespecíficas exemplificativas de CD19 x CD3 que podem ser empregadas na presente invenção, incluindo: blinatumomab (BLINCYTO®; sequência de aminoácidos encontrada em WHO Drug Information, 2009, Recommended INN: List 62, 23 (3): 240-241) e duvortuxizumab (também conhecido como MGD011; sequência de aminoácidos encontrada em WHO Drug Information, 2016, Proposed INN: List 116, 30(4):627 a 629).

B. ANTÍGENOS ASSOCIADOS A PATOGÊNIO EXEMPLIFICATIVOS

[00492] Como usado no presente documento, o termo "Antígeno de Patógeno" denota um antígeno que é expresso caracteristicamente na superfície de uma célula infectada com patógeno e que pode, assim, ser tratado com uma Molécula com base em Anticorpo ou uma Molécula Imunomoduladora. Exemplos de antígenos de patógenos incluem, mas não estão limitados a antígenos expressos na superfície de uma célula infectada com: um vírus Herpes Simplex (*por exemplo,* proteína celular infectada (ICP)47, gD *etc*.), um vírus varicela-zóster, um Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi, um vírus de Epstein Barr (*por exemplo*, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B *etc*.), um Citomegalovírus (*por exemplo*, UL11 *etc*.), vírus de imunodeficiência humana (*por exemplo*, proteínas env gp160, gp120, gp41 *etc*.), um Papilomavírus Humano (*por exemplo*, E6, E7 *etc*.), um vírus de leucemia de células T humanas (*por exemplo*, proteínas env gp64, gp46, gp21 *etc*.), Vírus da Hepatite A, Hepatite Vírus B, Vírus da Hepatite C, Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), *Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter, Gonococci, Helicobacter pylori,*

Klebsiella, Legionella, Meningococci, mycobacteria, *Pseudomonas, Pneumonococci,* rickettsia bacteria, *Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci, Tetanus, Aspergillus* (fumigatus, niger *etc.*), *Blastomyces dermatitidis, Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis *etc.*), *Cryptococcus neoformans,* Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis, Borrelia burgdorferi*, helminth parasite (hookworm, tapeworms, flukes, flatworms (*por exemplo Schistosomia*), *Giardia lambia*, *trichinella, Dientamoeba Fragilis, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi,* e *Leishmania donovani*). Tais anticorpos estão disponíveis comercialmente a partir de um grande número de fontes, ou podem ser obtidos imunizando camundongos ou outros animais (incluindo para a produção de anticorpos monoclonais) com tais antígenos.

[00493] Anticorpos exemplificativos, cujos Domínios VH e VL podem ser usados para construir moléculas capazes de se ligar a um Antígeno de Patógeno disposto em matriz na superfície de uma célula infectada por patógeno, são anticorpos fornecidos abaixo, anticorpos adicionais são conhecidos na técnica.

1. ANTICORPO EXEMPLIFICATIVO ANTI-HIV ENV

[00494] A proteína env de HIV é um exemplo de antígeno associado a patógenos, e os anticorpos que se ligam à proteína env de HIV são exemplos de anticorpos capazes de se ligar a um antígeno associado a patógenos.

[00495] A etapa inicial na infecção pelo HIV-1 ocorre com a ligação CD4 de superfície celular às glicoproteínas triméricas do envelope de HIV-1 (env), um

heterodímero de uma glicoproteína transmembrana (gp41) e uma glicoproteína superficial (gp120). As glicoproteínas gp120 e gp41 são inicialmente sintetizadas como um único polipeptídeo gp160 que é subsequentemente clivado para gerar o complexo gp120/gp41 associado não covalentemente. O ectodomínio de env é um heterodímero com massa de aproximadamente 140 kDa, composto de todo o componente gp120 e aproximadamente 20 kDa de gp41 (Harris, A. *et al*. (2011) "*Trimeric HIV-1 Glycoprotein Gp140 Immunogens And Native HIV-1 Envelope Glycoproteins Display The Same Closed And Open Quaternary Molecular Architectures*," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 108(28):11440-11445). Os anticorpos que se ligam imunoespecificamente às proteínas env estão comercialmente disponíveis e foram descritos na técnica (consulte, *por exemplo*, GenBank número de Acesso AFQ31503; Buchacher, A. *et al*. (1994) "*Generation Of Human Monoclonal Antibodies Against HIV-1 Proteins; Electrofusion And Epstein-Barr Virus Transformation For Peripheral Blood Lymphocyte Immortalization*," AIDS Res. Hum. Retroviruses 10(4):359-369; Shen, R. (2010) "*GP41-Specific Antibody Blocks Cell-Free HIV Type 1 Transcytosis Through Human Rectal Mucosa And Model Colonic Epithelium*," J. Immunol. 184(7):3648-3655; WO 2012/162068; e WO 2016/054101). Anticorpos exemplificativos que se ligam a env de HIV incluem "7B2" (GenBank número de Acesso AFQ31503) e "A32" (Publicação PCT número WO 2014/159940). Vários domínios VH do anticorpo A32 foram relatados na técnica que possuem pequenas alterações nas regiões estruturais 1 e/ou 4 relatadas (consulte, por exemplo, número de acesso à base de dados de proteína PDB: 4YBL_H, US 2015/0239961 e WO 2006/044410). Qualquer um destes Domínios VH do Anticorpo A32 variantes pode ser utilizado de

acordo com a presente invenção.

[00496] A sequência de aminoácidos do domínio VH de 7B2 (SEQ ID NO:166) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

QVQLVQSGGG VFKPGGSLRL SCEASGFTFT EYYMTWVRQA PGKGLEWLAY ISKNGEYSKY SPSSNGRFTI SRDNAKNSVF LQLDRLSADD TAVYYCARAD GLTYFSELLQ YIFDLWGQGA RVTVSS

[00497] A sequência de aminoácidos do domínio VL de 7B2 (SEQ ID NO:167) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTLL YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT INNLQAEDVA IYYCHQYSSH PPTFGHGTRV EIK

[00498] A sequência de aminoácidos de um Domínio VH exemplificativo de A32 (SEQ ID NO: 168) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

QVQLQESGPG LVKPSQTLSL SCTVSGGSSS SGAHYWSWIR QYPGKGLEWI GYIHYSGNTY YNPSLKSRIT ISQHTSENQF SLKLNSVTVA DTAVYYCARG TRLRTLRNAF DIWGQGTXVT VSS

[00499] em que: X é L ou M

[00500] A sequência de aminoácidos de tal Domínio VH exemplificativo de A32 (SEQ ID NO: 209), em que X é L, é mostrada abaixo (os resíduos de CDR são mostrados sublinhados):

QVQLQESGPG LVKPSQTLSL SCTVSGGSSS SGAHYWSWIR QYPGKGLEWI GYIHYSGNTY YNPSLKSRIT ISQHTSENQF SLKLNSVTVA DTAVYYCARG TRLRTLRNAF DIWGQGTLVT VSS

[00501] A sequência de aminoácidos do domínio VL de A32 (SEQ ID NO:169) é mostrada abaixo (os resíduos CDR são mostrados sublinhados):

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH

HPGKAPKLII SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHNFV FGGGTKLTVL

[00502] O presente pedido inclui especificamente e abrange moléculas de ligação de HIV (*por exemplo*, moléculas de ligação biespecíficas de HIV x CD3) que são capazes de se ligar a HIV e, particularmente, tais moléculas de ligação que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do domínio VH dos anticorpos monoclonais anti-HIV 7B2, A32, e também qualquer um dos anticorpos anti-HIV revelados em WO 2016/054101, WO 2017/011413, WO 2017/011414. A presente invenção inclui e abrange especificamente as moléculas de ligação biespecíficas de HIV x CD3 exemplificativas fornecidas em WO 2014/159940, WO 2015/184203, WO 2017/011413 e WO 2017/011414.

[00503] O presente pedido inclui, adicionalmente, especificamente e abrange as moléculas de ligação triespecíficas de HIV x CD3 x CD8 que são capazes de se ligar a HIV, a CD3 e a CD8 e, particularmente, tais moléculas de ligação triespecíficas que compreendem o domínio VL e/ou VH, e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do Domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Hs do Domínio VH dos anticorpos monoclonais anti-HIV 7B2 ou A32 ou de qualquer um dos anticorpos monoclonais anti-HIV fornecidos em WO 2015/184203, WO 2016/054101, WO 2017/011413, WO 2017/011414 e/ou o domínio VL e/ou VH e/ou 1, 2 ou todos os 3 dentre os CDR_Ls do domínio VL e/ou 1, 2 ou todos os 3 dos CDR_Hs do Domínio VH de qualquer um dentre os anticorpos monoclonais anti-CD8 fornecidos em WO 2015/184203.

2. ANTICORPO DE GLICOPROTEÍNA F ANTI-RSV

EXEMPLIFICATIVO

[00504] Um outro Antígeno Associado a Patógenos ilustrativo é a glicoproteína F. de RSV. Um anticorpo anti-glicoproteína F de RSV exemplificativo é palivizumab (consulte, *por exemplo*, Protein Data Bank (PDB) ID número 2HWZ). Anticorpos alternativos da glicoproteína F anti-RSV incluem motavizumab (consulte, *por exemplo*, PDB ID número 3IXT) e uma variante de palivizumab que foi projetada para remover um resíduo de cisteína de CDR_L1 de palivizumab. A sequência de aminoácidos do Domínio VH da variante de palivizumab (SEQ ID NO: 170) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR estão sublinhados):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMSVGWIR QPPGKALEWL ADIWWDDKKD YNPSLKSRLT ISKDTSKNQV VLKVTNMDPA DTATYYCARS MITNWYFDVW GAGTTVTVSS

[00505] A sequência de aminoácidos do Domínio VL da variante de palivizumab (SEQ ID NO: 171) é mostrada abaixo (os resíduos de CDR estão sublinhados):

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK

VII. MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO EXEMPLIFICATIVAS DA PRESENTE INVENÇÃO

[00506] Conforme discutido abaixo, a presente invenção é ilustrada com uso de várias moléculas de ligação DA x CD3 que tem diferentes estruturas, incluindo moléculas capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula tumoral (*por exemplo*, um diacorpo tipo "DART-A" ou um diacorpo tipo "DART-B" ou uma molécula do tipo TRIVALENTE, conforme descrito abaixo).

A. DIACORPOS TIPO DART-A

[00507] Diacorpos tipo DART-A são diacorpos biespecíficos capazes de se ligar a CD3 e um Antígeno de Doença (*por exemplo*, um Antígeno de Câncer) que não compreende um Domínio Fc. São fornecidos no presente documento diacorpos ilustrativos do tipo DART-A compostos por duas cadeias de polipeptídeo que têm um local de ligação para CD3 e um local de ligação para o antígeno de câncer CD123 (consulte, *por exemplo*, Figura 1).

[00508] Um diacorpo ilustrativo do tipo DART-A (designado "DART-A-WT") tem uma primeira cadeia de polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 172:

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[00509] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 162). Os resíduos 114-121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122-246 da primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem ao Domínio VH do CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247-252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem a um Ligante

2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253–280 da primeira cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo do tipo DART-A ilustrativo correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE; SEQ ID NO:30).

[00510] A segunda cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo tipo DART-A ilustrativo DART-A-WT tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 173:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVQSGAELK KPGASVKVSC KASGYTFTDY YMKWVRQAPG QGLEWIGDII PSNGATFYNQ KFKGRVTITV DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCARSHLL RASWFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

[00511] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo de tal de diacorpo tipo DART-A DART-A-WT ilustrativo correspondem ao Domínio VL do CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 56). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–238 segunda cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem ao Domínio VH do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 239–244 (sublinhados) da segunda cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART-A correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 245–272 da segunda cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo do tipo DART-A ilustrativo correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29).

[00512] Como será reconhecido em vista da presente revelação, diacorpos adicionais do tipo DART-A que têm um local

de ligação para um Antígeno de Doença alternativo e/ou que têm os Domínios de Ligação CD3 de um anticorpo anti-CD3 variante (*isto é*, um Domínio de Ligação vCD3) podem da mesma forma ser construídos (empregando os domínios VL e VH de tais anticorpos em vez dos domínios VL e VH do diacorpo ilustrativo do tipo DART-A). Da mesma forma, conforme fornecido no presente documento, moléculas alternativas do tipo DART-A podem da mesma forma ser construídas incorporando Ligantes alternativos e/ou domínios de promoção de heterodímero alternativos. Por exemplo, um painel ilustrativo de diacorpos CD123 x CD3 tipo DART-A foi gerado com a mesma estrutura do diacorpo DART-A-WT fornecido acima, mas que compreende os Domínios VL e VH de uma das variantes CD3 mAb 1 (M1- M26) fornecido acima.

[00513] Cada diacorpo de tipo DART-A ilustrativo de CD123 x CD3 do painel tem uma primeira cadeia de polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: SEQ ID NO:189:

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGGGEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S$X_1X_2X_3$MNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKX_4R FTISRDDSKNSLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHX_5NX_6X_7NSX_8V X_9X_{10}FAX_{11}WGQGTLVTVSSGGCG GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[00514] em que: X_1 é T, D, ou E; X_2 é Y, D ou T; X_3 é A ou G; X_4 é D ou G; X_5 é G, D, E, ou K; X_6 é F ou I; X_7 é G ou I; X_8 é Y, A, G, ou Q; X_9 é S ou T; X_{10} é W, F, ou Y; e X_{11} é Y ou E.

[00515] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART-A ilustrativos

correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 162). Os resíduos 114–121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART–A ilustrativos correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16; sublinhado duplo). Os resíduos 122–246 da primeira cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART–A ilustrativos correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M1 – CD3 mAb 1 M22 (SEQ ID NOs: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 ou 106). Os resíduos 247–252 (sublinhado único) do painel de diacorpos ilustrativos do tipo DART–A correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253–280 da primeira cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART–A ilustrativos correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE; SEQ ID NO:30).

[00516] A segunda cadeia de polipeptídeo de tal diacorpo ilustrativo do tipo DART–A tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 190:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQKPGQAPRGLI GX_1TNX_2RAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGAQAEDEADYYC $AX_3WYSNLWVF$ GGGTKLTVLG GGGSGGGGEVQLVQSGAELK KPGASVKVSC KASGYTFTDY YMKWVRQAPGQGLEWIGDII PSNGATFYNQ KFKGRVTITV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARSHLL RASWFAYWGQ GTLVTVSSGGCGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

[00517] em que: X_1 é G ou D; X_2 é K ou G; e X_3 é L, E ou Q.

[00518] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART–A ilustrativos correspondem ao Domínio VL de CD3 mAb 1 M23 – CD3 mAb 1 M26

(SEQ ID NOs: 108, 110, 112 e 114). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART-A ilustrativos correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16; sublinhado duplo). Os resíduos 119–238 da segunda cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART-A ilustrativos correspondem ao Domínio VH de CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 239–244 (sublinhados) da segunda cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART-A ilustrativos correspondem ao Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17; sublinhado único). Os resíduos 245–272 da segunda cadeia de polipeptídeo do painel de diacorpos tipo DART-A ilustrativos correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29).

[00519] As sequências de aminoácidos e as designações do painel de diacorpos ilustrativos do tipo DART-A que compreende VL e VH das variantes de CD3 mAb 1 são fornecidas na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8
Diacorpos ilustrativos do tipo DART-A

Designação	Primeira Cadeia de Polipeptídeo SEQ ID NO:	Segunda Cadeia de Polipeptídeo SEQ ID NO.
DART-A-M1	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é T; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M2	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é K; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é T; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M3	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é I; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173

Tabela 8 Diacorpos ilustrativos do tipo DART-A		
DART-A-M4	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é A; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M5	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é G; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M6	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Q; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M7	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é D; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M8	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é E; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M9	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é K; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M10	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é I; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M11	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é F; e X_{11} é Y	173
DART-A-M12	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é Y; e X_{11} é Y	173
DART-A-M13	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é	173

Tabela 8 Diacorpos ilustrativos do tipo DART-A		
	F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é E	
DART-A-M14	189 – em que: X_1 é D; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M15	189 – em que: X_1 é E; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M16	189 – em que: X_1 é T; X_2 é D; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M17	189 – em que: X_1 é T; X_2 é T; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M18	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é G; X_4 é D; X_5 é G; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M19	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é K; X_6 é I; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M20	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é K; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é G; X_9 é S; X_{10} é W; e X_{11} é Y	173
DART-A-M21	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é K; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é F; e X_{11} é Y	173
DART-A-M22	189 – em que: X_1 é T; X_2 é Y; X_3 é A; X_4 é D; X_5 é K; X_6 é F; X_7 é G; X_8 é Y; X_9 é S; X_{10} é Y; e X_{11} é Y	173

Tabela 8 Diacorpos ilustrativos do tipo DART-A		
DART-A-M23	172	190 – em que: X_1 é G; X_2 é K; e X_3 é E
DART-A-M24	172	190 – em que: X_1 é G; X_2 é K; e X_3 é Q
DART-A-M25	172	190 – em que: X_1 é D; X_2 é K; e X_3 é L
DART-A-M26	172	190 – em que: X_1 é G; X_2 é G; e X_3 é L

B. DIACORPOS TIPO DART-B

[00520] Diacorpos tipo DART-B são diacorpos biespecíficos capazes de se ligar a CD3 e um Antígeno de Doença (*por exemplo*, um Antígeno de Câncer ou de Doença Infecciosa) que compreende um Domínio Fc. São fornecidos no presente documento diacorpos ilustrativos do tipo DART-B (Tabela 9) compostos por três cadeias de polipeptídeo e têm um local de ligação para CD3 e um local de ligação para o Antígeno de Câncer CD123, 5T4 ou CD19 (consulte, *por exemplo*, Figura 4A).

Tabela 9						
Tipo DART-B número	Domínio de ligação ao antígeno de doença	CD3 Domínio de ligação	Cadeia de polipeptídeo			Designação
			Primeira	Segunda	Terceira	
			Ligação CD123 / CD3 Domínios		Domínio Fc	
1	CD123 mAb 1	CD3 mAb 1	SEQ ID NO:174	SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:176	CD123-WT
2		CD3 mAb 1 M1	SEQ ID NO:177			CD123-M1
3		CD3 mAb 1 M2	SEQ ID NO:178			CD123-M2
4		CD3 mAb	SEQ ID			CD123-

Tabela 9						
		1 M18	NO:179			M18
5		CD3 mAb 1 M13	SEQ ID NO:198			CD123-M13
6		CD3 mAb 1 M17	SEQ ID NO:199			CD123-M17
7		CD3 mAb 1 M19	SEQ ID NO:200			CD123-M19
8	5T4 mAb 1	CD3 mAb 1	SEQ ID NO:180	SEQ ID NO:181		5T4-WT
9		CD3 mAb 1 M1	SEQ ID NO:182			5T4-M1
10		CD3 mAb 1 M2	SEQ ID NO:183			5T4-M2
11		CD3 mAb 1 M18	SEQ ID NO:184			5T4-M18
12	HIV mAb A32	CD3 mAb 1	SEQ ID NO:185	SEQ ID NO:186		HIV-WT
13		CD3 mAb 1 M18	SEQ ID NO:196			HIV-M18
14	CD19 mAb 1 (VL alternativo, quando indicado)	CD3 mAb 1	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 192		CD19-WT
15		CD3 mAb 1 M18	SEQ ID NO: 197			CD19-M18
16		CD3 mAb 1 M18	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 194		CD19.1-M18
17		CD3 mAb 1 M13	SEQ ID NO:201			CD19.1-M13
18		CD3 mAb 1 M17	SEQ ID NO:202			CD19.1-M17
19		CD3 mAb 1 M19	SEQ ID NO:203			CD19.1-M19

1. PRIMEIRO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD123-WT (CD123 X CD3 MAB 1)

[00521] Um primeiro diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (designado "CD123-WT") tem uma primeira cadeia de polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 174:

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00522] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114-121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122-246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247-252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253-280 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281-283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284-293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT

correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294–510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Domínio CH2-CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00523] A segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-WT tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 175:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVQSGAELK KPGASVKVSC KASGYTFTDY YMKWVRQAPG QGLEWIGDII PSNGATFYNQ KFKGRVTITV DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCARSHLL RASWFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

[00524] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Domínio VL de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 56). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–238 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem ao Domínio VH de CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 162). Os resíduos 239–244 (sublinhados) da segunda cadeia de polipeptídeo correspondem ao Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 245–272 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-WT correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE; SEQ ID NO:30).

[00525] A terceira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 176:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

[00526] Os resíduos 1–10 da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123–WT correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 10–227 da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123–WT correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de orifício" de IgG1 (SEQ ID NO: 50).

[00527] Como será reconhecido, a terceira cadeia de polipeptídeo de CD123–WT não contém quaisquer domínios de ligação ao epítopo e pode, portanto, ser empregue em várias moléculas de ligação DA x CD3 que tem tal estrutura do tipo DART–B.

2. SEGUNDO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO CD123–M1 (CD123 X CD3 MAB 1 M1)

[00528] Um segundo diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo CD123–WT descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M1 e é designado “CD123–M1”. Conforme indicado acima, o CD3 mAb 1 M1 é uma variante de baixa afinidade do CD3 mAb 1 (também referido como "CD3 mAb 1 baixo"). Como também indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M1 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00529] Assim, o segundo diacorpo do tipo DART–B ilustrativo (CD123–M1) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 177):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV TWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP

PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00530] Os resíduos 1–113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114–121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122–246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M1 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247–252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253–280 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281–283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284–293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294–510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00531] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M1 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 175). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira

cadeia de polipeptídeo de CD123-M1 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

3. TERCEIRO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD123-M2 (CD123 X CD3 MAB 1 M2)

[00532] Um terceiro diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD123-M1 descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M2 e é designado "CD123-M2". Conforme indicado acima, CD3 mAb 1 M2 tem uma taxa de desativação mais rápida do que CD3 mAb 1 e, portanto, também é referido como "CD3 mAb 1 rápido". Como também indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M2 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00533] Assim, o terceiro diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD123-M2) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 178):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHKNFGNSYV TWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00534] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M2 correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114-121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M2 correspondem ao

Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122–246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M2 (SEQ ID NO: 59), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247–252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253–280 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281–283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284–293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294–510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00535] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M2 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 175). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123–M2 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

4. QUARTO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO CD123–M18 (CD123 X CD3 MAB 1 M18)

[00536] Um quarto diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo CD123–M2 descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M18 e é designado “CD123–M18”. Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M18 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3

mAb 1.

[00537] Assim, o quarto diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD123-M18) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 179):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYGMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00538] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114-121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122-246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M18 (SEQ ID NO: 98), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247-252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253-280 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281-283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18

correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284-293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294-510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 correspondem ao Domínio CH2-CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00539] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M18 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 175). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123-M18 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

5. QUINTO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD123-M13 (CD123 X CD3 MAB 1 M13)

[00540] Um quinto diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD123-WT descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M13 e é designado "CD123-M13". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M13 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00541] Assim, o quinto diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD123-M13) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 198):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR

FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAEWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00542] Os resíduos 1–113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114–121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122–246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M13 (SEQ ID NO: 88), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247–252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M1 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253–280 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281–283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284–293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294–510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00543] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M13 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123–M13 é a mesma que a da

segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 175). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123-M1 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

6. SEXTO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD123-M17 (CD123 X CD3 MAB 1 M17)

[00544] Um sexto diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD123-WT descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M17 e é designado "CD123-M17". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M17 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00545] Assim, o sexto diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD123-M17) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 199):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STTAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00546] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem ao Domínio VL do CD123

mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114-121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122-246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M17 (SEQ ID NO: 96), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247-252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253-280 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281-283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284-293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294-510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 correspondem ao Domínio CH2-CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00547] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M17 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 175). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123-M17 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

7. SÉTIMO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD123-M19 (CD123 X CD3 MAB 1 M19)

[00548] Um sétimo diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD123-WT descrito acima, mas

contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M19 e é designado "CD123-M19". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M19 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00549] Assim, o sétimo diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD123-M19) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 200):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHKNIGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00550] Os resíduos 1-113 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 correspondem ao Domínio VL do CD123 mAb 1 (SEQ ID NO: 163). Os resíduos 114-121 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 122-246 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M19 (SEQ ID NO: 100), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 247-252 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 253-280 da primeira cadeia de polipeptídeo de

CD123-M19 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 281-283 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 284-293 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M1 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 294-510 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 correspondem ao Domínio CH2-CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00551] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M19 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD123-M19 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 175). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD123-M1 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

8. OITAVO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO 5T4-WT (5T4 X CD3 MAB 1)

[00552] Um oitavo diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD123-M18 descrito acima, mas compreende um Domínio de Ligação 5T4 em vez do Domínio de Ligação CD123 do diacorpo CD123-M18. Adicionalmente, o oitavo diacorpo ilustrativo do tipo DART-B contém o domínio VH de CD3 mAb 1. Esse oitavo diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é designado "5T4-WT".

[00553] Assim, o oitavo diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (5T4-WT) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 180):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP

GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

[00554] Os resíduos 1–107 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Domínio VL do 5T4 mAb 1 (SEQ ID NO: 157). Os resíduos 108–115 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 116–240 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é glicina (G). Os resíduos 241–246 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 247–274 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 275–277 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 278–287 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 288–504 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00555] A segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT

tem a sequência de aminoácidos de (SEQ ID NO: 181):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGQGT TVTVSSGGCG GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[00556] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Domínio VL de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 56). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–236 da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem ao Domínio VH de 5T4 mAb 1 (SEQ ID NO: 156). Os resíduos 237–242 (sublinhados) da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 243–280 da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE; SEQ ID NO:30).

[00557] A terceira cadeia de polipeptídeo de 5T4–WT tem a mesma sequência de aminoácidos como a terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO:176).

9. NONO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO 5T4–M1 (5T4 X CD3 MAB 1 M1)

[00558] Um nono diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo 5T4–WT descrito acima, mas compreende o domínio VH de CD3 mAb 1 M1 e é designado “5T4–M1”.

[00559] Assim, o nono diacorpo do tipo DART–B ilustrativo (5T4–M1) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo

que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 182):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVTWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

[00560] Os resíduos 1–107 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem ao Domínio VL do 5T4 mAb 1 (SEQ ID NO: 157). Os resíduos 108–115 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 116–240 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M1 (SEQ ID NO: 64), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 241–246 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 247–274 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 275–277 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 278–287 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 288–504 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M1 correspondem ao Domínio CH2–

CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00561] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M1 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4-M1 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo 5T4-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 181). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M1 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

10. DÉCIMO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO 5T4-M2 (5T4 X CD3 MAB 1 M2)

[00562] Um décimo diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo 5T4-M1 descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M2 e é designado "5T4-M2".

[00563] Assim, o décimo diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (5T4-M2) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 183):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHKNFG NSYVTWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

[00564] Os resíduos 1-107 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem ao Domínio VL do 5T4 mAb 1 (SEQ ID NO: 157). Os resíduos 108-115 (sublinhado duplo) da

primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 116-240 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M2 (SEQ ID NO: 66), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 241-246 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 247-274 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 275-277 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 278-287 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 288-504 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 correspondem ao Domínio CH2-CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00565] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M2 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo 5T4-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 181). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M2 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

11. DÉCIMO-PRIMEIRO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO 5T4-M18 (5T4 X CD3 MAB 1 M18)

[00566] Um décimo-primeiro diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo 5T4-WT descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M18 e é designado “5T4-M18”.

[00567] Assim, o décimo-primeiro diacorpo do tipo

DART-B ilustrativo (5T4-M18) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 184):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYGMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

[00568] Os resíduos 1-107 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18 correspondem ao Domínio VL do 5T4 mAb 1 (SEQ ID NO: 157). Os resíduos 108-115 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 116-240 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M18 (SEQ ID NO: 98), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 241-246 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 247-274 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 275-277 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 278-287 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4-M18

correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 288–504 da primeira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M18 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00569] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M18 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de 5T4–M18 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo 5T4–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 181). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de 5T4–M18 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

12. DÉCIMO–SEGUNDO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO HIV–WT (HIV X CD3 MAB 1)

[00570] Um décimo–segundo diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo CD123–WT descrito acima, mas compreende um Domínio de ligação HIV do anticorpo anti–HIV A32 no lugar do Domínio de Ligação CD123 do diacorpo CD123–WT. Esse décimo–segundo diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é designado "HIV–WT".

[00571] Assim, o décimo–segundo diacorpo do tipo DART–B ilustrativo (HIV–WT) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 185):

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH HPGKAPKLII SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHNFV FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY AMNWVRQAPG KGLEWVGRIR SKYNNYATYY ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGTLVT VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEKGGGD KTHTCPPCPA

PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

[00572] Os resíduos 1–110 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao domínio VL de A32 (SEQ ID NO:169). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–243 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é glicina (G). Os resíduos 244–248 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem a um Ligante 2 (ASTKG; SEQ ID NO: 21; sublinhado único). Os resíduos 249–276 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT corresponde à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAACEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:31). Os resíduos 277–279 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT corresponde a um ligante GGG. Os resíduos 280–289 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:40; sublinhado único). Os resíduos 290–506 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00573] A segunda cadeia de polipeptídeo de HIV–WT tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 186):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQESGPGLV KPSQTLSLSC

TVSGGSSSSG AHYWSWIRQY PGKGLEWIGY IHYSGNTYYN PSLKSRITIS QHTSENQFSL KLNSVTVADT AVYYCARGTR LRTLRNAFDI WGQGTLVTVS SASTKGKVAA CKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

[00574] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Domínio VL de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 56). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–241 da segunda cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem ao Domínio VH de A32 (SEQ ID NO:209 (*isto é*, SEQ ID NO:168, em que X é L)). Os resíduos 242–246 (sublinhados) da segunda cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem a um Ligante 2 (ASTKG; SEQ ID NO:21). Os resíduos 247–274 da segunda cadeia de polipeptídeo de HIV–WT correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAACKE–KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE; SEQ ID NO:32).

[00575] A terceira cadeia de polipeptídeo de HIV–WT tem a mesma sequência de aminoácidos como a terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO:176).

13. DÉCIMO–TERCEIRO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO HIV–M18 (CD123 X CD3 MAB 18)

[00576] Um décimo–terceiro diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo HIV–WT descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M18. Esse diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é designado "HIV–M18".

[00577] Assim, o décimo–terceiro diacorpo do tipo DART–B ilustrativo (HIV–M18) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 196):

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH

HPGKAPKLII SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHNFV FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY GMNWVRQAPG KGLEWVGRIR SKYNNYATYY ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGTLVT VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEKGGGD KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

[00578] Os resíduos 1–110 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem ao Domínio VL do A32 (SEQ ID NO: 169). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–243 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M18 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é glicina (G). Os resíduos 244–248 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem a um Ligante 2 (ASTKG; SEQ ID NO: 21; sublinhado único). Os resíduos 249–276 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 corresponde à “bobina E” de promoção de heterodímero (EVAACEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:31). Os resíduos 277–279 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 280–289 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:40; sublinhado único). Os resíduos 290–506 da primeira cadeia de polipeptídeo de HIV–M18 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00579] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M18 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de HIV-M18 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo HIV-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 186). Do mesmo modo, a sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de HIV-M18 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

14. DÉCIMO-QUARTO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD19-WT (CD19 X CD3 MAB 1)

[00580] Um décimo-quarto diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo HIV-WT descrito acima, mas compreende CD19 mAb 1 em vez do Domínio de Ligação A32. Esse décimo-quarto diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é designado "CD19-WT".

[00581] Assim, o décimo-quarto diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD19-WT) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 191):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSA STKGEVAACE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

[00582] Os resíduos 1–106 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Domínio VL do CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 165). Os resíduos 107–114 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 115–239 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 55), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é glicina (G). Os resíduos 240–244 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem a um Ligante 2 (ASTKG; SEQ ID NO: 21; sublinhado único). Os resíduos 245–272 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT corresponde à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAACEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:31). Os resíduos 273–275 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem a um ligante GGG (sublinhado duplo). Os resíduos 276–285 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 286–502 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00583] A segunda cadeia de polipeptídeo de CD19–WT tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 192:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV TLRESGPALV KPTQTLTLTC TFSGFSLSTS GMGVGWIRQP PGKALEWLAH IWWDDDKRYN PALKSRLTIS KDTSKNQVFL TMTNMDPVDT ATYYCARMEL WSYYFDYWGQ GTTVTVSSAS TKGKVAACKE KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

[00584] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Domínio VL de CD3 mAb

1 (SEQ ID NO: 56). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–238 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem ao Domínio VH de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 164). Os resíduos 239–243 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem a um Ligante 2 (ASTKG; SEQ ID NO: 21). Os resíduos 244–271 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19–WT correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE; SEQ ID NO:32).

[00585] A terceira cadeia de polipeptídeo de CD19–WT tem a mesma sequência de aminoácidos como a terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO:176).

DÉCIMO–QUINTO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO CD19–M18 (CD19 X CD3 MAB 1 M18)

[00586] Um décimo–quinto diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo CD19–WT descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M18. Esse décimo–quinto diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é designado "CD19–M18".

[00587] Assim, o décimo–quinto diacorpo do tipo DART–B ilustrativo (CD19–M18) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 197):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYGMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSA STKGEVAACE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH

NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

[00588] Os resíduos 1–106 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem ao Domínio VL do CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 165). Os resíduos 107–114 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 115–239 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M18 (SEQ ID NO: 98), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é glicina (G). Os resíduos 240–244 (sublinhados) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem a um Ligante 2 (ASTKG; SEQ ID NO: 21; sublinhado único). Os resíduos 245–272 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 corresponde à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAACEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:31). Os resíduos 273–275 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 276–285 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 286–502 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00589] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M18 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD19–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 192). De modo similar, terceira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 tem a mesma sequência de aminoácidos

como a terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO:176).

DÉCIMO-SEXTO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD19.1 M18 (CD19.1 X CD3 MAB 1 M18)

[00590] Um décimo-sexto diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD123-M18 descrito acima, mas que compreende um Domínio de ligação CD19 que contém o domínio VL alternativo de CD19 mAb 1 no lugar do Domínio de Ligação CD123 de CD123-M18. Esse diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é designado "CD19.1 M18". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M18 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00591] Assim, o décimo-sexto diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD19.1 M18) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 193):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKVT ITCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTDH FLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYGMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KDRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[00592] Os resíduos 1-106 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M18 correspondem ao Domínio VL alternativo de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 195). Os resíduos 107-

114 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 115–239 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M18 (SEQ ID NO: 98), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 240–245 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 246–273 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 274–276 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M18 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 277–286 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 287–503 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00593] A segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 tem a sequência de aminoácidos de (SEQ ID NO:194):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV TLRESGPALV KPTQTLTLTC TFSGFSLSTS GMGVGWIRQP PGKALEWLAH IWWDDDKRYN PALKSRLTIS KDTSKNQVFL TMTNMDPVDT ATYYCARMEL WSYYFDYWGQ GTTVTVSSGG CGGGKVAALK EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

[00594] Os resíduos 1–110 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Domínio VL de CD3 mAb 1 (SEQ ID NO: 56). Os resíduos 111–118 (sublinhado duplo) da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 119–238 da

segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Domínio VH de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 164). Os resíduos 239–244 (sublinhado único) da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 245–272 da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem à "bobina K" de promoção de heterodímero (KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE–KVAALKE; SEQ ID NO:30).

[00595] A sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

17. DÉCIMO–SÉTIMO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO CD19.1 M13 (CD19.1 X CD3 MAB 1 M13)

[00596] Um décimo–sétimo diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo CD19.1–M18 descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M13 e é designado "CD19.1–M13". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M13 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00597] Assim, o décimo–sétimo diacorpo do tipo DART–B ilustrativo (CD19.1 M13) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 201):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKVT ITCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTDH FLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KDRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAEWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV

HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[00598] Os resíduos 1–106 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 correspondem ao Domínio VL alternativo de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 195). Os resíduos 107–114 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 115–239 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M18 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M13 (SEQ ID NO: 88), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 240–245 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 246–273 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 274–276 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M13 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 277–286 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 287–503 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00599] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M13 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD19.1–M18 (*isto é*, SEQ ID NO: 194). A sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 é a mesma da terceira

cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

18. DÉCIMO-OITAVO DIACORPO DO TIPO DART-B ILUSTRATIVO CD19.1 M17 (CD19.1 X CD3 MAB 1 M17)

[00600] Um décimo-oitavo diacorpo ilustrativo do tipo DART-B é semelhante ao diacorpo CD19.1-M18 descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M17 e é designado "CD19.1-M17". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M17 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3 mAb 1.

[00601] Assim, o décimo-oitavo diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (M17) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 202):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKVT ITCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTDH FLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTTAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KDRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[00602] Os resíduos 1-106 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M17 correspondem ao Domínio VL alternativo de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 195). Os resíduos 107-114 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M17 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO:

16). Os resíduos 115–239 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M17 (SEQ ID NO: 96), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 240–245 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 246–273 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK–EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 274–276 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19–M17 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 277–286 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 287–503 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00603] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M17 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD19.1–M18 (*isto é*, SEQ ID NO: 194). A sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M17 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

19. DÉCIMO–NONO DIACORPO DO TIPO DART–B ILUSTRATIVO CD19.1 M19 (CD19.1 X CD3 MAB 1 M19)

[00604] Um décimo–nono diacorpo ilustrativo do tipo DART–B é semelhante ao diacorpo CD19.1–M18 descrito acima, mas contém o domínio VH de CD3 mAb 1 M19 e é designado "CD19.1–M19". Conforme indicado acima, o domínio VL de CD3 mAb 1 M19 tem a mesma sequência de aminoácidos que o domínio VL do CD3

mAb 1.

[00605] Assim, o décimo-nono diacorpo do tipo DART-B ilustrativo (CD19.1 M19) tem uma primeira cadeia de polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 203):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKVT ITCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTDH FLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KDRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHKNIGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[00606] Os resíduos 1-106 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M19 correspondem ao Domínio VL alternativo de CD19 mAb 1 (SEQ ID NO: 195). Os resíduos 107-114 (sublinhado duplo) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M19 correspondem ao Ligante 1 (GGGSGGGG; SEQ ID NO: 16). Os resíduos 115-239 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M19 correspondem ao Domínio VH de CD3 mAb 1 M9 (SEQ ID NO: 100), em que a posição 65 de Kabat (sublinhado duplo) é aspartato (D). Os resíduos 240-245 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M19 correspondem a um Ligante 2 (GGCGGG; SEQ ID NO: 17). Os resíduos 246-273 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1-M19 correspondem à "bobina E" de promoção de heterodímero (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK; SEQ ID NO:29). Os resíduos 274-276 da primeira

cadeia de polipeptídeo de CD19–M19 correspondem a um ligante GGG. Os resíduos 277–286 (sublinhado único) da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M19 correspondem ao Ligante DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40). Os resíduos 287–503 da primeira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M19 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de protuberância" de IgG1 (SEQ ID NO: 48).

[00607] Visto que o domínio VL do CD3 mAb 1 M19 é o mesmo que o do CD3 mAb 1, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M19 é a mesma que a da segunda cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD19.1–M18 (*isto é*, SEQ ID NO: 194). A sequência de aminoácidos da terceira cadeia de polipeptídeo de CD19.1–M13 é a mesma da terceira cadeia de polipeptídeo do diacorpo CD123–WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

[00608] Diacorpos tipo DART–B CD19 x CD3 adicionais especificamente contemplados são semelhantes aos CD19–WT descritos acima (consulte, o décimo–quarto diacorpo DART–B ilustrativo), mas compreenderão o domínio VH de mAb CD3 mAb 1 M13, M17, ou M19. Esses diacorpos compreenderão uma primeira cadeia polipeptídica com uma das seguintes sequências de aminoácidos:

[00609] SEQ ID NO: 204 para tal diacorpo que compreende o Domínio VH de CD3 mAb 1 M13:

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAEWG QGTLVTVSSA STKGEVAACE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH

NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

[00610] SEQ ID NO: 205 para tal diacorpo que compreende o Domínio VH de CD3 mAb 1 M17:

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTTAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNFGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSA STKGEVAACE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

[00611] SEQ ID NO: 206 para tal diacorpo que compreende o Domínio VH de CD3 mAb 1 M19:

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW VRQAPGKGLE WVGRIRSKYN NYATYYADSV KGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHKNIGN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSA STKGEVAACE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

[00612] As segundas cadeias de polipeptídeo de tais diacorpos terão a mesma sequência de aminoácidos de CD19-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 192) e a terceira cadeia de polipeptídeo de tais diacorpos terá a mesma sequência de aminoácidos que a terceira cadeia de polipeptídeo de CD123-WT (*isto é*, SEQ ID NO: 176).

[00613] Como será reconhecido em vista da presente revelação, diacorpos adicionais do tipo DART-B que têm um local de ligação para Antígenos de Doença alternativos e/ou que têm os Domínios de Ligação CD3 de anticorpos anti-CD3 variantes alternativos (*isto é*, Domínios de Ligação vCD3) pode igualmente ser construído (empregando-se os Domínios VL e VH de tais anticorpos). Da mesma forma, conforme fornecido no presente documento, moléculas alternativas do tipo DART-B podem da mesma forma ser construídas incorporando Ligantes alternativos e/ou domínios de promoção de heterodímero alternativos.

[00614] Moléculas exemplificativas adicionais capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula que expressa um Antígeno de Doença (*por exemplo*, uma célula tumoral) que podem ser usadas nos métodos da presente invenção incluem moléculas biespecíficas capazes de ligar: CD19 e CD3 (consulte, *por exemplo*, Patente número US 7.235.641 e WO 2016/048938); CD123 e CD3 (consulte, *por exemplo*, Kuo, S.R. *et al*. (2012) "*Engineering a CD123xCD3 Bispecific scFv Immunofusion For The Treatment Of Leukemia And Elimination Of Leukemia Stem Cells*," Protein Eng Des Sel. 25:561-9; WO 2015/026892; WO 2016/086189); gpA33 e CD3 (*por exemplo*, WO 2015/026894); CEA e CD3 (*por exemplo*, WO 2013/012414; WO 2017/118675); B7-H3 e CD3 (*por exemplo*, WO 2017/030926); HER2 e CD3 (*por exemplo*, WO 2012/143524); 5T4 e CD3 (*por exemplo*,

WO 2015/184203 e WO 2013/041687), e outras moléculas que têm um domínio de ligação CD3 (consulte, *por exemplo*, WO 2013/026835, WO 2013/158856, WO 2014/110601, WO 2016/182751, WO 2017/053469 *etc*.). Como será reconhecido em vista da presente revelação, os domínios de ligação vCD3 da presente invenção podem ser incorporados em tais moléculas.

C. MOLÉCULAS DO TIPO TRIVALENTE

[00615] As moléculas do tipo TRIVALENTE são moléculas trivalentes com capacidade de se ligar até a três epítopos diferentes. Em particular, as moléculas do tipo TRIVALENTE da presente invenção com capacidade de ligar CD3 e um antígeno de doença (*por exemplo*, um antígeno de câncer ou doença infecciosa) e pode ainda ligar um antígeno de adição, tal como um antígeno de doença adicional (*por exemplo*, um antígeno de câncer ou doença infecciosa) ou um antígeno adicional expresso na superfície de uma célula efetora (*por exemplo*, CD8), ou pode ligar a um segundo epítopo de CD3 ou um segundo epítopo do Antígeno de Doença. As moléculas do tipo TRIVALENTE compreendem um domínio Fc. São fornecidos aqui diacorpos ilustrativos do tipo TRIVALENTE compostos por quatro cadeias de polipeptídeo e têm um local de ligação para CD3, um local de ligação para o antígeno de câncer CD123 ou para o antígeno de câncer 5T4 e um local de ligação para CD8 (consulte, *por exemplo*, Figura 6A). As moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE da invenção são geradas com uso da primeira e da segunda cadeias de polipeptídeo dos diacorpos do tipo DART-B fornecidos acima em combinação com a terceira e a quarta cadeias de polipeptídeo ilustrativas fornecidas abaixo, que fornecem o domínio de ligação CD8. A primeira e a segunda cadeias de polipeptídeo formam os Domínios de Ligação CD3 e

DA, enquanto a terceira e a quarta cadeias de polipeptídeo formam o Domínio de Ligação CD8. A primeira e a terceira cadeias de polipeptídeo formam um Domínio Fc.

[00616] As moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE fornecem abaixo, sendo que cada uma incorpora uma terceira cadeia de polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 187:

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH YDGYYHFFDS WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLS CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNRY TQKSLSLSPG K

[00617] Os resíduos 1–121 da terceira cadeia de polipeptídeo de tais moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE correspondem ao Domínio VH do anticorpo anti–CD8 TRX2 (SEQ ID NO: 120). Os resíduos 121–219 da terceira cadeia de polipeptídeo de tal molécula ilustrativa do tipo TRIVALENTE correspondem a um Domínio IgG1 CH1 (SEQ ID NO: 1). Os resíduos 220–234 da terceira cadeia de polipeptídeo de tal molécula ilustrativa do tipo TRIVALENTE correspondem a um Domínio de articulação de IgG1 (SEQ ID NO: 5). Os resíduos 235–451 correspondem ao Domínio CH2–CH3 "portador de orifício" de IgG1 (SEQ ID NO: 50).

[00618] As moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE descritas abaixo incorporam, cada uma, uma quarta

cadeia de polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 188:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

[00619] Os resíduos 1–106 da quarta cadeia de polipeptídeo de tais moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE correspondem ao Domínio VL do anticorpo anti-CD8 TRX2 (SEQ ID NO: 121). Os resíduos 107–213 correspondem a um domínio CL Kappa (SEQ ID NO: 14).

[00620] As SEQ ID NOs. das cadeias de polipeptídeo de moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE estão resumidas na Tabela 10.

Tabela 10
Moléculas TRIDENTE CD123 x CD3 x CD8

Tipo TRIDENTE Número	Domínio de ligação ao antígeno de doença	CD3 Domínio de ligação	Cadeia de polipeptídeo				Designação
			Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	
			Ligação CD123 / CD3 Domínios		Ligação CD8 Domínios		
1	CD123 mAb 1	CD3 mAb 1	SEQ ID NO:174	SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:187	SEQ ID NO:188	T-CD123-WT
2		CD3 mAb 1 M1	SEQ ID NO:177				T-CD123-M1
3		CD3 mAb 1 M2	SEQ ID NO:178				T-CD123-M2
4		CD3 mAb 1 M18	SEQ ID NO:179				T-CD123-M18

1. PRIMEIRA MOLÉCULA ILUSTRATIVA DO TIPO TRIVALENTE

T-CD123-WT (CD123 MAB 1 X CD3 MAB 1 X TRX2)

[00621] Uma primeira molécula ilustrativa do tipo TRIVALENTE (designada "T-CD123-WT") contém os domínios VH e VL do CD123 mAb 1, os domínios VH e VL do CD3 mAb 1 e os domínios VH e VL do anticorpo anti-CD8 TRX2. Conforme indicado acima, a sequência de aminoácidos da primeira cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-WT descrito acima (SEQ ID NO: 174). Da mesma forma, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-WT descrito acima (SEQ ID NO: 175). Também indicado acima, as sequências de aminoácidos da terceira e da quarta cadeias de polipeptídeo de todas as moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE são SEQ ID NO: 187 e SEQ ID NO: 188, respectivamente.

2. SEGUNDA MOLÉCULA ILUSTRATIVA DO TIPO TRIVALENTE T-CD123-M1 (CD123 MAB 1 X CD3 MAB 1 M1 X TRX2)

[00622] Uma segunda molécula ilustrativa do tipo TRIVALENTE (designada "T-CD123-M1") contém os domínios VH e VL do CD123 mAb 1, os domínios VH e VL do CD3 mAb 1 M1 e os domínios VH e VL do anticorpo anti-CD8 TRX2. Conforme indicado acima, a sequência de aminoácidos da primeira cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-M1 descrito acima (SEQ ID NO: 177). Da mesma forma, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-WT descrito acima (SEQ ID NO: 175). Também como indicado acima, as sequências de aminoácidos da terceira e da quarta cadeias de polipeptídeo de todas as moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE são SEQ ID NO: 187 e SEQ ID NO: 188, respectivamente.

3. TERCEIRA MOLÉCULA ILUSTRATIVA DO TIPO TRIVALENTE T-CD123-M2 (CD123 MAB 1 X CD3 MAB 1 M2 X TRX2)

[00623] Uma terceira molécula ilustrativa do tipo TRIVALENTE designada ligações T-CD123-M2 contém os domínios VH e VL do CD123 mAb 1, os domínios VH e VL do CD3 mAb 1 M2 e os domínios VH e VL do anticorpo anti-CD8 TRX2. Conforme indicado acima, a sequência de aminoácidos da primeira cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-M2 descrito acima (SEQ ID NO: 178). Da mesma forma, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-WT descrito acima (SEQ ID NO: 175). Também indicado acima, as sequências de aminoácidos da terceira e da quarta cadeias de polipeptídeo de todas as moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE são SEQ ID NO: 187 e SEQ ID NO: 188, respectivamente.

4. QUARTA MOLÉCULA ILUSTRATIVA DO TIPO TRIVALENTE T-CD123-M18 (CD123 MAB 1 X CD3 MAB 1 M18 X TRX2)

[00624] Uma quarta molécula ilustrativa do tipo TRIVALENTE designada ligações T-CD123-M18 contém os domínios VH e VL do CD123 mAb 1, os domínios VH e VL do CD3 mAb 1 M18 e os domínios VH e VL do anticorpo anti-CD8 TRX2. Conforme indicado acima, a sequência de aminoácidos da primeira cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-M18 descrito acima (SEQ ID NO: 179). Da mesma forma, a sequência de aminoácidos da segunda cadeia de polipeptídeo é a mesma do diacorpo CD123-WT descrito acima (SEQ ID NO: 175). Também indicado acima, as sequências de aminoácidos da terceira e da quarta cadeias de polipeptídeo de todas as moléculas ilustrativas do tipo TRIVALENTE são SEQ ID NO: 187 e SEQ ID NO: 188, respectivamente.

[00625] Como será reconhecido em vista da presente revelação, diacorpos adicionais do tipo TRIVALENTE que têm um

local de ligação para Antígenos de Doença alternativos e/ou que têm os Domínios de Ligação CD3 de anticorpos anti-CD3 variantes alternativos (*isto é*, Domínios de Ligação vCD3) pode igualmente ser construído (empregando-se os Domínios VL e VH de tais anticorpos). Da mesma forma, conforme fornecido no presente documento, moléculas alternativas do tipo TRIVALENTE podem da mesma forma ser construídas incorporando Ligantes alternativos e/ou domínios de promoção de heterodímero alternativos.

[00626] Moléculas exemplificativas adicionais capazes de mediar a morte redirecionada de uma célula que expressa um Antígeno de Doença (*por exemplo*, uma célula tumoral) que podem ser usadas nos métodos da presente invenção incluem moléculas trivalentes capazes de ligar: B7-H3, CD3 e CD8 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184203); 5T4, CD3 e CD8 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184203); ROR1, CD3 e CD8 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184203 e WO 2017/106061); HIV, CD3 e CD8 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184203; WO2017/011413; e WO2017/011414); gpA33, CD3 e DR5 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184207); EphA2, CD3 e DR5 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184207); gpA33, CD3 e EphA2 (consulte, *por exemplo*, WO 2015/184207); e outras moléculas trivalentes (consulte, *por exemplo*, WO 2016/105450; WO 2016/115274; WO 2017/180913). Como será reconhecido em vista da presente revelação, os domínios de ligação vCD3 da presente invenção podem ser incorporados em tais moléculas.

VIII. MÉTODOS DE PRODUÇÃO

[00627] As moléculas da presente invenção são, com a maior preferência, produzidas através da expressão recombinante de moléculas de ácido nucleico que codificam tais

polipeptídeos, como é bem conhecido na técnica.

[00628] Os polipeptídeos da invenção podem ser convenientemente preparados com uso de síntese de peptídeos em fase sólida (Merrifield, B. (1986) "*Solid Phase Synthesis*," Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

[00629] Os anticorpos podem ser feitos de forma recombinante e expressos com uso de qualquer método conhecido na técnica. Os anticorpos podem ser feitos de forma recombinante isolando-se primeiro os anticorpos feitos de animais hospedeiros, obtendo a sequência do gene e usando a sequência do gene para expressar o anticorpo de forma recombinante em células hospedeiras (*por exemplo*, células CHO). Outro método que pode ser empregado é expressar a sequência do anticorpo em plantas (*por exemplo*, tabaco) ou leite transgênico. Métodos adequados para expressar anticorpos de forma recombinante em plantas ou leite foram revelados (consulte, por exemplo, Peeters *et al.* (2001) "*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*," Vaccine 19:2756; Lonberg, N. *et al.* (1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*," Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock *et al.* (1999) "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*," J. Immunol. Methods 231:147-157). Os métodos adequados para a preparação de derivados de anticorpos, *por exemplo*, humanizados, de cadeia única *etc.*, são conhecidos na técnica e foram descritos acima. Em outra alternativa, os

anticorpos podem ser feitos de forma recombinante por tecnologia de exibição de fago (consulte, por exemplo, Patentes números US 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; e Winter, G. *et al.* (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*," Annu. Rev. Immunol. 12,433-455).

[00630] Os vetores que contêm polinucleotídeos de interesse (*por exemplo*, polinucleotídeos que codificam as cadeias de polipeptídeo das moléculas de ligação da presente invenção) podem ser introduzidos na célula hospedeira por qualquer um dentre uma série de meios apropriados, incluindo eletroporação, transfecção que emprega cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, cálcio fosfato, DEAE-dextrano ou outras substâncias; bombardeio de microprojéteis; lipofecção; e infecção (*por exemplo*, em que o vetor é um agente infeccioso, como o vírus vaccinia). A escolha de introduzir vetores ou polinucleotídeos dependerá frequentemente das características da célula hospedeira.

[00631] Qualquer célula hospedeira capaz de superexpressar DNAs heterólogos pode ser usada com o propósito de expressar um polipeptídeo ou proteína de interesse. Exemplos não limitativos de células hospedeiras de mamíferos adequados incluem, mas não estão limitados a células COS, HeLa e CHO.

[00632] A invenção inclui polipeptídeos que compreende uma sequência de aminoácidos de uma molécula de ligação desta invenção. Os polipéptidos dessa invenção podem ser produzidos por procedimentos conhecidos na técnica. Os polipéptidos podem ser produzidos por degradação proteolítica ou outra dos anticorpos, por métodos recombinantes (*isto é*, polipéptidos simples ou de fusão) como descrito acima ou por síntese química. Os polipeptídeos dos anticorpos,

especialmente polipeptídeos mais curtos com até cerca de 50 aminoácidos, são convenientemente produzidos por síntese química. Os métodos de síntese química são conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente.

[00633] A invenção inclui variantes das moléculas de ligação reveladas, incluindo polipeptídeos funcionalmente equivalentes que não afetam significativamente as propriedades de tais moléculas, bem como variantes que aumentaram ou diminuíram a atividade. A modificação de polipeptídeos é prática de rotina na técnica e não precisa ser descrita em detalhes no presente documento. Exemplos de polipeptídeos modificados incluem polipeptídeos com substituições conservativas de resíduos de aminoácidos, uma ou mais deleções ou adições de aminoácidos que não alteram significativamente a atividade funcional deletéria ou o uso de análogos químicos. Os resíduos de aminoácidos que podem ser substituídos conservativamente uns pelos outros incluem, mas não estão limitados a: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutâmico; lisina/arginina; e fenilalanina/tirosina. Esses polipeptídeos também incluem polipeptídeos glicosilados e não glicosilados, bem como polipeptídeos com outras modificações pós-tradução, como, por exemplo, glicosilação com diferentes açúcares, acetilação e fosforilação. Preferencialmente, as substituições de aminoácidos seriam conservativas, *isto é*, o aminoácido substituído possuiria propriedades químicas semelhantes às do aminoácido original. Tais substituições conservativas são conhecidas na técnica e exemplos foram fornecidos acima. As modificações de aminoácidos podem variar de alterar ou

modificar um ou mais aminoácidos até o redesenho completo de uma região, como o domínio variável. As mudanças no domínio variável podem alterar a afinidade de ligação e/ou especificidade. Outros métodos de modificação incluem o uso de técnicas de acoplamento conhecidas na técnica, incluindo, mas sem limitação, meios enzimáticos, substituição oxidativa e quelação. As modificações podem ser utilizadas, por exemplo, para a fixação de marcadores para imunoensaio, tal como a fixação de porções radioativas para radioimunoensaio. Os polipeptídeos modificados são feitos com uso de procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser rastreados com uso de uso ensaios padrão conhecidos na técnica.

[00634] Em uma modalidade, é fornecido um polipeptídeo de fusão que compreende uma cadeia leve, uma cadeia pesada ou ambas as cadeias leve e pesada. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão contém uma região constante de imunoglobulina heteróloga. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão contém um domínio VH e um domínio VL de um anticorpo produzido a partir de um hibridoma depositado publicamente. Para os fins dessa invenção, uma proteína de fusão de anticorpo contém um ou mais domínios polipeptídicos que se ligam especificamente a CD3, ou tanto CD3 qaunto a um antígeno de doença, e que contém outra sequência de aminoácidos à qual não está ligada na molécula nativa, para exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência homóloga de outra região.

[00635] A presente invenção abrange particularmente tais moléculas de ligação (*por exemplo*, anticorpos, diacorpos, moléculas de ligação trivalentes *etc.*) conjugadas a uma porção de diagnóstico ou terapêutica. Para fins de diagnóstico, as moléculas de ligação da invenção podem

ser acopladas a uma substância detectável. Essas moléculas de ligação são úteis para monitorar e/ou prognosticar o desenvolvimento ou progressão de uma doença como parte de um procedimento de teste clínico, como a determinação da eficácia de uma terapia particular. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas (*por exemplo,* peroxidase de rábano, beta-galactosidase *etc.*), grupos protéticos (*por exemplo,* avidina/biotina), materiais fluorescentes (por exemplo, umbeliferona, fluoresceína ou ficoeritrina), materiais luminescentes (*por exemplo*, luminol), materiais bioluminescentes (*por exemplo*, luciferase ou aequorina), materiais radioativos (*por exemplo*, carbono-14, manganês-54, estrôncio-85 ou zinco-65), metais emissores de pósitrons e íons metálicos paramagnéticos não radioativos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente à molécula de ligação ou indiretamente, através de um intermediário (*por exemplo*, um ligante) com uso de técnicas conhecidas na técnica.

[00636] Para fins terapêuticos, as moléculas de ligação da invenção podem ser conjugadas a uma fração terapêutica, tal como uma citotoxina, (*por exemplo*, um agente citostático ou citocida), um agente terapêutico ou um íon metálico radioativo, *por exemplo*, emissores alfa. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial às células, como, por exemplo, exotoxina de Pseudomonas, toxina da difteria, uma toxina botulínica A a F, abrina de ricina, saporina e fragmentos citotóxicos de tais agentes. Um agente terapêutico inclui qualquer agente com um efeito terapêutico para tratar profilaticamente ou terapeuticamente um distúrbio. Tais agentes terapêuticos podem

ser agentes terapêuticos químicos, agentes terapêuticos de proteínas ou polipeptídeos e incluem agentes terapêuticos que possuem uma atividade biológica desejada e/ou modificam uma determinada resposta biológica. Exemplos de agentes terapêuticos incluem agentes alquilantes, inibidores de angiogênese, agentes antimitóticos, agentes de terapia hormonal e anticorpos úteis para o tratamento de distúrbios proliferativos celulares. A porção química terapêutica pode ser acoplada ou conjugada diretamente à molécula de ligação ou indiretamente, através de um intermediário (*por exemplo*, um ligante) com uso de técnicas conhecidas na técnica.

IX. USOS DAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO

[00637] Como discutido acima, as moléculas capazes de se ligar a CD3 e um Antígeno de Doença são capazes de mediar a morte celular redirecionada de uma célula alvo (*isto é*, uma célula cancerosa ou uma célula infectada por patógeno) que expressa tal Antígeno de Doença em sua superfície celular. Essas moléculas podem ser utilizadas para fins terapêuticos, por exemplo, em indivíduos com câncer ou uma infecção. Assim, as moléculas de ligação da presente invenção têm a capacidade de tratar qualquer doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de um antígeno de doença, particularmente um antígeno de câncer ou um antígeno associado a patógenos, na superfície de tal célula alvo. Assim, sem limitação, as moléculas de ligação da presente invenção podem ser utilizadas no tratamento de câncer, particularmente um câncer caracterizado pela expressão de um antígeno de câncer. As moléculas de ligação da presente invenção podem ser empregadas no tratamento de infecção, particularmente uma

infecção caracterizada pela expressão de um antígeno associado a patógenos.

[00638] Em particular, a presente invenção abrange tais métodos em que a molécula capaz de se ligar a CD3 compreende um Domínio de Ligação ao Epítopo de um anticorpo que é capaz de se ligar ao CD3 e também compreende um Domínio de Ligação ao Epítopo capaz de se ligar a um Antígeno de Doença (em particular um Câncer Antígeno ou um Antígeno Associado a Patógenos) na superfície de uma célula-alvo de modo a mediar a morte redirecionada da célula-alvo (por exemplo, mediando a morte celular redirecionada (*por exemplo*, citotoxicidade redirecionada de células T)).

[00639] Em uma modalidade específica, a molécula capaz de se ligar ao CD3 e ao Antígeno da Doença é um anticorpo biespecífico, ou uma molécula que compreende os Domínios de Ligação ao Epítopo do mesmo, (incluindo um scFv biespecífico um BiTe, um TandAb).

[00640] Em uma modalidade específica, a molécula capaz de se ligar a CD3 e o Antígeno de Doença é um diacorpo biespecífico.

[00641] Em uma modalidade específica, a molécula capaz de se ligar a CD3 e o Antígeno de Doença é uma molécula de ligação trivalente.

[00642] "Fornecimento de uma terapia" ou "tratamento" se refere a qualquer administração de uma composição que está associada a qualquer indício de resultado benéfico ou desejado, incluindo, sem limitação, qualquer resultado clínico, como diminuição dos sintomas resultantes da doença, atenuando um sintoma de infecção (*por exemplo*, carga viral, febre, dor, sepse *etc.*) um encolhimento do tamanho de

um tumor (no contexto de câncer, por exemplo, um tumor de mama, câncer gástrico ou de próstata), um retardo do crescimento de células cancerosas, um retardo no início, desenvolvimento ou progressão da metástase, uma diminuição de um sintoma resultante da doença, um aumento da qualidade de vida do indivíduo receptor, uma diminuição da dose de outros medicamentos fornecidos para tratar a doença de um indivíduo, um aumento do efeito de outro medicamento, como através de direcionamento e/ou internalização, um retardo da progressão da doença e/ou um prolongamento da sobrevivência do indivíduo receptor.

[00643] Os indivíduos para tratamento incluem animais, com máxima preferência, espécies de mamíferos, como não primatas (*por exemplo*, bovinos, equinos, felinos, caninos, roedores *etc.*) ou um primata (*por exemplo*, macacos como um macaco cinomolgo, humano *etc.*). Em uma modalidade preferida, o indivíduo é um humano.

[00644] Distúrbios exemplificativos que podem ser tratados por várias modalidades da presente invenção incluem, mas sem limitação, distúrbios proliferativos, distúrbios proliferativos celulares e câncer (especialmente um câncer que expressa um Antígeno de Câncer ligado por uma molécula capaz de mediar a morte celular redirecionada), doenças associadas a patógenos (especialmente uma infecção viral crônica associada à expressão de um antígeno associado a patógenos ligado por uma molécula capaz de mediar a morte celular redirecionada). Em várias modalidades, a invenção abrange métodos e composições para tratamento, prevenção ou gerenciamento de uma doença ou distúrbio em um indivíduo, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade

terapeuticamente eficaz das moléculas de ligação da presente invenção. Essas moléculas são particularmente úteis para a prevenção, inibição, redução do crescimento ou regressão de tumores primários e metástases de tumores e para reduzir a carga de patógenos ou eliminar células infectadas por patógenos. Embora não pretendam estar ligados a um mecanismo de ação específico, tais moléculas podem mediar a função efetora contra células alvo, promover a ativação do sistema imunológico contra células alvo, reticular antígenos de superfície celular e/ou receptores em células alvo e aumentar a apoptose ou sinalização reguladora de crescimento negativa, ou uma combinação das mesmas, resultando em eliminação e/ou redução no número de células alvo.

[00645] Os cânceres que podem ser tratados por moléculas da presente invenção e pelos métodos da presente invenção incluem, mas sem limitação: câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular e câncer uterino.

[00646] Em particular, as moléculas de ligação CD19 x CD3, moléculas de ligação CD19 x CD3 x CD8, moléculas de ligação CD123 x CD3 e moléculas de ligação CD123 x CD3 x CD8 da presente invenção podem ser usadas no tratamento de um câncer hematológico incluindo, mas sem limitação: leucemia mielóide aguda (AML), leucemia mielóide crônica (CML), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B), leucemia linfocítica crônica (CLL), incluindo

síndrome de Richter ou transformação de Richter de CLL, leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitóides blásticas (BPDCN), linfoma não Hodgkin (NHL), incluindo linfoma de células de manto (MCL) e linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitose sistêmica e linfoma de Burkitt.

[00647] As doenças associadas a patógenos que podem ser tratadas pelas moléculas de ligação LAG-3 da presente invenção incluem infecções crônicas virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias. As infecções crônicas que podem ser tratadas pelas moléculas de ligação LAG-3 da presente invenção incluem vírus de Epstein-Barr, vírus da hepatite A (HAV); Vírus da Hepatite B (HBV); Vírus da Hepatite C (HCV); vírus do herpes (*por exemplo*, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da estomatite vesicular (VSV), *Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter, Gonococci, Helicobacter pylori, Klebsiella, Legionella, Meningococci,* mycobacteria, *Pseudomonas, Pneumonococci,* rickettsia bacteria, *Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci, Tetanus, Aspergillus* (fumigatus, niger, *etc.*), *Blastomyces dermatitidis, Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, *etc.*), *Cryptococcus neoformans,* Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Leptospirosis, Borrelia burgdorferi,* helminth parasite (hookworm, tapeworms, flukes, flatworms (*por exemplo, Schistosomia*), *Giardia lambia, trichinella, Dientamoeba Fragilis, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi,* e *Leishmania donovani*).

X. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00648] A presente invenção abrange composições que compreendem uma molécula capaz de se ligar a CD3 e também capaz de se ligar a um antígeno de doença (*por exemplo*, uma molécula de ligação DA x CD3, incluindo, por exemplo, uma molécula de ligação DA x CD3 x CD8, uma DA x CD3 x DA Binding Molecule *etc.*). As composições da invenção incluem composições de fármacos a granel úteis na fabricação de composições farmacêuticas (*por exemplo*, composições impuras ou não estéreis) e composições farmacêuticas (*isto é*, composições que são adequadas para administração a um indivíduo ou paciente) que podem ser usadas no preparação de formas de dosagem unitária. Tais composições compreendem uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de uma molécula capaz de se ligar a CD3 e também capaz de se ligar a um Antígeno de Doença de modo a ser capaz de mediar a morte redirecionada de uma célula alvo (*por exemplo*, uma célula cancerosa, um agente patogênico infectado célula *etc.*), ou uma combinação de tais agentes e um transportador farmaceuticamente aceitável. Preferencialmente, as composições da invenção compreendem uma quantidade profilática ou terapeuticamente eficaz das moléculas de ligação da presente invenção e um transportador farmaceuticamente aceitável. Em um aspecto preferido, tais composições são substancialmente purificadas (*isto é*, substancialmente livres de substâncias que limitam seu efeito ou produzem efeitos colaterais indesejados).

[00649] Várias formulações de tais composições podem ser usadas para administração. Além do agente farmacologicamente ativo (ou agentes farmacologicamente ativos), as composições da presente invenção podem conter transportadores farmaceuticamente aceitáveisadequados que

compreendem excipientes e auxiliares que são bem conhecidos na técnica e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz ou que facilitar o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser usadas farmaceuticamente para distribuição no local de ação. Por exemplo, um excipiente pode dar forma ou consistência, ou atuar como um diluente. Excipientes adequados incluem, mas sem limitação agentes estabilizadores, agentes umectantes e emulsificantes, sais para variar osmolaridade, agentes encapsulantes, tampões e intensificadores de penetração na pele.

[00650] Em uma modalidade específica, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopeia dos Estados Unidos ou outra farmacopeia geralmente reconhecida para uso em animais e mais particularmente em humanos. O termo "transportador" se refere a um diluente, adjuvante (*por exemplo*, adjuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente ou veículo com o qual a terapêutica é administrada. Geralmente, os ingredientes das composições da invenção são fornecidos separadamente ou misturados em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado sem água em um recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Quando a composição é para ser administrada por infusão, pode ser dispensada com um frasco de infusão que contém água ou soro fisiológico estéril de grau farmacêutico. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou soro fisiológico pode ser fornecido para que os ingredientes possam ser

misturados antes da administração.

[00651] A invenção também fornece um pacote ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes cheios com uma molécula de ligação da presente invenção, sozinha ou com tal veículo farmaceuticamente aceitável. Adicionalmente, um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma doença também podem ser incluídos no pacote ou kit farmacêutico. A invenção também fornece um pacote ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente associado a tal recipiente (ou recipientes) pode estar um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regulamenta a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação da agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

[00652] A presente invenção fornece kits que podem ser usados nos métodos acima. Um kit pode compreender qualquer uma dentre as moléculas de ligação da presente invenção. O kit pode compreender ainda um ou mais outros agentes profiláticos e/ou terapêuticos úteis para o tratamento do câncer, em um ou mais recipientes.

XI. MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

[00653] As composições da presente invenção podem ser fornecidas para o tratamento, profilaxia e melhoria de um ou mais sintomas associados a uma doença, distúrbio ou infecção pela administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz das composições farmacêuticas da presente invenção. Em um aspecto preferido, tais composições são substancialmente purificadas (*isto é*, substancialmente livres de substâncias que limitam

seu efeito ou produzem efeitos colaterais indesejados). Em uma modalidade específica, o indivíduo é um animal, de preferência um mamífero, como não primata (*por exemplo*, bovino, equino, felino, canino, roedor *etc.*) ou um primata (*por exemplo*, macaco, tal como, um macaco Cinomolgo, humano *etc.*). Em uma modalidade preferida, o indivíduo é um humano.

[00654] Os métodos de administração de uma molécula ou composição da invenção incluem, mas sem limitação, administração parenteral (*por exemplo*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), epidural e mucosa (*por exemplo*, vias intranasal e oral). Em uma modalidade específica, as moléculas de ligação da presente invenção são administradas por via intramuscular, intravenosa ou subcutânea. As composições podem ser administradas por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção em bolus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (*por exemplo*, mucosa oral, mucosa retal e intestinal *etc.*) e podem ser administradas juntamente com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local.

[00655] A invenção também fornece que as preparações das moléculas de ligação da presente invenção são embaladas em um recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola ou sachê, indicando a quantidade da molécula. Em uma modalidade, tais moléculas são fornecidas como um pó liofilizado esterilizado seco ou concentrado sem água em um recipiente hermeticamente fechado e podem ser reconstituídas, *por exemplo*, com água ou soro fisiológico para a concentração apropriada para administração a um indivíduo. Preferencialmente, as moléculas de ligação da presente

invenção são fornecidas como um pó liofilizado estéril seco em um recipiente hermeticamente fechado.

[00656] As preparações liofilizadas das Moléculas de Ligação da presente invenção devem ser armazenadas entre 2 °C e 8 °C em seu recipiente original e as moléculas devem ser administradas em 12 horas, de preferência em 6 horas, em 5 horas, em 3 horas ou em 1 hora após ser reconstituído. Em uma modalidade alternativa, tais moléculas são fornecidas na forma líquida em um recipiente hermeticamente fechado indicando a quantidade e a concentração da molécula, proteína de fusão ou molécula conjugada. Preferencialmente, tais moléculas de ligação, quando fornecidas na forma líquida, são fornecidas em um recipiente hermeticamente fechado.

[00657] A quantidade de tais preparações da invenção que serão eficazes no tratamento, prevenção ou melhoria de um ou mais sintomas associados a um distúrbio pode ser determinada por técnicas clínicas padrão. A dose precisa a ser empregada na formulação também dependerá da via de administração e da gravidade da condição, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e as circunstâncias de cada paciente. As doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de resposta à dose derivadas de sistemas de teste in vitro ou em modelo animal.

[00658] Tal como no presente documento utilizado, uma "quantidade eficaz" de uma composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para efetuar os resultados benéficos ou desejados, incluindo, sem limitação, resultados clínicos, tais como diminuição dos sintomas resultantes da doença, atenuação de um sintoma de infecção (*por exemplo*, carga viral, febre, dor, sepse etc.) ou um sintoma de câncer (por exemplo, a

proliferação, de células cancerosas, presença de tumor, metástases tumorais *etc.*), aumentando assim a qualidade de vida de quem sofre da doença, diminuindo a dose de outros medicamentos necessários para tratar a doença, aumentando o efeito de outro medicamento, como via direcionamento e/ou internalização, retardando a progressão da doença e/ou prolongando a sobrevida dos indivíduos. Quando aplicado a um ingrediente ativo individual, administrado sozinho, o termo se refere a esse ingrediente sozinho. Quando aplicado a uma combinação, o termo se refere a quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, seja administrado em combinação, em série ou simultaneamente.

[00659] Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para os fins dessa invenção, uma quantidade eficaz de fármaco, composto ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente: para matar e/ou reduzir a proliferação de células cancerosas e/ou para eliminar, reduzir e/ou atrasar o desenvolvimento de metástases de um local primário de câncer; ou para reduzir a proliferação de (ou o efeito de) um patógeno infeccioso e para reduzir e/ou atrasar o desenvolvimento da doença mediada por patógeno, direta ou indiretamente. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um medicamento, composto ou composição farmacêutica pode ou não ser alcançada em conjunto com outro medicamento, composto ou composição farmacêutica. Assim, uma "quantidade eficaz" pode ser considerada no contexto da administração de um ou mais agentes quimioterapêuticos e um único agente pode ser considerado para ser dado em uma quantidade eficaz se, em conjunto com um ou mais outros agentes, um resultado desejável pode ser ou é alcançado. Embora

as necessidades individuais variem, a determinação de intervalos ideais de quantidades eficazes de cada componente está dentro da habilidade da técnica.

[00660] Para as moléculas de ligação abrangidas pela invenção, a dosagem administrada a um paciente é preferencialmente determinada com base no peso corporal (kg) do indivíduo receptor. Para as moléculas de ligação abrangidas pela invenção, a dosagem administrada a um paciente é tipicamente de cerca de 0,01 μg/kg a cerca de 30 mg/kg ou mais do peso corporal do indivíduo.

[00661] A dosagem e a frequência de administração de uma molécula de ligação da presente invenção podem ser reduzidas ou alteradas aumentando a absorção e penetração da molécula no tecido por modificações como, por exemplo, lipidação.

[00662] A dosagem de uma molécula de ligação da invenção administrada a um paciente pode ser calculada para uso como uma terapia de agente único. Alternativamente, a molécula pode ser usada em combinação com outras composições terapêuticas e a dosagem administrada a um paciente é menor do que quando as ditas moléculas são usadas como uma terapia de agente único.

[00663] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas localmente na área que necessita de tratamento; isto pode ser conseguido por, por exemplo, e não por meio de limitação, infusão local, por injeção ou por meio de um implante, sendo que o dito implante é de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, tal como sialástico membranas ou fibras. Preferencialmente, ao administrar uma molécula da invenção, deve-se ter cuidado ao

usar materiais para os quais a molécula não absorve.

[00664] As composições da invenção podem ser administradas em uma vesícula, em particular um lipossoma (consulte, Langer (1990) *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527–1533); Treat *et al.*, in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez–Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353– 365 (1989); Lopez–Berestein, ibid., pp. 3 17–327).

[00665] O tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de uma molécula de ligação da presente invenção pode incluir um único tratamento ou, de preferência, pode incluir uma série de tratamentos. Em um exemplo preferido, um indivíduo é tratado com uma composição farmacêutica da invenção por entre cerca de 1 a 10 semanas, de preferência entre 2 a 8 semanas, mais preferencialmente entre cerca de 3 a 7 semanas, e ainda mais preferencialmente por cerca de 4, 5, ou 6 semanas. As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas uma vez por dia, com tal administração ocorrendo uma vez por semana, duas vezes por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada dois meses, duas vezes por ano ou uma vez por ano *etc*. Alternativamente, as composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas duas vezes por dia com tal administração ocorrendo uma vez por semana, duas vezes por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada dois meses, duas vezes por ano ou uma vez por ano *etc*. Alternativamente, as composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas três vezes ao dia, com tal administração ocorrendo uma vez por semana,

duas vezes por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada dois meses, duas vezes por ano ou uma vez por ano *etc*. Também será apreciado que a dosagem eficaz das moléculas usadas para o tratamento pode aumentar ou diminuir ao longo de um tratamento particular.

XII. MODALIDADES ESPECÍFICAS DA INVENÇÃO

[00666] As modalidades específicas da invenção incluem as modalidades E1–E27:

[00667] E1. Uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação CD3 com capacidade de se ligar a um epítopo de CD3 e um domínio de ligação ao antígeno de doença com capacidade de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença, em que o dito domínio de ligação CD3 compreende:

[00668] (I) (A) um domínio CDR_H1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95 e SEQ ID NO:97;

[00669] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[00670] (C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

[00671] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[00672] (E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

[00673] (F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; ou

[00674] (II) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

[00675] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[00676] (C) um domínio CDR_H3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105 e SEQ ID NO:107;

[00677] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[00678] (E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

[00679] (F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; ou

[00680] (III) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

[00681] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[00682] (C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

[00683] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[00684] (E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

[00685] (F) um domínio CDR_L3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:109 ou SEQ ID NO:111; ou

[00686] (IV) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

[00687] (B) um domínio CDR_H2 que compreende a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

[00688] (C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

[00689] (D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

[00690] (E) um domínio CDR_L2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:113 e SEQ ID NO:115; e

[00691] (F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62.

[00692] E2. A molécula de ligação DA x CD3 de E1, em que o dito domínio de ligação CD3 compreende:

[00693] (I) (A) um domínio VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

[00694] (B) um domínio VH que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104 e SEQ ID NO:106; ou

[00695] (II) (A) um domínio VL que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112; e SEQ ID NO:114;

[00696] (B) um domínio VH que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55.

[00697] E3. Amolécula de ligação DA x CD3, de acordo com E1 ou E2, em que DA x CD3 é um anticorpo bisespecífico, um diacorpo bisespecífico, um scFv

bisespecífico, um TandAb bisespecífico, ou uma molécula de ligação trivalente.

[00698] E4. A molécula de ligação da x cd3, de acordo com E1 ou E3, em que a dita molécula de ligação DA x CD3 tem capacidade de se ligar a mais que um antígeno de doença e/ou uma molécula de superfície de célula diferente de uma célula efetora.

[00699] E5. A molécula de ligação DA x CD3, de acordo com E1 ou E4, em que o dito antígeno de doença é um antígeno de câncer.

[00700] E6. A molécula de ligação DA x CD3, de acordo com qualquer um dentre E1 a E4, em que o dito antígeno de doença é um antígeno associado ao patógeno.

[00701] E7. A molécula de ligação DA x CD3, de acordo com qualquer um dentre E4 a E6, em que a dita molécula de superfície de célula diferente de uma célula efetora é CD2, CD8, CD16, TCR, NKp46 ou NKG2D.

[00702] E8. A molécula de ligação DA x CD3, de acordo com E5 ou E7, em que o dito antígeno de câncer é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos de câncer: 19,9, 4,2, ADAM-9, AH6, ALCAM, B1, B7-H3, BAGE, beta-catenina, grupo sanguíneo ALe^b/Le^y, antígeno de linfoma de Burkitt-38,13, C14, CA125, Carboxipeptidase M, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD36, CD40/CD154, CD45, CD56, CD46, CD52, CD56, CD79a/CD79b, CD103, CD123, CD317, CDK4, CEA, CEACAM5/CEACAM6, CO17-1A, CO-43, CO-514, CTA-1, CTLA-4, Citoqueratina 8, D1.1, $D_1$56-22, DR5, série E_1, EGFR, um receptor de Efrina, EphA2, Erb, GAGE, um gangliosídeo GD2/GD3/GM2, GICA 19-9, gp100, Gp37, gp75, gpA33, HER2/neu, HMFG, Papilomavírus Humano-E6/Papilomavírus Humano-E7, HMW-

MAA, antígeno I, IL13Rα2, Integrina β6, JAM-3, KID3, KID31, KS 1/4 antígeno de pan-carcinoma, L6,L20, LEA, LUCA-2, M1:22:25:8, M18, M39, MAGE, MART, mesotelina, MUC-1, MUM-1, Myl, N-acetilglucosaminiltransferase, neoglicoproteína, NS-10, OFA-1, OFA-2, Oncostatina M, p15, p97, PEM, PEMA, PIPA, PSA, PSMA, fosfato de ácido prostático, R_{24}, ROR1, um esfingolipídio, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, sTn, o peptídeo derivado do receptor de células T, T_5A_7, TAG-72, TL5, receptor TNF, receptor TNF-γ, TRA-1-85, um Receptor de Transferrina, 5T4, TSTA, VEGF, um Receptor VEGF, VEP8, VEP9, VIM-D5 e hapteno Y, Le^y.

[00703] E9. A molécula de ligação DA x CD3, de acordo com E8, em que o dito antígeno de doença é B7-H3, CEACAM5/CEACAM6, EGRF, EphA2, gpA33, HER2/neu, VEGF, 5T4, IL13Rα2, CD123, CD19 ou ROR1.

[00704] E10. A molécula de ligação DA x CD3, de E6 ou E7, em que o dito antígeno associado ao patógeno é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

[00705] E11. A molécula de ligação DA x CD3, de qualquer uma de E1 a E10, em que a dita molécula de ligação DA x CD3 compreende: uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma

segunda cadeia de polipeptídeo, covalentemente ligados entre si, em que:

[00706] (A) a primeira cadeia de polipeptídeo compreende, na direção do terminal N ao terminal C:

[00707] (i) um domínio 1, que compreende:

[00708] (1) um subdomínio (1A), que compreende um domínio VL de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de um antígeno de doença (VL_{DA}); e

[00709] (2) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VH de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de CD3 (VH_{CD3});

[00710] em que os ditos subdomínios 1A e 1B são separados um do outro por um peptídeo ligante; e

[00711] (ii) um domínio 2, em que o dito domínio 2 é um domínio de promoção de heterodímero;

[00712] (B) a segunda cadeia de polipeptídeo compreende, na direção do terminal N ao terminal C:

[00713] (i) um domínio 1, que compreende:

[00714] (1) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VL de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de CD3 (VL_{CD3}); e

[00715] (2) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VH do dito anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de um antígeno de doença (VH_{DA});

[00716] em que os ditos subdomínios 1A e 1B são separados um do outro por um peptídeo ligante;

[00717] (ii) um domínio 2, em que o dito domínio 2 é um domínio de promoção de heterodímero, em que o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira e da dita segunda cadeias de polipeptídeo são diferentes;

[00718] e em que:

[00719] (a) o domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno de doença e o domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação CD3; ou

[00720] (b) o domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação CD3 e o domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno de doença.

[00721] E12. A Molécula de Ligação DA x CD3 de E11, em que:

[00722] (A) o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina E e o dito domínio de promoção de heterodímero da dita segunda cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina K; ou

[00723] (b) o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina K e o dito domínio de promoção de heterodímero da dita segunda cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina E.

[00724] E13. A molécula de ligação DA x CD3, de E11 ou E12, em que a primeira ou segunda cadeia de polipeptídeo adicionalmente compreender um domínio 3 que compreende um domínio CH2 e CH3 de um domínio Fc de imunoglobulina.

[00725] E14. A molécula de ligação DA x CD3, de

E13, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende ainda uma terceira cadeia de polipeptídeo que compreende um domínio CH2 e CH3 de um domínio Fc de imunoglobulina.

[00726] E15. A molécula de ligação DA x CD3, de E11 a E14, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende ainda um domínio de ligação CD8.

[00727] E16. A molécula de ligação DA x CD3, de qualquer uma de E11 a E15, em que a molécula de ligação DA x CD3 compreende:

[00728] (I) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:179;

[00729] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:175; e

[00730] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[00731] (II) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:184;

[00732] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:181; e

[00733] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[00734] (III) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:196;

[00735] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:186; e

[00736] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[00737] (IV) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:197;

[00738] (B) um segundo polipeptídeo que compreende

SEQ ID NO:192; e

[00739] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[00740] (V) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:193;

[00741] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:194; e

[00742] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

[00743] (VI) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:179;

[00744] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:175;

[00745] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[00746] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

[00747] (VII) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:184;

[00748] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:181;

[00749] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[00750] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

[00751] (VIII) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:196;

[00752] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:186;

[00753] (C) um terceiro polipeptídeo que

compreende SEQ ID NO:187; e

[00754] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

[00755] (IX) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:193;

[00756] (B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:194;

[00757] (C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

[00758] (D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188.

[00759] E17. A composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação DA x CD3, de qualquer um de E1 a E16 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00760] E18. Um método para o tratamento de uma doença que compreende administração a um indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade terapeuticamente eficaz da molécula de ligação DA x CD3, de qualquer uma de E1 a E16 ou da composição farmacêutica, de E17.

[00761] E19. O método, de acordo com E18, em que a dita doença é câncer.

[00762] E20. O método, de acordo com E19, em que o dito câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular e câncer uterino.

[00763] E21. O método, de acordo com E18, em que a

dita doença é uma doença associada a patógenos.

[00764] E22. O método, de acordo com E21, em que o dito antígeno associado ao patógeno é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

[00765] E23. A molécula de ligação DA x CD3, de acordo com qualquer uma dentre E1 a E16 ou a composição farmacêutica, de acordo com E16, para uso no tratamento de uma doença.

[00766] E24. A molécula de ligação DA x CD3 ou composição farmacêutica, de acordo com E23, em que a dita doença é câncer.

[00767] E25. MOLÉCA molécula de ligação DA x CD3 ou composição farmacêutica, de acordo com E24, em que o dito câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular e câncer uterino.

[00768] E26. A molécula de ligação DA x CD3 ou

composição farmacêutica de E23, em que a dita doença é uma doença associada a patógenos.

[00769] E27. A molécula de ligação DA x CD3 ou composição farmacêutica, de acordo com E26, em que o dito antígeno associado ao patógeno é selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

EXEMPLOS

[00770] Tendo agora descrito genericamente a invenção, a mesma será mais facilmente compreendida por referência aos seguintes exemplos, os quais são fornecidos a título de ilustração e não se destinam a ser limitantes da presente invenção, a menos que especificado.

EXEMPLO 1

AVALIAÇÃO DE CD3 MAB 1 M3 – CD3 MAB 1 M26

[00771] Uma biblioteca de mutante de saturação de scFv de CD3 mAb 1 em 29 posições de CDR foi construída e expressa em *E. coli* (XL-1 Blue). Um formato de múltiplos poços foi usado para produzir scFv solúvel. Os sobrenadantes que contêm scFv foram capturados na superfície anti-His e selecionados para ligação a CD3 recombinante (heterodímero Fos/Jun de cadeia ε/γ) com uso de um biossensor Attana para

identificar domínios de ligação vCD3.

[00772] Foram geradas variantes do diacorpo tipo DART-A CD123 x CD3 (designado DART-A-WT; sequências de aminoácidos fornecidas acima) que compreendem os Domínios VH e VL dos scFvs identificados. Assim, um painel de diacorpos tipo DART-A, designados DART-A-M1 - DART-A-M26, que compreende domínios de ligação vCD3 (sendo que tais domínios de ligação vCD3 são respectivamente designados "CD3 mAb 1 M1 - CD3 mAb 1 M26") foram gerados. A cinética de ligação CD3 de DART-A-M1 - DART-A-M26 foi medida por BIACORE® e comparada com DART-A-WT. A Tabela 11 resume a cinética de ligação de CD3 de DART-A-WT e os diacorpos do tipo DART-A que compreende os Domínios de Ligação de vCD3 de CD3 mAb 1 M1 - CD3 mAb 1 M26, classificados por k_a (R denota razão k_a, k_d, ou k_D de diacorpo tipo DART-A variante (que compreende um domínio de ligação vCD3) para DART-A-WT (que compreende o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1)).

Tabela 11
Cinética de Ligação a CD3 de Diacorpos Tipo DART A CD123 x CD3
CD3 mAb 1 M1 -- CD3 mAb 1 M26

CD3 mAb1 variante	substituição (em relação a CD3 Mab-1)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	R	kd (s^{-1})	R	KD (M)	R
M25	G50D/VL	$1,54 \times 10^5$	0,3	$1,92 \times 10^{-2}$	4,7	$1,25 \times 10^{-7}$	15
M18	A33G/VH	$2,87 \times 10^5$	0,6	$5,88 \times 10^{-2}$	14	$2,05 \times 10^{-7}$	25
M14	T31D/VH	$3,08 \times 10^5$	0,6	$1,43 \times 10^{-2}$	3,5	$4,66 \times 10^{-8}$	5,7
M26	K53G/VL	$3,19 \times 10^5$	0,6	$1,74 \times 10^{-2}$	4,3	$5,44 \times 10^{-8}$	6,7
M13	Y102E/VH	$3,21 \times$	0,6	$2,20 \times$	5,4	$6,86 \times$	8,4

Tabela 11
Cinética de Ligação a CD3 de Diacorpos Tipo DART A CD123 x CD3
CD3 mAb 1 M1 -- CD3 mAb 1 M26

		10^5		10^{-2}		10^{-8}	
M16	Y32D/VH	$3,47 \times 10^5$	0,7	$1,04 \times 10^{-1}$	25	$3,01 \times 10^{-7}$	37
M15	T31E/VH	$3,52 \times 10^5$	0,7	$3,75 \times 10^{-2}$	9,2	$1,07 \times 10^{-7}$	13
M1	S100dT/VH	$4,08 \times 10^5$	0,8	$6,50 \times 10^{-2}$	16	$1,59 \times 10^{-7}$	19
M3	G99I/VH	$4,49 \times 10^5$	0,9	$8,30 \times 10^{-3}$	2	$1,85 \times 10^{-8}$	2,3
M23	L95E/VL	$4,59 \times 10^5$	0,9	$1,24 \times 10^{-2}$	3	$2,69 \times 10^{-8}$	3,3
CD3 Mab-1	Tipo Selvagem	$5,00 \times 10^5$	1	$4,09 \times 10^{-3}$	1	$8,17 \times 10^{-9}$	1
M24	L95Q/VL	$5,94 \times 10^5$	1,2	$8,61 \times 10^{-3}$	2,1	$1,45 \times 10^{-8}$	1,8
M6	Y100bQ/VH	$6,99 \times 10^5$	1,4	$2,01 \times 10^{-2}$	4,9	$2,88 \times 10^{-8}$	3,5
M10	F98I/VH	$7,17 \times 10^5$	1,4	$3,10 \times 10^{-2}$	7,6	$4,33 \times 10^{-8}$	5,3
M19	G96K/F98I/VH	$7,53 \times 10^5$	1,5	$4,11 \times 10^{-2}$	10	$5,46 \times 10^{-8}$	6,7
M4	Y100bA/VH	$7,90 \times 10^5$	1,6	$2,03 \times 10^{-2}$	5	$2,57 \times 10^{-8}$	3,1
M17	Y32T/VH	$8,37 \times 10^5$	1,7	$4,78 \times 10^{-2}$	12	$5,72 \times 10^{-8}$	7
M12	W100eY/VH	$8,66 \times 10^5$	1,7	$1,11 \times 10^{-2}$	2,7	$1,28 \times 10^{-8}$	1,6
M7	G96D/VH	$1,02 \times 10^6$	2	$2,29 \times 10^{-2}$	5,6	$2,25 \times 10^{-8}$	2,8
M8	G96E/VH	$1,13 \times 10^6$	2,3	$7,84 \times 10^{-3}$	1,9	$6,91 \times 10^{-9}$	0,8
M5	Y100bG/VH	$1,31 \times 10^6$	2,6	$2,80 \times 10^{-2}$	6,8	$2,14 \times 10^{-8}$	2,6

Tabela 11 Cinética de Ligação a CD3 de Diacorpos Tipo DART A CD123 x CD3 CD3 mAb 1 M1 -- CD3 mAb 1 M26							
M11	W100eF/VH	$1,39 \times 10^{6}$	2,8	$2,67 \times 10^{-2}$	6,5	$1,92 \times 10^{-8}$	2,4
M9	G96K/VH	$2,15 \times 10^{6}$	4,3	$7,16 \times 10^{-3}$	1,8	$3,33 \times 10^{-9}$	0,4
M22	G96K/W100eY/VH	$2,37 \times 10^{6}$	4,7	$1,56 \times 10^{-2}$	3,8	$6,60 \times 10^{-9}$	0,8
M21	G96K/W100eF/VH	$2,45 \times 10^{6}$	4,9	$1,03 \times 10^{-2}$	2,5	$4,18 \times 10^{-9}$	0,5
M2	G96K/S100dT/VH	$3,07 \times 10^{6}$	6,1	$3,91 \times 10^{-2}$	9,6	$1,27 \times 10^{-8}$	1,6
M20	G96K/Y100bG/VH	$3,87 \times 10^{6}$	7,7	$7,32 \times 10^{-2}$	18	$1,89 \times 10^{-8}$	2,3

[00773] A capacidade do DART-A-M1 - DART-A-M26 (que compreende domínios de ligação vCD3) para mediar a morte de células redirecionadas de células T foi medida no ensaio de CTL e comparada com DART-A-WT (que compreende o domínio de ligação rCD3). Resumidamente, os diacorpos do tipo DART-A foram incubados com células efetoras Pan-T e células tumorais alvo MOLM-13, a uma razão efetora: célula alvo de 5:1 por 18 e 42 horas e o EC_{50} foi determinado medindo-se a liberação de lactato desidrogenase (LDH) na mídia pelas células danificadas (*por exemplo*, com uso do kit de ensaio CytoTox 96® Kit de Ensaio de Citotoxicidade Não Radioativo (Promega) que mede quantitativamente a liberação de LDH, ou similar). Um diacorpo do tipo DART-A de 4420 x CD3 que se liga a fluoresceína com o domínio de ligação a CD3 de CD3 mAb 1 foi utilizado como controle negativo. Além disso, a estabilidade dos diacorpos do tipo DART-A foi avaliada medindo-se a Tm com uso de DSF. Curvas

de citotoxicidade representativas para DART-A-WT; DART-A-M1; DART-A-M2; DART-A-M15; DART-A-M17; DART-A-M18; DART-A-M19; e DART-A-M20 são apresentados na Figura 7A. A Tabela 12 resume a citotoxicidade (*isto é*, atividade de morte redirecionada de células T) de DART-A-M1 – DART-A-M26, classificada por EC_{50} de 18 horas (R denota a razão de diacorpo tipo DART-A variante (que compreende um domínio de ligação vCD3) para DART-A-WT (que compreende o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1); ΔTm denota mudança em Tm em comparação com WT (Tm = 63 °C). A relação entre os parâmetros cinéticos e a potência citolítica é representada graficamente nas Figuras 7B-7D (A Figura 7B: afinidade vs citólise (18 horas EC50), a Figura 7C: taxa de associação vs citólise (EC50). A Figura 7C: taxa de dissociação vs citólise (EC50)). São indicadas as variantes CD3 mAb1 (○), M18 (■), M2 (▲) e M1 (▼).

Tabela 12
Citotoxicidade de anticorpos
CD3 mAb 1 M1 – CD3 mAb 1 M26

CD3 mAb 1 variante	substituição (em relação a CD3 Mab-1)	MOLM-13 (E:T=5:1)						
		EC_{50} (ng/ml)	R	% máxima de citotoxina	EC_{50} (ng/ml)	R	max % CytoTox	R ΔTm (°C)
		18 horas			42 horas			
M21	G96K/W100eF/VH	0,026	0,3	36,54	0	0	29,92	-1
M8	G96E/VH	0,069	0,9	38,43	0,005	1,7	29,35	1
M22	G96K/W100eY/VH	0,072	0,9	38,26	0,01	3,5	31,58	-0,5
M9	G96K/VH	0,075	1	38,25	0,001	0,4	30,46	0
CD3 Mab-1	Tipo Selvagem	0,079	1	38,97	0,003	1	29,13	–

Tabela 12 Citotoxicidade de anticorpos CD3 mAb 1 M1 – CD3 mAb 1 M26								
M3	G99I/VH	0,108	1,4	39,69	0,006	2,3	28,58	0
M6	Y100bQ/VH	0,162	2,1	41,86	0,011	3,9	29,46	1
M4	Y100bA/VH	0,176	2,2	41,69	0,011	3,9	29,8	1
M11	W100eF/VH	0,223	2,8	48,55	0,016	5,8	32,43	0,5
M5	Y100bG/VH	0,225	2,9	40,75	0,011	3,8	28,41	1
M20	G96K/Y100bG/VH	0,259	3,3	37,48	0,038	13,5	30,89	−0,5
M7	G96D/VH	0,304	3,8	41,38	0,03	10,8	32,54	1
M24	L95Q/VL	0,34	4,3	49,41	0,031	11,1	31,12	0,5
M12	W100eY/VH	0,372	4,7	49,72	0,067	24	31,54	0,5
M23	L95E/VL	0,421	5,3	49,29	0,061	21,6	31,37	−0,5
M10	F98I/VH	0,426	5,4	39,26	0,095	33,7	29,87	0
M26	K53G/VL	0,444	5,6	44,23	0,078	27,9	28,19	0
M14	T31D/VH	0,492	6,2	44,69	0,11	39,3	31,36	1,5
M25	G50D/VL	0,585	7,4	46,56	0,1	35,7	30,41	0
M19	G96K/F98I/VH	0,68	8,6	41,01	0,11	39,1	32,83	−0,5
M13	Y102E/VH	1,223	15,5	45,08	0,203	72,3	31,48	−0,5
M17	Y32T/VH	1,283	16,2	44,23	0,126	44,9	30,69	−0,5
M15	T31E/VH	4,164	52,7	42,74	0,975	347,2	32,05	1,5
M18	A33G/VH	4,687	59,3	41,3	0,91	324	30,58	0,5
M2	G96K/S100dT/VH	8,113	102,7	32,33	0,693	246,9	32,77	−1
M1	S100dT/VH	19,64	248,6	32,32	2,336	831,9	32,37	0
M16	Y32D/VH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	−0,5

[00774] Conforme indicado nas Tabelas 11–12, as variantes DART–A–M1 – DART–A–M26 exibiram uma gama de cinética de ligação e atividade de CTL, que mantém a sua estabilidade térmica. Tais moléculas de ligação DA x CD3, e seus domínios de ligação vCD3, são úteis para modular a ligação CD3, atividade de morte de células T redirecionada e/ou atividade de estimulação de células T.

EXEMPLO 2

ATIVIDADE DE CTL E LIBERAÇÃO DE CITOCINAS DE VARIANTES REPRESENTATIVAS

[00775] A atividade citotóxica (CTL) e o perfil de liberação de citocinas de um conjunto representativo de diacorpos tipo DART–A que compreende os domínios VL ou VH de CD3 mAb 1 variante foram avaliados por incubação de DART–A–WT; DART–A–M2; DART–A–M7; DART–A–M13; e DART–A–M15 na presença de células efetoras de células Pan–T e células tumorais alvo de leucemia MV–4–11 em uma razão efetor: célula alvo de 5:1 24 horas. A porcentagem de citotoxicidade (*isto é*, morte celular) e/ou EC_{50} foi determinada medindo a liberação de lactato desidrogenase (LDH) na mídia por células danificadas (*por exemplo*, usando o kit de ensaio CytoTox 96® Kit de Ensaio de Citotoxicidade Não Radioativo (Promega) que mede quantitativamente a liberação de LDH ou semelhante) e é representado graficamente na Figura 8A. As citocinas liberadas no sobrenadante durante o CTL foram medidas (*por exemplo*, com uso de ensaio Enzyme–Linked ImmunoSpot (ELISPOT) ou ensaio de citocina milliplex). A liberação de citocina é representada graficamente nas Figuras 8B–8E (A Figura 8B: INF–γ, Figura 8C: TNF–α, Figura 8D: IL–6 e Figura 8E: IL–2). Os valores de EC_{50}para citotoxicidade e liberação de citocinas são fornecidos

na Tabela 13. Um diacorpo do tipo DART-A de 4420 x CD3 que se liga a fluoresceína com o domínio de ligação a CD3 de CD3 mAb 1 foi utilizado como controle negativo(NegCtrl).

Tabela 13					
Tipo DART A	EC_{50}CTL	EC_{50}INF-γ	EC_{50}TNFα	EC_{50}IL-6	EC50-IL2
WT	0,029	0,11	0,76	0,13	0,85
M2	0,92	1,7	4,7	10	27
M7	0,052	0,98	6,6	1,1	7,0
M13	0,12	0,83	0,12	1,3	7,5
M15	0,39	3,5	18	7,5	30

[00776] Os resultados desses estudos mostram que moléculas de ligação DA x CD3 que compreende domínios de ligação vCD3 que exibem tem alteração de afinidade retêm a atividade citolítica e exibem uma ou mais respostas de citocinas reduzidas (resposta máxima e/ou EC50) em comparação com uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende o domínio de ligação rCD3.

EXEMPLO 3

GERAÇÃO DE DIACORPOS DO TIPO DART-B

[00777] Diacorpos que possuem o Domínio VH de CD3 mAb 1 M18 foram selecionados para posterior caracterização e comparação com diacorpos que possuem o Domínio VH de D3 mAb 1, CD3 mAb 1 M1 e CD3 mAb 1 M2. Assim, os diacorpos do tipo DART-B da Tabela 9 foram preparados compreendendo um Domínio de Ligação ao Antígeno de Doença (DA) que se liga ao Antígeno de Câncer CD123, 5T4 ou CD19. As sequências de aminoácidos de cada cadeia são fornecidas em detalhes no presente documento (consulte, Primeiro ao Décimo-Nono Diacorpos Ilustrativos do tipo DART-B, *supra*). Resumidamente, os diacorpos foram

expressos em células CHO (transientes ou transfectadas de forma estável) e purificados sobre uma resina de afinidade de Proteína A (*por exemplo*, MabSelect) seguido por cromatografia de exclusão por tamanho de HPLC.

EXEMPLO 4

CAPACIDADE DOS DIACORPOS DO TIPO DART-B DE SE LIGAREM A ANTÍGENOS DE DOENÇAS

[00778] A capacidade de tais diacorpos se ligarem ao seu respectivo Antígeno de Doença (isto é, CD123 ou 5T4) na superfície de células cancerosas alvo de leucemia MOLM-13 (CD123) ou carcinoma renal A-498 (5T4) foi avaliada com uso de FACS. Resumidamente, as células foram incubadas com as moléculas de diacorpo (em tampão FACS que contém 10% de soro AB humano) em placas de microtitulação. As células foram lavadas e incubadas com anticorpo antibobina EK de camundongo conjugado com biotina que reconhece o domínio de promoção de heterodímero bobina E/bobina K (EK) dos diacorpos, misturado com estreptavidina-ficoeritrina. Os dados representativos de tais ensaios são mostrados nas Figuras 9A-9B. Os dados mostram que os diacorpos representativos eram capazes de se ligar aos seus respectivos Antígenos de Doença.

EXEMPLO 5

CAPACIDADE DOS DIACORPOS DO TIPO DART-B DE SE LIGAREM ÀS CÉLULAS T $CD4^+$ E $CD8^+$

[00779] A capacidade dos diacorpos de ligação a CD123: CD123-WT, CD123-M1, CD123-M2 e CD123-M18 para se ligar a células T $CD4^+$ e $CD8^+$ também foram avaliados com uso de FACS. Um diacorpo do tipo DART-A de 4420 x CD3 que se liga a fluoresceína com o domínio de ligação a CD3 de CD3 mAb 1 foi utilizado como um controle para a ligação de CD3 ("4420-CD3").

Resumidamente, as células T CD4+ e CD8+ foram incubadas com as moléculas de diacorpo (em tampão FACS que contém 10% de soro AB humano) em placas de microtitulação. As células foram lavadas e incubadas com um anticorpo secundário Fc anti-humano marcado. As células foram então lavadas e suspensas novamente com tampão FACS e analisadas por citometria de fluxo. Os dados representativos de tais ensaios são mostrados na Figura 10A (ligação a células T $CD8^+$) e na Figura 10B (ligação a células T $CD4^+$). T-CD123-M1 e T-CD123-M18 exibem ligação reduzida a CD3 que expressam células T $CD4^+$ e $CD8^+$.

[00780] A capacidade dos diacorpos de ligação a CD123: CD123-WT, CD123-M1, CD123-M2 e CD123-M18 para se ligar a CD3 e CD123 humanos também foram avaliados com uso de BIAcore®. Resumidamente, diacorpos em concentrações de 62,5 a 1.000 nM foram passados sobre CD3 humano solúvel que tinha sido imobilizado em uma superfície (normalizado; 1:1 Encaixe de Ligação). As altas concentrações de analito (62,5 a 1.000 nM) foram usadas para permitir a avaliação dos parâmetros para interações fracas de CD3, no entanto, altas concentrações de analito podem ser associadas a uma contribuição de ligação não específica. Em estudos separados, diacorpos em concentrações de 62,5 a 100 nM foram passados sobre CD123 solúvel que tinha sido marcado com His e capturado para uma superfície anti-PentaHis (normalizado; 1:1 Encaixe de Ligação). A Tabela 14 apresenta os k_a, k_d e KD calculados a partir desses estudos.

Tabela 14

CD3 variante	Ligação a humano CD3			Ligação a humano CD123		
	k_a ($x10^4$)	k_d ($x10^{-3}$)	KD (nM)	k_a ($x10^5$)	k_d ($x10^{-4}$)	KD (nM)
CD123-WT	9,1	6,1	67	2,7	5,3	2,0

Tabela 14						
CD123-M1	9,5	80	842	3,2	3,9	1,2
CD123-M2	3,8	41	108	4,2	4,5	1,1
CD123-M18	8,6	51	593	2,4	5,4	2,3

[00781] A capacidade dos diacorpos de ligação a 5T4: 5T4-WT, 5T4-M1, 5T4-M2 e 5T4-M18 para se ligar a CD3 também foi avaliado com uso de BIAcore®, conforme descrito acima. A Tabela 15A apresenta os k_a, k_d e KD calculados.

Tabela 15A			
CD3 variante	Ligação a humano CD3		
	k_a ($x10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($x10^{-3}$) (s^{-1})	KD (nM)
5T4-WT	1,5	5,4	36
5T4-M1	0,95	31	326
5T4-M2	3,5	41	118
5T4-M18	0,75	34	453

[00782] Em estudos adicionais, a capacidade dos diacorpos de ligação CD123: CD123-WT, CD123-M13, CD123-M17 e CD123-M19 para se ligar a CD3 cinomolgo e CD3 humano também foram avaliados com uso de BIAcore®. Resumidamente, diacorpos em concentrações de 6,25 a 400 nM foram passados sobre CD3 humano imobilizado ou CD3 cino (1:1 Encaixe de Ligação Langmuir). A Tabela 15B apresenta os k_a, k_d e KD calculados.

Tabela 15B						
CD3 variante	Ligação a humano CD3			Ligação a cino CD3		
	k_a ($x10^4$)	k_d ($x10^{-3}$)	KD (nM)	k_a ($x10^4$)	k_d ($x10^{-3}$)	KD (nM)
CD123-WT	9,3	4,8	52	11	4,3	39
CD123-M13	5,9	27	458	5	29	580

Tabela 15B						
CD123-M17	19	55	290	17	56	329
CD123-M19	22	48	218	22	50	227

EXEMPLO 6

CAPACIDADE DE DIACORPOS EXEMPLIFICATIVOS DO TIPO DART-B PARA MEDIAR A MORTE CELULAR REDIRECIONADA

[00783] Diacorpos exemplificativos do tipo DART-B foram avaliados quanto à sua capacidade de mediar a morte celular redirecionada. Onde indicado, HIV-WT ou HIV-M18 (descrito acima) são usados aqui como um controle negativo, pois não se ligam a um antígeno de câncer. Será entendido que os diacorpos HIV-WT e HIV-M18 se ligarão a células que expressam o epítopo ligado pelo anticorpo A32 (env de HIV) em sua superfície celular (*por exemplo*, células infectadas por HIV), consulte, por exemplo: WO 2014/1599401 e WO 2016/054101, e são capazes de mediar a morte celular redirecionada de tais células.

[00784] Os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediada por construtos de diacorpo do tipo DART B CD123 x CD3 exemplificativos são apresentados nas Figuras 11A-11Q, nas Figuras 12A-12E e nas Figuras 26A-26E. Os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediada por construtos de diacorpo do tipo DART B 5T4 x CD3 exemplificativos são apresentados nas Figuras 13A-13Q. Os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediada por construtos de diacorpo do tipo DART B CD19 x CD3 exemplificativos são apresentados nas Figuras 14A-14J. Esses ensaios foram realizados essencialmente como descrito acima usando as células efetoras

e alvo indicadas, razões efetor: células alvo e tempos de incubação descritos abaixo (consulte também, as Figuras 11A, 12A, 13A e 14A). Onde indicado, a liberação de citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-2 foi determinada no final do ensaio de CTL com uso de reagentes comerciais padrão.

[00785] As Figuras 11A-11Q mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediada por construções de diacorpo DART B CD123 x CD3 (que possui Domínios Fc) CD123-WT, CD123-M2 e CD123-M18 com uso de células efetoras Pan-T e MOLM-13 células-alvo de leucemia monocítica aguda (LMA) (E: T= 5:1, 24 h). A porcentagem de citotoxicidade é representada na Figura 11A. As respostas de citocinas e a citotoxicidade são representadas nas Figuras 11B-11Q (As Figuras 11B-11E: IFN-gama; Figuras 11F a 11I: TNF-alfa; Figuras 11J a 11M: IL-6; Figuras 11N a 11Q: IL-2). As Figuras 11B, 11F, 11J e 11N: CD123-WT; as Figuras 11C, 11G, 11K e 11O: CD123-M2; as Figuras 11D, 11H, 11L e 11P: CD123-M18; as Figuras 11E, 11I, 11M e 11Q: HIV-WT (Controle Negativo). Citotoxicidade semelhante foi observada contra outra linha de células AML, MV-4-11.

[00786] A Figura 11A mostra que as moléculas de ligação de CD123 x CD3 que compreende diferentes variantes de CD3 mAb 1 exibiram habilidades marcadamente diferentes para mediar a citotoxicidade, particularmente conforme medido pela comparação de EC_{50}, mas que atinge uma citotoxicidade máxima semelhante. Além disso, essas moléculas exibiram habilidades diferentes para mediar as respostas das citocinas. Por exemplo, conforme visto nas Figuras 11B-11Q, embora CD123-M18 exibisse níveis de citotoxicidade máxima que eram semelhantes aos exibidos por CD123-WT, os níveis de citocinas IFN-α, TNF-α e

IL-6 liberados por tratamento com CD123-M18 foram aproximadamente 50% dos níveis liberados pelo tratamento com CD123-WT, e o nível de IL-2 observado com CD123-M18 foi significativamente menor do que o nível de IL-2 observado com CD123-WT. Assim, o CD123-M18 foi considerado capaz de fornecer um valor terapêutico que era comparável ao do CD123-WT, mas com menos efeitos colaterais do que o CD123-WT.

[00787] As Figuras 12A-12E mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediados por construções de diacorpo do tipo B CD123 x CD3 DART B (que possui domínios Fc) com uso de células efetoras de PBMC e células alvo AML MOLM-13. A porcentagem de citotoxicidade está representada na Figura 12A (E:T=15:1, 24 h). As respostas de citocina (medidas em um ensaio de citocina milliplex) são representadas graficamente nas Figuras 12B-12E (A Figura 12B: IFN-gama; a Figura 12C: TNF-alfa; a Figura 12D: IL-6; a Figura 12E: IL-2).

[00788] Os resultados demonstram novamente que CD123-WT e CD123-M18 exibem níveis semelhantes de citotoxicidade máxima, mas CD123-M18 exibiu respostas de citocinas marcadamente reduzidas. Adicionalmente, os valores de EC_{50} de CD123-M18 para liberação de IFN-γ, TNF-α ou IL-6 foram substancialmente mais aqueles de CD123-WT, indicando que o tratamento com CD123-M18 resultou em liberação significativamente menor de citocinas em comparação ao tratamento com CD123 -WT.

[00789] As Figuras 26A-26D e as Figuras 27A-27D mostram os resultados de estudos de morte celular redirecionada mediada por construções de diacorpo DART B CD123 x CD3 (que possui Domínios Fc) CD123-WT, CD123-M1, CD123-M13, CD123-M17,

CD123-M18 e CD123-M19 com uso de células efetoras Pan-T e MOLM-13 células-alvo de leucemia monocítica aguda (LMA) (E: T= 5:1, 48 a 96 h). Conforme observado abaixo, o DART-A-WT foi incluído como um comparador em alguns estudos. As Figuras 26A-26D mostram os resultados de um estudo representativo realizado durante 48 horas. Na Figura 26A a citotoxicidade é representada graficamente, como uma função de % de LDH liberada. As respostas de citocinas e citotoxicidade são representadas graficamente nas Figuras 26B-26E (A Figura 26B: IFN-gama; a Figura 26C: TNF-alfa; a Figura 26D: IL-6; a Figura 26E: IL-2). As Figuras 27A-27D resumem os resultados de 4 a 7 de tais estudos realizados por 48 e 96 horas que incluíram DART-A-WT. As Figuras 27A-27C fornecem gráficos comparativos da atividade de citotoxicidade (CTL) em 48 e 96 horas de quatro desses estudos (A Figura 27A: Valores de EC_{50} da atividade CTL em pM; A Figura 27B: Atividade CTL como um múltiplo do valor EC_{50} de CD123-WT, A Figura 27C: Emax da atividade CTL como uma porcentagem de CD123-WT). A Figura 27D representa o Índice Terapêutico para Atividade CTL contra a citocina IL-2.

[00790] A Figura 26A mostra que, embora as moléculas de ligação de CD123 x CD3 que compreende diferentes variantes de CD3 mAb 1 exibiram curvas de citotoxicidade marcadamente diferentes com CD123-M13, CD123-M17, CD123-M18 e CD123-M19, são capazes de atingir uma citotoxicidade máxima semelhante. Como foi visto acima, cada uma das variantes mediou respostas de citocinas inferiores. Por exemplo, como visto nas Figuras 26B-26D, embora CD123-M13, CD123-M17, CD123-M18 e CD123-M19 exibissem níveis de citotoxicidade máxima que eram semelhantes aos exibidos por CD123-WT, os níveis de citocinas IFN-α, TNF-α, IL-6 e IL-2 liberados foram significativamente

menores do que o nível observado com o tratamento com CD123-WT. Assim, cada uma das moléculas de diacorpo que compreende as variantes de CD3 mAb 1 M13, M17, M18 e M19 foram encontradas para ser capaz de fornecer um valor terapêutico que era comparável ao dos construtos de diacorpo que compreende CD3 mAb 1 de tipo selvagem, mas com menos frequência efeitos colaterais.

[00791] Os resultados mostrados na Figura 27A-27C demonstram ainda que CD123-M13, CD123-M17, CD123-M18 e CD123-M19 exibem valores marcados de EC_{50} de citotoxicidade diferente, mas atingem uma atividade CTL máxima que é comparável a CD123-WT e DART-A- WT. Com uso de IL-2 como uma citocina representativa, um Índice Terapêutico (TI) foi determinado da seguinte forma:

$$TI = E_{max}\ (CTL) : E_{max}\ (citoquina)$$

[00792] Os valores de TI calculados normalizados para os valores para CD123-WT são representados graficamente na Figura 27D e demonstram ainda que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreende as variantes de CD3 mAb 1 M13, M17, M18 e M19 exibem um TI melhorado sobre aqueles que compreendem de tipo selvagem CD3 mAb 1.

[00793] As Figuras 13A-13Q mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediada por construtos de diacorpo 5T4 x CD3 DART B (que possuem Domínios Fc) 5T4-WT, 5T4-M1, 5T4-M2 e 5T4-M18, com uso de Pan Células efetoras T e células alvo de carcinoma de células renais A498 (E:T= 5:1, 24 h). A porcentagem de citotoxicidade é representada na Figura 13A. As respostas de citocinas e a citotoxicidade são representadas nas Figuras 13B-13Q (As Figuras 13B-13E: IFN-gama; Figuras 13F a 13I: TNF-

alfa; Figuras 13J a 13M: IL-6; Figuras 13N a 13Q: IL-2). as Figuras 13B, 13F, 13J e 13N: 5T4-WT; as Figuras 13C, 13G, 13K e 13O: 5T4-M2; as Figuras 13D, 13H, 13L e 13P: 5T4-M18; as Figuras 13E, 13I, 13M e 13Q: HIV-WT (Controle Negativo). A citotoxicidade também foi observada contra células de carcinoma da mama JIMT-1. Estes resultados demonstram que 5T4-WT e 5T4-M18 exibem níveis semelhantes de citotoxicidade máxima, mas respostas de citocinas marcadamente diferentes, com 5T4-M18 exibindo níveis significativamente reduzidos de liberação de citocina em comparação com 5T4-WT.

[00794] As Figuras 14A-14J mostram os resultados de estudos representativos de morte celular redirecionada mediada por construções de diacorpo CD19 x CD3 DART B (possuindo Domínios Fc), CD19-WT e CD19.1-M18, com uso de céluas PBMC Pan-T ou efetoras e células alvo linfoblastóides Raji (E:T= 30:1 para PBMCs e 10:1 para células Pan-T, 24 a 48 h). A porcentagem de citotoxicidade (48 horas) é representada nas Figuras 14A (PBMCs) e na Figura 14F (células Pan-T). As respostas de citocinas em 48 horas com uso de PBMCs são representadas nas Figuras 14B-14E (PBMCs) e nas Figuras 14G-14J (células T Pan) (As Figuras 14B e 14G: IFN-gama; Figuras 14C e 14H: TNF-alfa; Figuras 14D e 14I: IL-6; Figuras 14E e 14J: IL-2; HIV-M18 (controle negativo)). CD19.1-M18 exibiu citotoxicidade semelhante e redução da liberação de citocinas contra células-alvo Daudi. Estes resultados demonstram que CD19-WT e CD19.1-M18 exibem níveis semelhantes de citotoxicidade máxima, mas respostas de citocinas marcadamente diferentes, com CD19.1-M18 exibindo níveis significativamente reduzidos de liberação de citocina em comparação com CD19-WT.

[00795] Os resultados dos estudos acima confirmam

que as construções que compreendem a variante CD3 mAb 1 M18 exibiram maior atividade citotóxica (CTL) em ensaios de CTL do que aqueles que compreendem as variantes M1 e M2. Os estudos de CTL também indicam que os construtos que compreendem a variante M18 exibiram respostas de citocinas mais baixas em comparação com WT e semelhantes ou apenas ligeiramente acima das exibidas pela variante M2 menos ativa. Assim, a variante M18 parece ter uma janela maior para CTL ativo vs liberação de citocina.

EXEMPLO 7

CAPACIDADE DE DIACORPOS DO TIPO DART-B EXEMPLIFICATIVOS PARA MEDIAR A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

[00796] A capacidade de mediar a ativação de células T medida pela avaliação da capacidade dos diacorpos de afetar a expressão de CD25 e CD69, que são marcadores de ativação de células T, em populações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$. As populações de células T foram obtidas a partir de ensaios de CTL, que foram realizados essencialmente como descrito acima. Quando indicado, as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ foram avaliadas quanto à regulação positiva dos marcadores de ativação CD69 e CD25 por citometria de fluxo no final do ensaio de CTL.

[00797] Dados representativos para construções de diacorpo de tipo DART-B CD123 x CD3 são mostrados nas Figuras 15A-15E. A citotoxicidade é representada na Figura 15A. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo-se CD25, está representada na Figura 15B. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo-se CD69, está representada na Figura 15C. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo-se CD25, está representada na Figura 15D.

A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo-se CD69, está representada na Figura 15E.

[00798] Dados representativos para construções de diacorpo de tipo DART-B 5T4 x CD3 são mostrados nas Figuras 16A-16E. A citotoxicidade é representada na Figura 16A. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo-se CD25, está representada na Figura 16B. A ativação de células T $CD4^+$, conforme determinado medindo-se CD69, está representada na Figura 16C. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo-se CD25, é delineada na Figura 16D. A ativação de células T $CD8^+$, conforme determinado medindo-se CD69, está representada na Figura 16E.

[00799] Os resultados desses estudos mostram que os construtos que compreendem a variante CD3-M18 exibiram atividade de ativação de células T aumentada em relação aos construtos que compreendem as variantes M1 e M2.

EXEMPLO 8

ATIVIDADE *IN VIVO* DE DIACORPOS DO TIPO DART-B EXEMPLIFICATIVOS EM MODELOS MURINOS

[00800] A atividade *in vivo* dos diacorpos do tipo DART-B CD123 x CD3 CD123-WT e CD123-M18 foi avaliada em um modelo AML de células KG1A de Comistura (E:T = 1:5). Resumidamente, camundongos NOD/SCID (6 por grupo) foram injetados com células KG1A (AML) Comisturadas com células T CD4+ ou CD8+ humanas ativadas (E:T = 1:5) no Dia 0. O controle do veículo, CD123-WT (50 μg/kg) ou CD123-M18 (5 μg/kg ou 50 μg/kg) foram subsequentemente administrados. O volume do tumor foi monitorado ao longo do estudo.

[00801] Os resultados desse estudo são fornecidos na Figura 17A (células T $CD4^+$) e na Figura 17B (células T $CD8^+$).

Os resultados mostram que as construções que compreendem a variante M18 exibiram atividade antitumoral comparável à das construções que compreendem os Domínios de Ligação WT CD3.

[00802] Um estudo adicional para avaliar a atividade *in vivo* dos diacorpos do0 tipo DART-B CD123 x CD3 foi realizado com uso de um modelo de tumor reconstituído no qual 5 x 10^6 células KG1A (AML) foram injetadas por via subcutânea (SC) em $MHCI^{-/-}$ camundongos (5 fêmeas por grupo) no Dia 0. No Dia 9, 1 x 10^7 células PBMC foram injetadas de modo intraperitoneal (IP). Controle de veículo, CD123-WT, CD123-M2 ou CD123-M18 (cada um em 0,5, 5, 50 ou 500 μg/kg) foram administrados por via intravenosa (IV) duas vezes por semana (2QW) começando no Dia 15. O volume do tumor foi monitorado ao longo do estudo.

[00803] Os resultados desse estudo são fornecidos nas Figuras 18A-18D. Os resultados mostram que CD123-M2 não exibiu atividade nesae modelo (A Figura 18B). Em contraste, CD123-M18 (A Figura 18C) exibiu atividade antitumoral comparável à de CD123-WT (Figura 18A), particularmente em doses de 50 μg/kg e 500 μg/kg (A Figura 18D).

[00804] Outro estudo para avaliar a atividade *in vivo* dos diacorpos do tipo DART-B CD123 x CD3 foi realizado com uso de um modelo de enxerto de PBMC em que 5 x 10^6 MV4-11 (leucemia) células foram injetadas SC e 1 x 10^7 células PBMC foram injetadas retro-orbitalmente (RO) em $MHCI^{-/-}$ camundongos (6 machos por grupo) no Dia 0. Controle de veículo, CD123-WT (em 0,5, 5, 50 ou 500 μg/kg), CD123-M18 ou CD123-M2 (cada um em 5, 50, 500 ou 1000 μg/kg) foram administrados por via intravenosa (IV) duas vezes por semana (2QW) começando no Dia 14. O volume do tumor foi monitorado ao longo do estudo.

[00805] Os resultados desse estudo são fornecidos nas Figuras 19A–19D. Os resultados mostram que CD123–WT exibiu atividade antitumoral a 0,5 μg/kg e acima (A Figura 19A). CD123–M18 exibiu atividade antitumoral a 50 μg/kg e acima (A Figura 19B). Em contraste, CD123–M2 exibiu apenas atividade antitumoral a 1.000 μg/kg (Figura 19C). Como mostrado na Figura 19D, a atividade antitumoral de CD123–M18 é comparável à de CD123–WT a 500 μg/kg, enquanto CD123–M2 exibiu pouca ou nenhuma atividade antitumoral nessa concentração.

[00806] A atividade *in vivo* dos diacorpos do tipo DART–B 5T4 x CD3, 5T4–WT, 5T4–M1 e 5T4–M18, foi avaliada em um modelo de enxerto de PBMC em que 5 x 10^6 células SKOV3 (carcinoma de ovário) foram injetadas SC e 1 x 10^7 células PBMC foram injetadas RO em $MHCI^{-/-}$ camundongos (8 fêmeas por grupo) no Dia 0. Controle de veículo, 5T4–WT (10, 50, 100 ou 500 μg/kg), 5T4–M18 (10, 50, 100 ou 500 μg/kg) ou 5T4–M2 (500 μg/kg) foram administrados por via intravenosa (IV) duas vezes por semana (2QW) a partir do Dia 7. O volume do tumor foi monitorado ao longo do estudo.

[00807] Os resultados desse estudo são fornecidos nas Figuras 20A–20B. Os resultados mostram que 5T4–WT exibiu atividade antitumoral potente em todas as doses testadas (A Figura 20A). 5T4–M18 exibiu atividade antitumoral dependente da dose que era comparável a 5T4–WT a 500 μg/kg, enquanto 5T4–M2 exibiu atividade significativamente menor a 500 μg/kg (A Figura 20B).

[00808] O perfil de liberação de citocinas *in vivo* induzido por diacorpos do tipo DART–B CD123 x CD3 foi examinado em um modelo de Comistura de PBMC. Resumidamente, 5 x 10^6 KG1A (AML) e 1 x 10^7 células PBMC foram misturadas e incubadas

durante a noite, no dia seguinte as células misturadas foram injetadas SC em camundongos NSG (6 machos por grupo) e uma dose única de controle de veículo, CD123-WT, CD123-M18 ou CD123-M2 (cada a 50 ou 500 μg/kg) foi administrado por via intravenosa (IV). Seis horas após a administração, os níveis de citocinas séricas foram avaliados. Os perfis de liberação de citocinas são representados nas Figuras 20A-20D (A Figura 21A: IFN-γ, a Figura 21B: TNF-α; a Figura 21C: IL-6; e a Figura 21D: IL-2). Os resultados desses estudos mostram que o tratamento com moléculas de ligação DA x CD3 que compreende os domínios VL e VH variantes de CD3 mAb 1 M2 e CD3 mAb 1 M18 exibem níveis mais baixos de liberação de citocinas

[00809] Dois estudos adicionais para avaliar a atividade *in vivo* dos diacorpos do tipo DART-B CD123 x CD3 foram realizados com uso de um modelo de tumor reconstituído no qual PBMC reconstituído (8 x 10^6 PBMC injetado retro-orbitalmente no Dia 0) NSG/MHCI$^{-/-}$ camundongos (7 a 8 camundongos por grupo), foram injetados por via subcutânea (SC) com 5 x 10^6 células KG1A (AML) no dia 7. Em um estudo, CD123-WT (0,5 mg/kg), CD123-M18 e CD123-M13 (a 0,005, 0,05, 0,5 e 1 mg/kg) ou veículo foram administrados por via intravenosa (IV) duas vezes por semana (2QW) começando no Dia 28. No outro estudo, CD123-WT (0,05 mg/kg), CD123-M18 e CD123-M17 (a 0,005, 0,05, 0,5 e 1 mg/kg) ou veículo foram administrados por via intravenosa (IV) duas vezes por semana (2QW) começando no Dia 28. O volume do tumor foi monitorado ao longo do estudo.

[00810] Os resultados desses estudos são fornecidos nas Figuras 28A-28B (tratamento com CD123-WT, CD123-M18 e CD123-M13) e nas Figuras 29A-29B (tratamento com

CD123–WT, CD123–M18 e CD123–M17). Os resultados mostram que a atividade antitumoral de CD123–M18 foi semelhante à de CD123–WT em doses de 0,5 mg/kg e acima (as Figuras 28A e 29A) e que CD123–M13 e CD123–M17 exibiram atividade antitumoral semelhante à de CD123 –WT começando com apenas 0,05 mg/kg, uma dose 10 vezes menor que para CD123–M18 (as Figuras 28B e 29B).

[00811] Os perfis de liberação de citocinas *in vivo* induzidos por diacorpos do tipo DART–B CD123 x CD3 CD123–WT, CD123–M13, CD123–M17 e CD123–M18 foram examinados em um modelo de Comistura de PBMC. Resumidamente, 5 x 10^6 KG1A (AML) e 1 x 10^7 células PBMC foram misturadas e incubadas durante a noite, no dia seguinte as células misturadas foram injetadas SC em camundongos NSG (7 a 8 por grupo) e uma dose única de CD123–WT (0,5 mg/kg), CD123–M13, CD123–M17 e CD123–M18 (a 0,05, 0,5 e 1 mg/kg), ou o veículo foi administrado por via intravenosa (IV). Seis horas após a administração, os níveis de citocinas séricas foram avaliados. Em um estudo, os animais foram tratados com CD123–WT, CD123–M18 e CD123–M13 e, em um estudo separado, os animais foram tratados com CD123–WT, CD123–M18 e CD123–M17. Os perfis de liberação de citocinas IL–2 são representados nas Figuras 30A–30B (A Figura 30A: CD123–WT, CD123–M18 e CD123–M13); A Figura 30B: CD123–WT, CD123–M18 e CD123–M17) e mostram que o tratamento com moléculas de ligação DA x CD3 que compreende a variante CD3 mAb 1 domínios VL e VH resulta em níveis reduzidos de liberação de citocina em comparação com a molécula de ligação DA x CD3 que compreende o domínios VL e VH do tipo selvagem.

[00812] Os resultados desses estudos em animais mostram que a administração das moléculas de ligação DA x CD3 que compreende os domínios VL e VH variantes de CD3 mAb 1,

particularmente os domínios VL e VH de CD3 mAb 1 M2, CD3 mAb 1 M13, CD3 mAb M17 e CD3 mAb 1 M18 (*isto é*, domínios de ligação vCD3) resulta em níveis reduzidos de liberação de citocinas em comparação com moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem os domínios VL e VH de CD3 mAb 1 (*isto é*, domínio de ligação rCD3). Em particular, os resultados desses estudos demonstram que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreende os domínios VL e VH variantes de CD3 mAb 1 M13, CD3 mAb M17 e CD3 mAb 1 M18 exibem níveis mais baixos de liberação de citocinas, embora retendo a atividade antitumoral *in vivo*.

EXEMPLO 9

GERAÇÃO DE MOLÉCULAS DO TIPO TRIVALENTE

[00813] Os domínios VH e VL de CD3 mAb 1, CD3 mAb 1 M1, mAb 1 M2 CD3 ou mAb 1 M18 CD3 foram usados para gerar moléculas do tipo TRIVALENTE que compreende um domínio de ligação do antígeno da doença (DA) que liga o antígeno de câncer CD123 e um Domínio de ligação ao antígeno de célula efetora CD8 (“molécula do tipo TRIVALENTE DA x CD3 x CD8”). A Tabela 10 resume os Domínios de Ligação CD3 e SEQ ID NOs. para cada cadeia de polipeptídeo. As sequências de aminoácidos de cada cadeia são fornecidas em detalhes no presente documento (consulte, Primeira à Quarta Moléculas do tipo TRIVALENTE ilustrativas, *supra*).

EXEMPLO 10

CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS DO TIPO TRIVALENTE DA X CD3 X CD8

[00814] A capacidade de T-CD123-WT, T-CD123-M1, T-CD123-M2 e T-CD123-M18 para ligar CD123 expresso em células MOLM-13 foi avaliada essencialmente como descrito acima. Além disso, a capacidade dessas moléculas de se ligar a células T

$CD4^+$ e células T $CD8^+$ foi avaliada essencialmente como descrito acima. O diacorpo do tipo DART-B CD123-WT está incluído nesses estudos para comparação. Os dados representativos desses estudos são fornecidos na Figura 22A (ligação a células MOLM-13), a Figura 22B (ligação a células T $CD4^+$) e a Figura 22C (ligação a células T $CD8^+$). Todas as moléculas testadas exibem ligação comparável a células MOLM-13 que expressam CD123 e células T $CD8^+$ que expressam CD8. T-CD123-M1 e T-CD123-M18 exibem ligação significativamente reduzida a células T $CD4^+$ que expressam CD3, conforme medido por MFI (média geográfica). A ligação às células T $CD8^+$ é mediada por ambos os Domínios de Ligação CD3 e CD8 presentes nas moléculas do tipo TRIVALENTE.

[00815] A capacidade de T-CD123-WT, T-CD123-M1, T-CD123-M2 e T-CD123-M18 para mediar a morte celular redirecionada foi avaliada. Resumidamente, as moléculas do tipo TRIVALENTE foram incubadas na presença de células T Pan-T ou células efetoras de células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ purificadas e células tumorais alvo MOLM-13 em uma razão efetora: célula alvo de 1:1 por 48 horas. A citotoxicidade foi determinada medindo a liberação de lactato desidrogenase (LDH) na mídia por células danificadas (*por exemplo*, com uso do kit de ensaio CytoTox 96® Kit de Ensaio de Citotoxicidade Não Radioativo (Promega) que mede quantitativamente a liberação de LDH ou semelhante). A resposta da citocina foi examinada nas amostras de células T Pan. O diacorpo do tipo DART-B CD123-WT está incluído nesses estudos para comparação. A porcentagem de citotoxicidade é representada graficamente na Figura 23A-23C (a Figura 23A: Células Pan-T; A Figura 23B: Células T $CD4^+$; e A Figura 23C: $CD8^+$ T-cells). As respostas de citocinas são representadas nas Figuras 23D-23G (A Figura 23D: IFN-gama; a

Figura 23E: TNF-alfa; a Figura 23F: IL-6; a Figura 23G: IL-2).

EXEMPLO 11

ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

[00816] Os perfis de segurança e liberação de citocinas de moléculas de ligação de CD123 x CD3 representativas foram avaliados em um estudo de dosagem em macacos cinomolgo. Nesse estudo, os perfis de toxicidade potencial e de liberação de citocinas de CD123-M18 (que compreende o domínio de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 M18) e CD123-WT (que compreende o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1), quando administrado por infusões intravenosas repetidas foi avaliada. A atividade de morte celular não é facilmente acessada nesse modelo. O desenho do estudo é apresentado na Tabela 16.

Tabela 16

Grupo Número	Material de teste	Nível de dose (mg/kg)	Dias de dosagem	Número de Animais (macho)
1	Controle	0	0	2
2	CD123-WT	0,003	0, 7	3
3	CD123-M18	10	0, 7	3
4	CD123-M18	20	0, 7	2

[00817] Sem mortalidade, perda de peso corporal ou outras observações adversas foram observadas nos grupos de tratamento com CD123-M18 (10 e 20 mg/kg). Além disso, não foram observadas alterações hematológicas ou químicas clínicas significativas nesses grupos. Em contraste, a molécula CD123-WT (0,003 mg/kg) não foi bem tolerada. Síndrome de liberação de citocinas e mortalidade (1/3) foram observadas nesse grupo. Os níveis de citocinas séricas (Dias 0 a 9) são representados

nas Figuras 24A-24E (Figura 24A: IFN-γ, Figura 24B: TNF-α, Figura 24C: IL-6, Figura 24D: IL-2, e Figura 24E: IL-15). Além disso, a proliferação de células T foi examinada por FACS com uso da expressão de Ki67 como um marcador de células em proliferação. A Figura 24F representa a expansão das células T $CD4^+$ e a Figura 24G representa a expansão das células T $CD4^+$ como uma porcentagem das células $CD4^+$ ou $CD8^+$ positivas para Ki67 (Dias 0 a 14). As Figuras 24H-24I apresentam gráficos de vários marcadores de hematologia e química clínica significativos para os animais nos grupos de tratamento (a Figura 24H: Contagem de plaquetas; A Figura 24I: Proteína C-reativa; A Figura 24J: Nitrogênio de ureia). Os resultados desse estudo mostram que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem o mAb 1 M18 de domínio de ligação vCD3-CD3 são bem toleradas em macacos cinomolgo e exibem aumentos transitórios mínimos na liberação de TNF-α, IFN-γ, IL-2 e IL -6 mesmo em doses que excedem os níveis terapêuticos projetados e exibem mudanças menores em vários marcadores de química clínica. Além disso, observou-se que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem o Domínio de ligação vCD3 CD3 mAb 1 M18 estimulavam preferencialmente a proliferação de células T $CD8^+$.

[00818] Um outro estudo de toxicologia foi realizado com CD123-M13 (que compreende o domínio de ligação vCD3 do CD3 mAb 1 M13) dosado a 1 mg/kg e 10 mg/kg, CD123-M17 (que compreende o domínio de ligação vCD3 do CD3 mAb 1 M17) dosado a 1 mg/kg e 10 mg/kg, e CD123-M19 (que compreende o domínio de ligação vCD3 do CD3 mAb 1 M19) dosado a 10 mg/kg. Nesses estudos, observou-se que CD123-M13 exibiu maior liberação de citocinas do que CD123-M17 ou CD123-M19, particularmente no grupo de 10 mg/kg. Foi observada alguma

mortalidade nesse estudo, particularmente no grupo de dose elevada de CD123-M13 e foram observadas alterações hematológicas e químicas clínicas transitórias. A Tabela 17 fornece um resumo da mortalidade observada nesse estudo e estudos de toxicologia anteriores com CD123-WT e CD123-M19.

Tabela 17

CD3 variante	Dose	# Dosado	# Morreu	
CD123-WT	10 µg/kg	1	1	Eutanásia no dia 3
	3 → 3 µg/kg (Dia 1 → 8)	3	1	Eutanásia no dia 8
	3 → 10 µg/kg (Dia 1 → 8)	2	1	Eutanásia no dia 8
	3 → 30 µg/kg (Dia 1 → 8)	2	2	Eutanásia no dia 8 ou 9
CD123-M13	1 mg/kg	2	1	Eutanásia no dia 3
	10 mg/kg	2	2	Morte ou Eutanásia no dia 3
CD123-M17	1 mg/kg	2	0	Sem mortalidade
	10 mg/kg	5	1	Eutanásia no dia 4
CD123-M18	Sem mortalidade a 10 (n=3) ou 20 mg/kg (n=2)			
CD123-M19	Sem mortalidade a 10 mg/kg (n=2) (doses mais altas não testadas)			

[00819] Conforme mostrado na Tabela 17, a mortalidade é observada em animais tratados com tão pouco quanto 3 µg/kg (0,003 mg/kg) CD123-M13 (que compreende o domínio de ligação rCD3 do CD3 mAb 1) enquanto moléculas de

ligação CD123 x CD3 que compreendem o Domínio de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 M13, M17, M18 e M19 são toleráveis em doses muito mais altas e exibem perfis de liberação de citocinas reduzidos em comparação com CD123–M13 que compreende o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1. A classificação de doses toleradas desses estudos é CD123–M18 ≥ CD123–M19 > CD123–M17 > CD123–M13 > CD123–WT. Essas constatações acompanham a avaliação do Índice Terapêutico fornecida acima.

EXEMPLO 12

CAPACIDADE DE MOLÉCULAS EXEMPLIFICATIVOS DE CD123 X CD3 PARA MEDIAR O ESGOTAMENTO DA EXPLOSÃO DE AML

[00820] Diacorpos CD123 x CD3 exemplificativos foram avaliados quanto à sua capacidade de mediar a depleção de células blásticas de AML de amostras de sangue periférico de um paciente de AML. Resumidamente, células do sangue periférico de um paciente com AML foram incubadas em meio suplementado na presença de concentrações crescentes de DART–A–WT, CD123–WT, CD123–M1 e CD123–M18. A celularidade (blastos $CD34^+$, células T $CD3^+$ e $CD8^+$) foi analisada por citometria de fluxo no tempo 0 e no dia 6 e é representada graficamente como uma porcentagem do controle não tratado ou como fator de aumento da linha de base. Os níveis de citocinas foram analisados por matriz citocina–conta (BD) em sobrenadantes colhidos no dia 4 de incubação. Os resultados desse estudo são apresentados nas Figuras 25A–25G. Conforme mostrado na Figura 25A, CD123–M18 foi capaz de mediar a depleção de células blásticas AML na mesma extensão que DART–A–WT e CD123–WT. No entanto, CD123–M18 exibiu expansão significativamente reduzida da população de células T (A Figura 25B: $CD4^+$ células T; Figura 25C: $CD8^+$ T–cells). Além disso, CD123–M18 exibiu níveis

significativamente mais baixos de liberação de citocinas (A Figura 25D: IFN-γ; a Figura 25E: TNF-α; a Figura 25F: IL-6; e a Figura 25G: IL-2).

[00821] Esses resultados demonstram ainda que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem os domínios de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 M18 retiveram o potencial máximo de morte com potência ligeiramente reduzida, mas redução comensuravelmente maior na liberação de citocina induzida pelo alvo in vitro e in vivo. A incorporação de tais domínios de ligação vCD3 em moléculas de ligação DA x CD3 pode expandir o índice terapêutico em aplicações de eliminação de células T redirecionadas.

EXEMPLO 13

CAPACIDADE DE MOLÉCULAS CD19 X CD3 EXEMPLIFICATIVAS PARA MEDIAR A DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B AUTÓLOGAS

[00822] Em um conjunto de estudos, os diacorpos CD19 x CD3 exemplificativos CD19-WT (um controle positivo que compreende o domínio de ligação rCD3 do CD3 mAb 1) e CD19.1-M18 (que compreende o domínio de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 M18), foram avaliados quanto à sua capacidade de mediar a depleção de células B autólogas *in vitro* e *in vivo*. Para os estudos *in vitro*, foram utilizados PMBCs de humanos e macacos cinomolgos. Resumidamente, PMBCs isolados de humano ou macaco cinomolgo foram incubados em meio suplementado na presença de concentrações crescentes de CD19-WT (um controle positivo) ou CD19.1-M18 ou o controle negativo HIV-M18. Os níveis de células B foram analisados por citometria de fluxo (com uso de CD20 como um marcador de células B) 48 horas após a incubação. Os níveis de citocinas nos sobrenadantes das amostras humanas foram analisados por matriz citocina-conta (BD). Os resultados

desse estudo são apresentados nas Figuras 31A–31F. Como mostrado nas Figuras 31A–31B, CD19.1–M18 foi capaz de esgotar células B autólogas de PMBCs humanos e de macaco cinomolgo na mesma extensão que CD19–WT. Além disso, CD19.1–M18 exibiu níveis significativamente mais baixos de liberação de citocinas (a Figura 31C: IFN–γ; a Figura 31D: TNF–α; a Figura 31E: IL–6; e a Figura 31F: IL–2).

[00823] A capacidade do controle positivo, CD19–WT e CD19.1–M18 (que compreende o domínio de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 M18), para mediar a depleção de células B autólogas *in vivo* foi avaliada em um estudo de dosagem em macacos cinomolgo. O desenho do estudo é apresentado na Tabela 18.

Tabela 18

Grupo Número	Material de teste	Nível de dose (mg/kg)	Número de Animais (macho)
1	CD19–WT	0,1	2
2	CD19.1–M18	1	2
3	CD19.1–M18	10	2
4	CD19.1–M18	30	2

[00824] Os diacorpos CD19 x CD3 foram administrados por uma única infusão intravenosa de 2 horas no Dia 0. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes da dose e periodicamente após a dose. Os níveis de células B em amostras de sangue periférico foram analisados por citometria de fluxo (com uso de CD20 como um marcador de células B). Os dados representativos de 1 de 2 macacos tratados nos grupos 1 a 3 são mostrados nas Figuras 32A–32D (a Figura 32A: pré–dose Dia 0; a Figura 32B: Dia 1; A Figura 32C: Dia 8; A Figura 32D: Dia 15; As populações de células B são indicadas com um oval).

Além disso, os nódulos linfáticos inguinais coletados pré-dose, no Dia 7 e no Dia 15 foram corados para células B (com uso de CD20 como um marcador de células B). Imagens representativas de imunohistoquímica de amostras de pré-dose e Dia 7 de 1 de 2 macacos tratados nos grupos 1, 3 e 4 são mostradas na Figura 33A-33C (A Figura 33A: grupo 1; a Figura 33B: grupo 3; a Figura 33C: grupo 4; pré-dose à esquerda e Dia 7 à direita; as células B coradas aparecem escuras). Os resultados desse estudo *in vivo* mostram que as células B foram eficientemente esgotadas no sangue periférico em um dia e que a depleção persistiu por até 15 dias após a administração (consulte as Figuras 32A-32D) de uma dose única de diacorpo CD19 x CD3 exemplar CD19.1-M18. Da mesma forma, as células B foram eficientemente esgotadas nos nódulos linfáticos dentro de 7 dias (o primeiro ponto de tempo examinado após a administração) demonstrando que CD19.1-M18 em doses de apenas 1 mg/kg é capaz de mediar a depleção autóloga de células B por as células T redirecionaram a morte *in vivo* em um grau semelhante ao do controle positivo CD19-WT.

[00825] A capacidade de moléculas de ligação de CD19 x CD3 adicionais para mediar a depleção de células B autólogas foi avaliada em macacos cinomolgo. Nesse estudo, a atividade de CD19-WT (um controle positivo que compreende o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1); CD19.1-M13 (que compreende o domínio de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 M13); e CD19.1-M17 (que compreende o domínio de ligação de vCD3 de CD3 mAb 1 M17) foram avaliados quanto à sua capacidade de mediar a depleção de células B autólogas quando administrados por infusões intravenosas repetidas. O desenho do estudo é apresentado na Tabela 19.

Tabela 19				
Grupo Número	Material de teste	Nível de dose (mg/kg)	Dias de dosagem	Número de Animais
1	CD19-WT	0,1	1, 8	2 M
2	CD19.1-M13	1	1, 8	3 M
3	CD19.1-M17	1	1, 8	3 M

[00826] Sem mortalidade, perda de peso corporal ou outras observações adversas significativas foram observadas, membros frios foram observados após a dosagem em um animal do grupo 3 no Dia 1 e em um animal do grupo 2 no Dia 8, ambos resolvidos no próximo dia. Os níveis de células B em amostras de sangue (tomadas antes da dose e periodicamente após a dose) periférico foram analisados por citometria de fluxo (com uso de CD20 como um marcador de células B). Além disso, amostras de tecido (baço, medula óssea e linfonodos (LN)) foram avaliadas por imunohistoquímica para coloração de CD20. Os dados de citometria de fluxo dos grupos 1 a 3 são mostrados na Figura 34 e os dados de coloração de tecido de cada animal (e um animal de controle negativo não tratado) estão resumidos na Tabela 20. Os níveis séricos de citocinas foram avaliados ao longo do estudo (pré-dosagem e periodicamente pós-dosagem). Os níveis séricos de TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6 e IL-15 para cada grupo de tratamento estão representados nas Figuras 35A-35E, respectivamente. Além disso, as populações de células T no sangue periférico foram examinadas por FACS com uso da expressão de Ki67 como um marcador de células em proliferação. A Figura 36A representa a expansão das células T $CD4^+$ e a Figura 36B representa a expansão das células T $CD4^+$ como uma porcentagem das células $CD4^+$ ou $CD8^+$ positivas para Ki67

(tomadas antes da dose e periodicamente após a dose).

TABELA 20: Coloração de tecido CD20			
	Controle negativo≠	CD19-WT	
Número de animal	5.001	1.001	1.002
Baço	X	2+	1+
Medula óssea	2+	0	0
LN, axilar	3+	1+	1+
LN, mandibular	3+	1+	1+
LN, mesentérico	3+	1+	1+
LN, inguinal	3+	1+	1+
	CD19.1-M13		
Número de animal	2.001	2.002	2.003
Baço	1+	2+	1+
Medula óssea	0	0	0
LN, axilar	1+	2+	1+
LN, mandibular	1+	1+	1+
LN, mesentérico	0	1+	1+
LN, inguinal	1+	1+	1+
	CD19.1-M17		
Número de animal	3.001	3.002	3.003
Baço	1+	1+	1+
Medula óssea	0	1+	1+
LN, axilar	1+	2+	2+
LN, mandibular	1+	2+	2+
LN, mesentérico	1+	1+	2+
LN, inguinal	1+	2+	2+

≠ um animal no grupo de controle negativo

X - Não examinado 0 - Nenhuma coloração observada

1+ - coloração fraca observada 2+ - coloração moderada

observada
3+ – coloração forte observada

[00827] Os resultados deste estudo mostram que as moléculas de ligação de CD19 x CD3 que compreende o domínio de ligação de vCD3 CD3 mAb 1 M13 ou CD3 mAb 1 M17 foram ativas com animais tratados com 1 mg/kg de CD19.1–M13 exibindo depleção de células B autólogas para um grau semelhante ao do controle positivo CD19–WT. Os animais tratados com 1 mg/kg de CD19.1–M17 também exibiram depleção de células B autólogas, mas em um grau ligeiramente menor do que o controle positivo. É esperado que o CD19.1–M17 atinja um esgotamento comparável à dosagem mais alta. As variantes mediaram aumentos muito menores na liberação de INF–γ, TNF–α, IL–2 e IL–6 e ligeiras reduções na liberação de IL–15. Além disso, observou–se que as moléculas de ligação que compreendem o CD3 mAb 1 M13 e CD3 mAb 1 M17 estimulavam a proliferação de células T, com moléculas que compreendiam o CD3 mAb 1 M13 exibindo níveis mais elevados de proliferação. Além disso, ambas as moléculas exibiram estimulação preferencial de proliferação de células T $CD8^+$.

[00828] Juntos, os estudos fornecidos nos exemplos acima mostram que as moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem o domínio de ligação vCD3 de CD3 mAb 1 (*por exemplo*, M13, M17, M18, M19), exibem uma gama de afinidades de ligação, uma gama de valores de citotoxicidade EC_{50}, mas todos atingem uma atividade CTL máxima que é comparável às moléculas que compreendem o domínio de ligação rCD3 de CD3 mAb 1, exibindo assim um índice terapêutico aumentado. Esses estudos mostram ainda que tais moléculas são toleradas e ativas na mediação da morte de células redirecionadas de células T e na

estimulação da ativação e proliferação de células T *in vivo*.

[00829] Todas as publicações e patentes mencionadas neste relatório descritivo são no presente documento incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação individual ou pedido de patente fossem especificamente e individualmente indicados para serem incorporados por referência em sua totalidade. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas da mesma, será entendido que é capaz de modificações adicionais e este pedido se destina a cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais desvios da presente divulgação como vêm dentro da prática conhecida ou habitual dentro da técnica à qual a invenção pertence e como podem ser aplicados às características essenciais no presente documento estabelecidas anteriormente.

REIVINDICAÇÕES

1. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA X CD3, caracterizada por compreender um domínio de ligação CD3 com capacidade de se ligar a um epítopo de CD3 e um domínio de ligação ao antígeno de doença com capacidade de se ligar a um epítopo de um antígeno de doença, em que o dito domínio de ligação CD3 compreende:

(I) (A) um domínio CDR_H1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95 e SEQ ID NO:97;

(B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

(D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

(E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

(F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; ou

(II) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

(B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(C) um domínio CDR_H3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105 e SEQ ID NO:107;

(D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

(E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

(F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; ou

(III) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

(B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

(D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

(E) um domínio CDR_L2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e

(F) um domínio CDR_L3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:109 ou SEQ ID NO:111; ou

(IV) (A) um domínio CDR_H1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57;

(B) um domínio CDR_H2 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(C) um domínio CDR_H3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59;

(D) um domínio CDR_L1 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

(E) um domínio CDR_L2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:113 e SEQ ID NO:115; e

(F) um domínio CDR_L3 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62.

2. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo dito domínio de ligação CD3 compreender:

(I) (A) um domínio VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

(B) um domínio VH que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104 e SEQ ID NO:106; ou

(II) (A) um domínio VL que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112; e SEQ ID NO:114;

(B) um domínio VH que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55.

3. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pela dita molécula de ligação DA x CD3 ser um anticorpo biespecífico, um diacorpo biespecífico, um scFv biespecífico, um TandAb biespecífico ou uma molécula de ligação trivalente.

4. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pela dita molécula de ligação DA x CD3 ter capacidade de se ligar a mais que um antígeno de doença e/ou uma molécula de superfície de célula diferente de uma célula efetora.

5. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo dito antígeno de doença ser um antígeno de câncer.

6. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo dito antígeno de doença ser um antígeno associado a patógenos.

7. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizada pela dita molécula de superfície de célula diferente de uma célula efetora ser CD2, CD8, CD16, TCR, NKp46 ou NKG2D.

8. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com a reivindicação 5 ou 7, caracterizada pelo dito antígeno de câncer ser selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos de câncer: 19,9, 4,2, ADAM-9, AH6, ALCAM, B1, B7-H3, BAGE, beta-catenina, grupo sanguíneo ALe^b/Le^y, antígeno de linfoma de Burkitt-38,13, C14, CA125, Carboxipeptidase M, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD36, CD40/CD154, CD45, CD56, CD46, CD52, CD56, CD79a/CD79b, CD103, CD123, CD317, CDK4, CEA, CEACAM5/CEACAM6, CO17-1A, CO-43, CO-514, CTA-1, CTLA-4, Citoqueratina 8, D1.1, $D_1$56-22, DR5, série E_1, EGFR, um receptor de Efrina, EphA2, Erb, GAGE, um gangliosídeo GD2/GD3/GM2, GICA 19-9, gp100, Gp37, gp75, gpA33, HER2/neu, HMFG, Papilomavírus Humano-E6/Papilomavírus Humano-E7, HMW-MAA, antígeno I, IL13Rα2, Integrina β6, JAM-3, KID3, KID31, KS 1/4 antígeno de pan-carcinoma, L6,L20, LEA, LUCA-2, M1:22:25:8, M18, M39, MAGE, MART, mesotelina, MUC-1, MUM-1, Myl, N-acetilglucosaminiltransferase, neoglicoproteína, NS-10, OFA-1, OFA-2, Oncostatina M, p15, p97, PEM, PEMA, PIPA, PSA, PSMA, fosfato de ácido prostático, R_{24}, ROR1, um esfingolipídio, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, sTn, o peptídeo derivado do receptor de células T, T_5A_7, TAG-72, TL5, receptor

TNF, receptor TNF-γ, TRA-1-85, um Receptor de Transferrina, 5T4, TSTA, VEGF, um Receptor VEGF, VEP8, VEP9, VIM-D5 e hapteno Y, Le^y.

9. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo dito antígeno de doença ser B7-H3, CEACAM5/CEACAM6, EGRF, EphA2, gpA33, HER2/neu, VEGF, 5T4, IL13Rα2, CD123, CD19 ou ROR1.

10. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 ou 7, caracterizada pelo dito antígeno associado ao patógeno ser selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

11. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pela dita molécula de ligação DA x CD3 compreender: uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo, covalentemente ligados entre si, em que:

(A) a primeira cadeia de polipeptídeo compreende, na direção do terminal N ao terminal C:

(i) um domínio 1, que compreende:

(1) um subdomínio (1A), que compreende um domínio VL de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito

epítopo de um antígeno de doença (VL_{DA}); e

(2) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VH de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de CD3 (VH_{CD3});

em que os ditos subdomínios 1A e 1B são separados um do outro por um peptídeo ligante; e

(ii) um domínio 2, em que o dito domínio 2 é um domínio de promoção de heterodímero;

(B) a segunda cadeia de polipeptídeo compreende, na direção do terminal N ao terminal C:

(i) um domínio 1, que compreende:

(1) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VL de um anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de CD3 (VL_{CD3}); e

(2) um subdomínio (1B), que compreende um domínio VH do dito anticorpo monoclonal com capacidade de se ligar ao dito epítopo de um antígeno de doença (VH_{DA});

em que os ditos subdomínios 1A e 1B são separados um do outro por um peptídeo ligante;

(ii) um domínio 2, em que o dito domínio 2 é um domínio de promoção de heterodímero, em que o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira e da dita segunda cadeias de polipeptídeo são diferentes;

e em que:

(a) o domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno de doença e o domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação CD3; ou

(b) o domínio VL da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VH da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação CD3 e o domínio VH da primeira cadeia de polipeptídeo e o domínio VL da segunda cadeia de polipeptídeo se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno de doença.

12. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por:

(A) o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina E e o dito domínio de promoção de heterodímero da dita segunda cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina K; ou

(b) o dito domínio de promoção de heterodímero da dita primeira cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina K e o dito domínio de promoção de heterodímero da dita segunda cadeia de polipeptídeo ser um domínio de bobina E.

13. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12, caracterizada pela primeira ou segunda cadeia de polipeptídeo adicionalmente compreenderem um domínio 3 que compreende um domínio CH2 e CH3 de um domínio Fc de imunoglobulina.

14. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pela molécula de ligação DA x CD3 compreender ainda uma terceira cadeia de polipeptídeo que compreende um domínio CH2 e CH3 de um domínio Fc de imunoglobulina.

15. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizada pela molécula de ligação DA x CD3 compreender ainda um domínio de ligação CD8.

16. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizada pela molécula de ligação DA x CD3 compreender:

(I) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:179;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:175; e

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

(II) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:184;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:181; e

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

(III) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:196;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:186; e

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

(IV) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:197;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:192; e

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

(V) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:193;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID

NO:194; e

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:176; ou

(VI) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:179;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:175;

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

(D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

(VII) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:184;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:181;

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

(D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

(VIII) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:196;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:186;

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

(D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188; ou

(IX) (A) um primeiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:193;

(B) um segundo polipeptídeo que compreende SEQ ID

NO:194;

(C) um terceiro polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:187; e

(D) um quarto polipeptídeo que compreende SEQ ID NO:188.

17. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender a molécula de ligação DA x CD3, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 16 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

18. MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA, caracterizado por compreender administração a um indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade terapeuticamente eficaz da molécula de ligação DA x CD3, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 16 ou da composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 17.

19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela dita doença ser câncer.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo dito câncer ser selecionado a partir do grupo que consiste em câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular e câncer uterino.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela dita doença ser uma doença associada a patógenos.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21,

caracterizado pelo dito antígeno associado ao patógeno ser selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

23. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16 ou a COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, conforme definido na reivindicação 17 caracterizada por ser usada no tratamento de uma doença.

24. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3 OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pela dita doença ser câncer.

25. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3 OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo dito câncer ser selecionado a partir do grupo que consiste em câncer adrenal, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer renal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer hematológico, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pele, carcinoma de células renais, câncer testicular e câncer uterino.

26. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3 OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pela dita doença ser uma doença associada a patógenos.

27. MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DA x CD3 OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo dito antígeno associado ao patógeno ser selecionado a partir do grupo que consiste nos antígenos associados ao patógeno: Proteína celular infectada pelo vírus Herpes Simplex (ICP)47, vírus Herpes Simplex gD, vírus de Epstein Barr LMP-1, vírus de Epstein Barr LMP-2A, vírus de Epstein Barr LMP-2B, vírus de imunodeficiência humana gp160, vírus de imunodeficiência humana gp120, vírus de imunodeficiência humana gp41, Papilomavírus Humano E6, Papilomavírus Humano E7, vírus de leucemia de células T humanas gp64, vírus de leucemia de células T humanas gp46 e vírus de leucemia de células T humanas gp21.

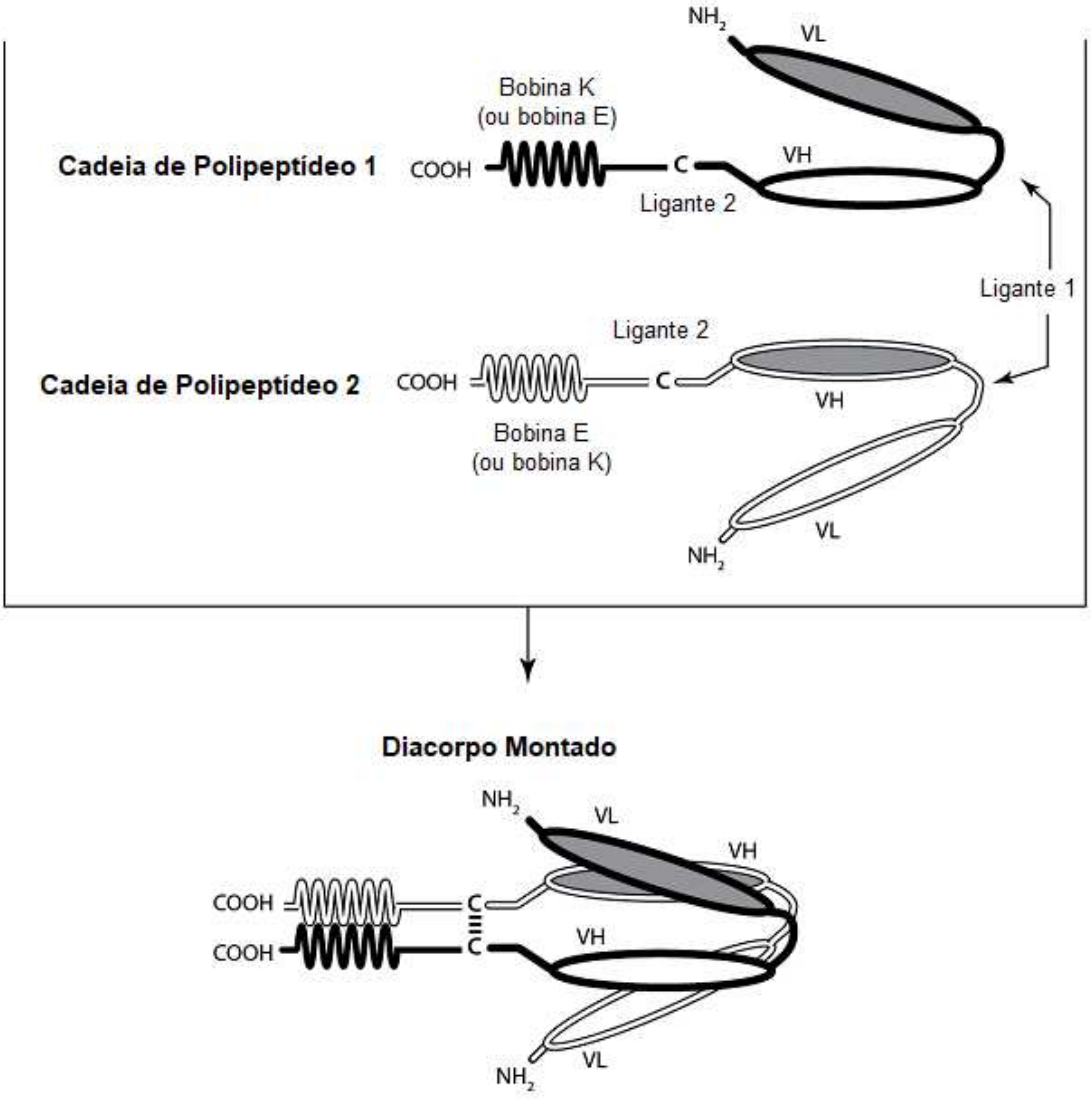

NH2
VL
Bobina K
(ou bobina E)
Cadeia de Polipeptídeo 1
COOH
C
VH
Ligante 2
Ligante 1
Ligante 2
Cadeia de Polipeptídeo 2
COOH
C
VH
Bobina E
(ou bobina K)
VL
NH2
Diacorpo Montado
NH2
VL
VH
COOH
C
COOH
C
VH
VL
NH2

Figura 1A

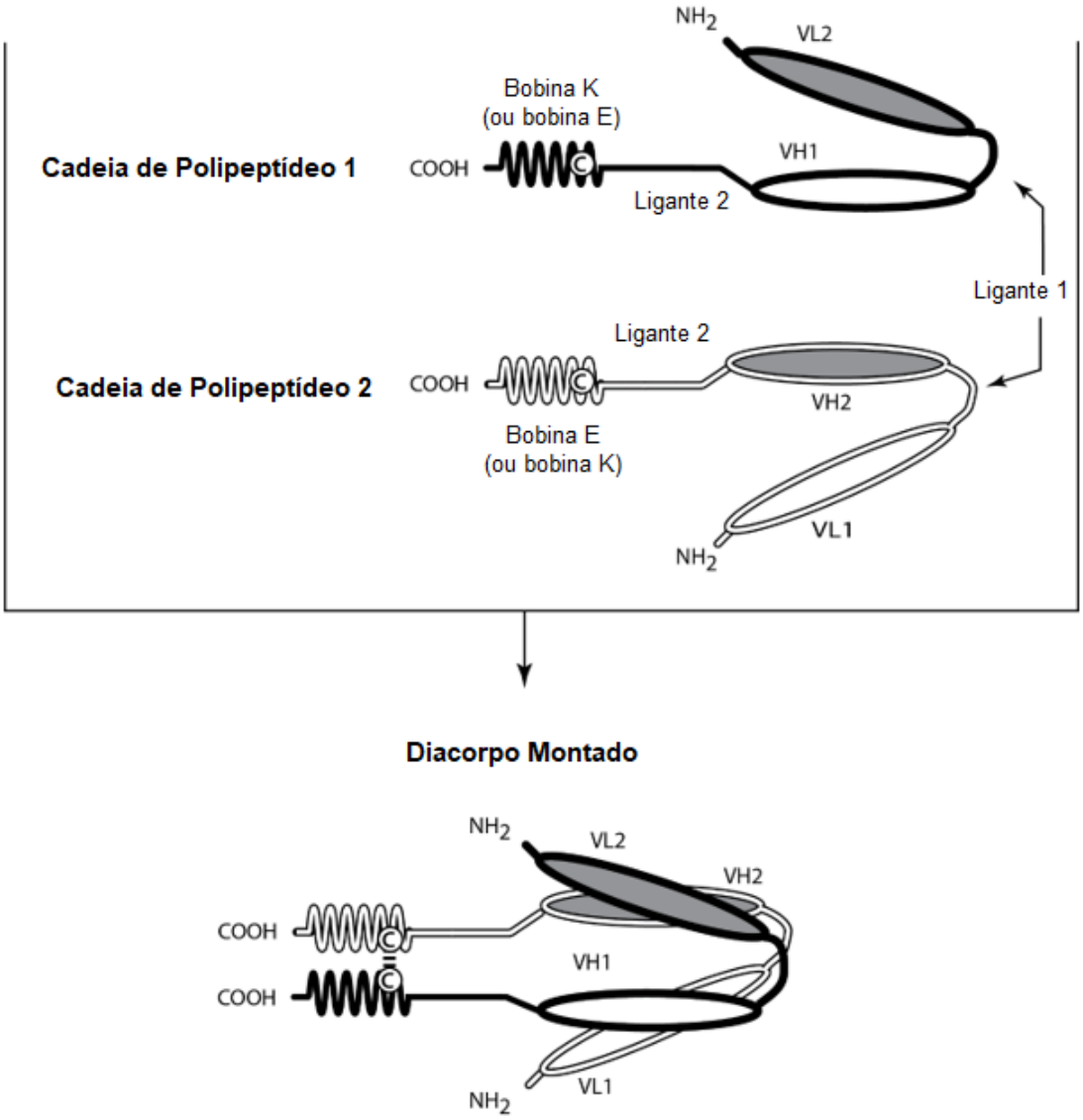

NH2
VL2
Bobina K
(ou bobina E)
Cadeia de Polipeptídeo 1
COOH
VH1
Ligante 2
Ligante 1
Ligante 2
Cadeia de Polipeptídeo 2
COOH
VH2
Bobina E
(ou bobina K)
VL1
NH2
Diacorpo Montado
NH2
VL2
VH2
COOH
VH1
COOH
NH2
VL1

Figura 1B

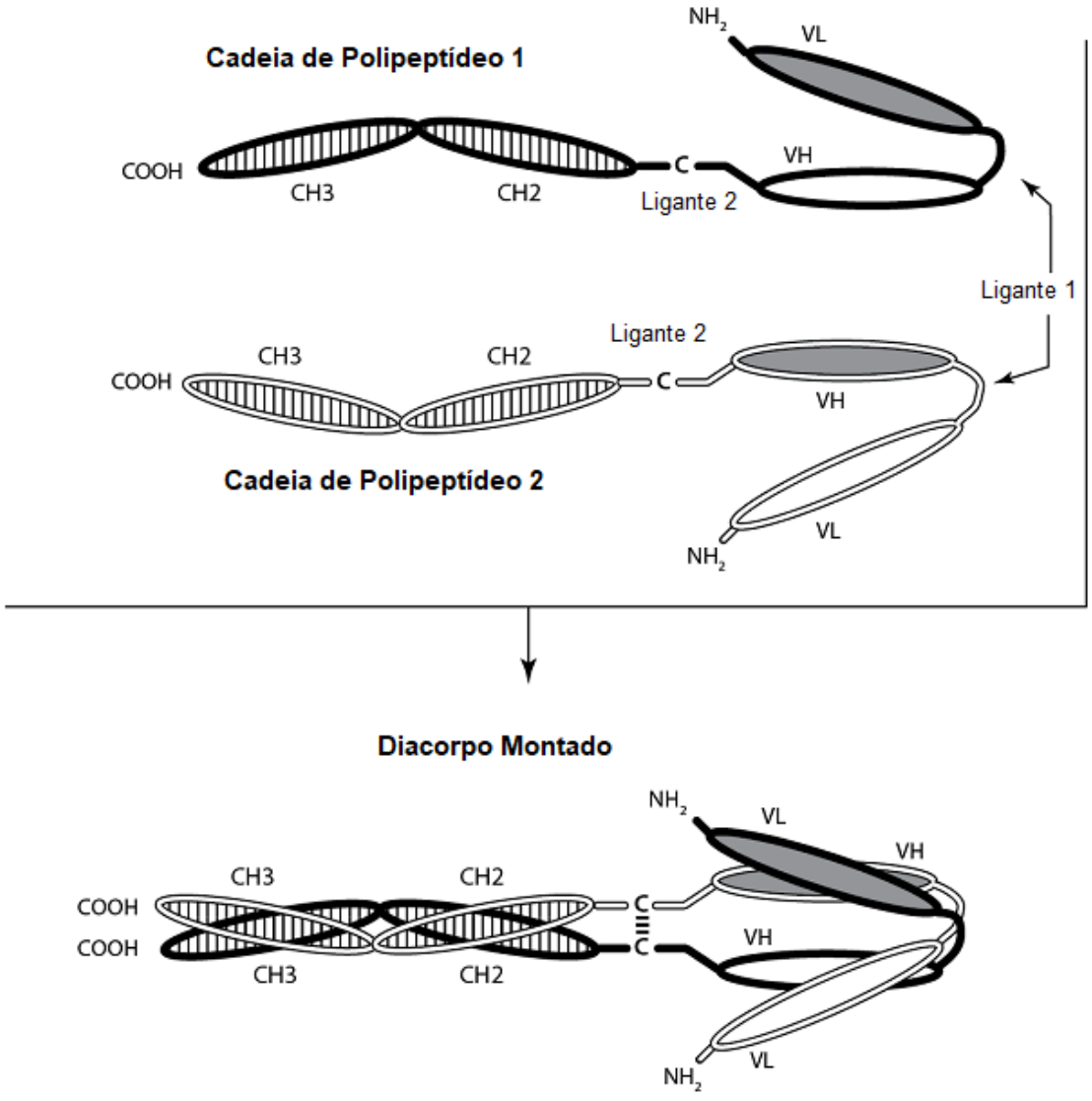

Cadeia de Polipeptídeo 1
NH2
VL
COOH
CH3
CH2
C
VH
Ligante 2
Ligante 1
Ligante 2
CH3
CH2
COOH
C
VH
Cadeia de Polipeptídeo 2
VL
NH2
Diacorpo Montado
NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
COOH
C
C
VH
CH3
CH2
VL
NH2

Figura 2

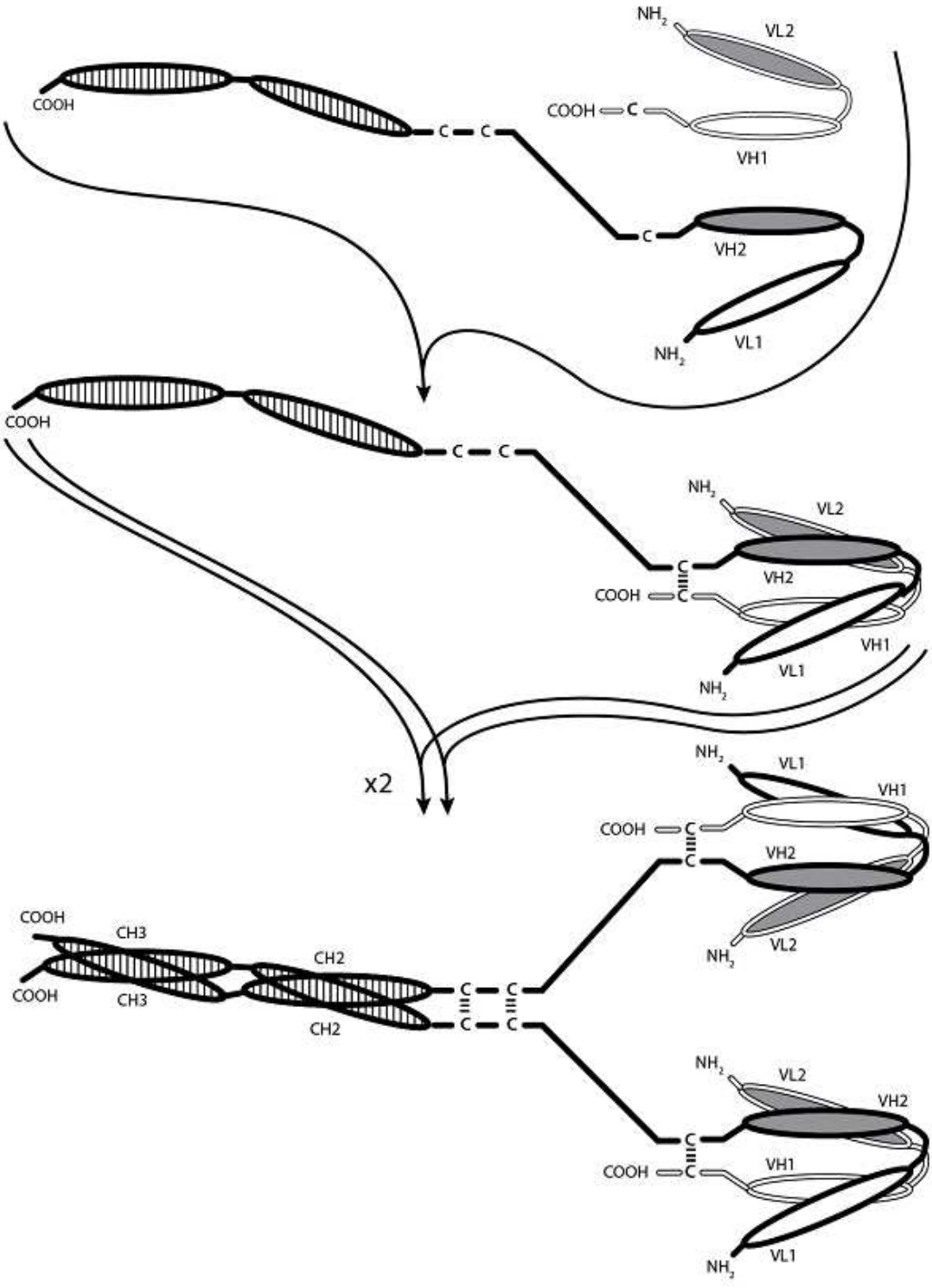

NH2
VL2
COOH
C
C
C
VH1
C
VH2
NH2
VL1
COOH
C
C
NH2
VL2
VH2
COOH
C
C
VH1
NH2
VL1
x2
NH2
VL1
VH1
COOH
C
C
VH2
NH2
VL2
COOH
CH3
CH2
C
C
COOH
CH3
C
C
CH2
NH2
VL2
VH2
COOH
C
C
VH1
NH2
VL1

Figura 3A

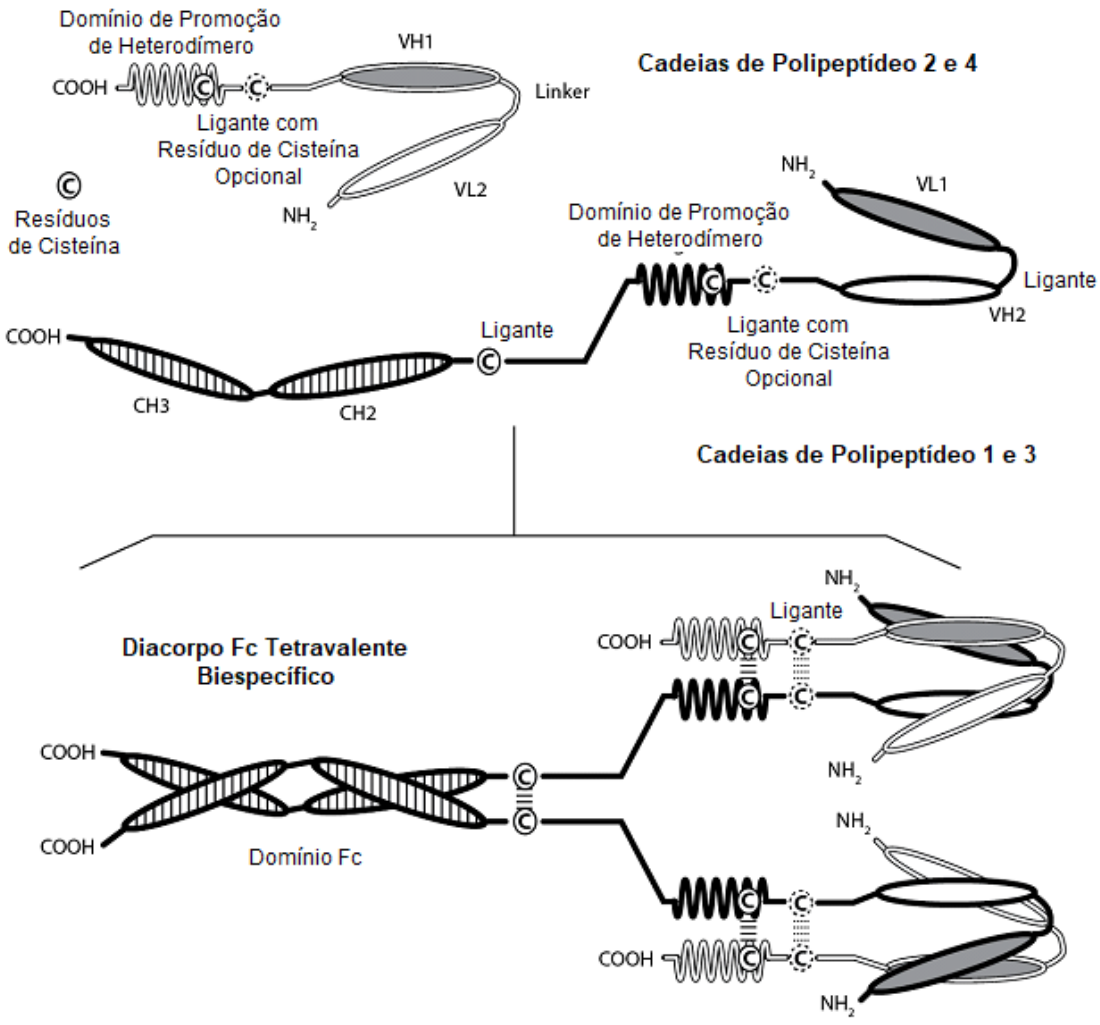

Domínio de Promoção de Heterodímero
VH1
COOH
Linker
Ligante com Resíduo de Cisteína Opcional
VL2
NH2
Resíduos de Cisteína
Cadeias de Polipeptídeo 2 e 4
NH2
VL1
Domínio de Promoção de Heterodímero
Ligante
VH2
Ligante com Resíduo de Cisteína Opcional
COOH
Ligante
CH3
CH2
Cadeias de Polipeptídeo 1 e 3
Diacorpo Fc Tetravalente Biespecífico
NH2
Ligante
COOH
COOH
COOH
Domínio Fc
NH2
NH2
COOH
NH2

Figura 3B

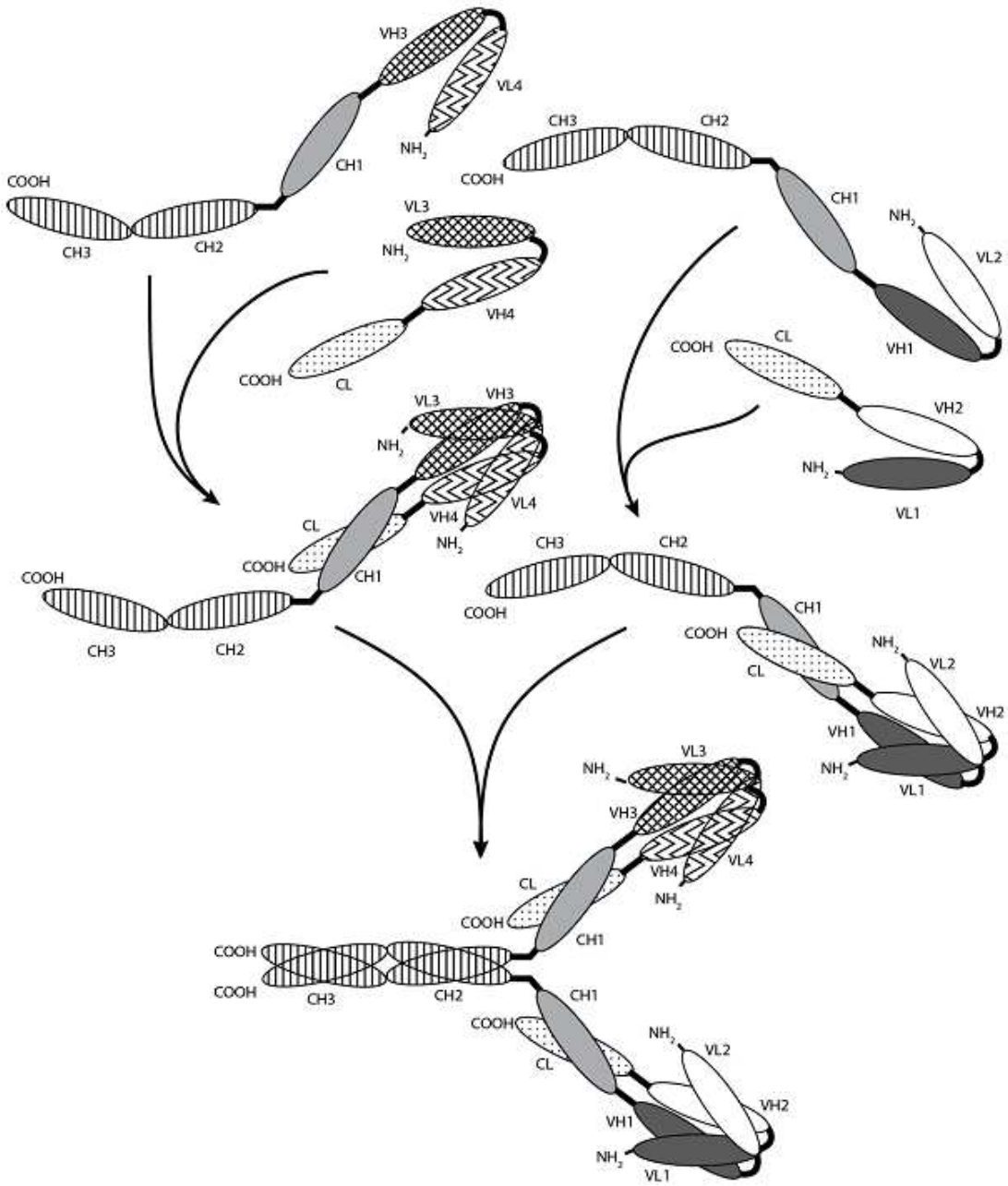


Figura 3C

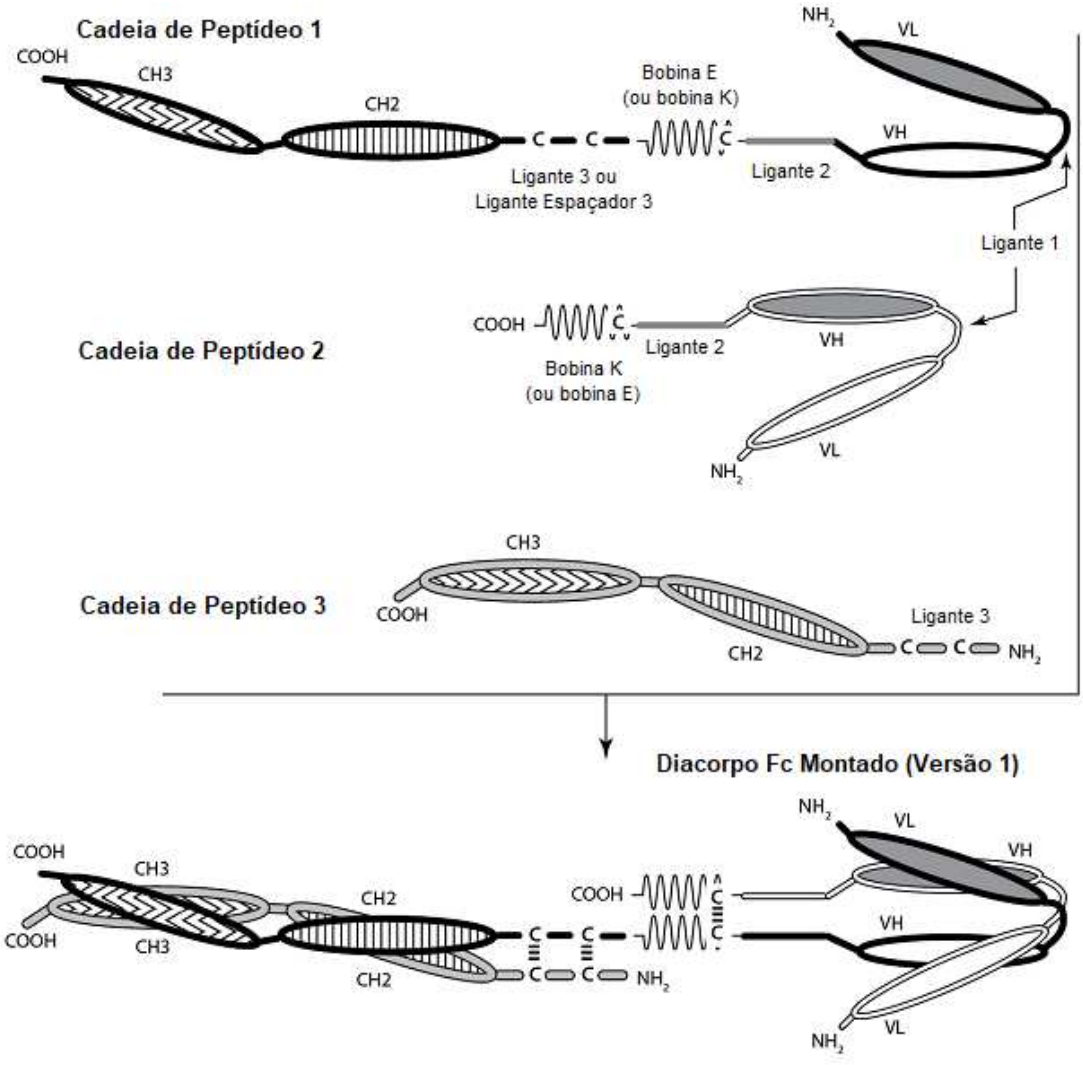

Cadeia de Peptídeo 1
COOH
CH3
CH2
Bobina E
(ou bobina K)
Ligante 3 ou
Ligante Espaçador 3
Ligante 2
NH2
VL
VH
Ligante 1
Cadeia de Peptídeo 2
COOH
Ligante 2
VH
Bobina K
(ou bobina E)
VL
NH2
Cadeia de Peptídeo 3
CH3
COOH
Ligante 3
CH2
NH2
Diacorpo Fc Montado (Versão 1)
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
COOH
NH2
NH2
VL
VH
VH
NH2
VL

Figura 4A

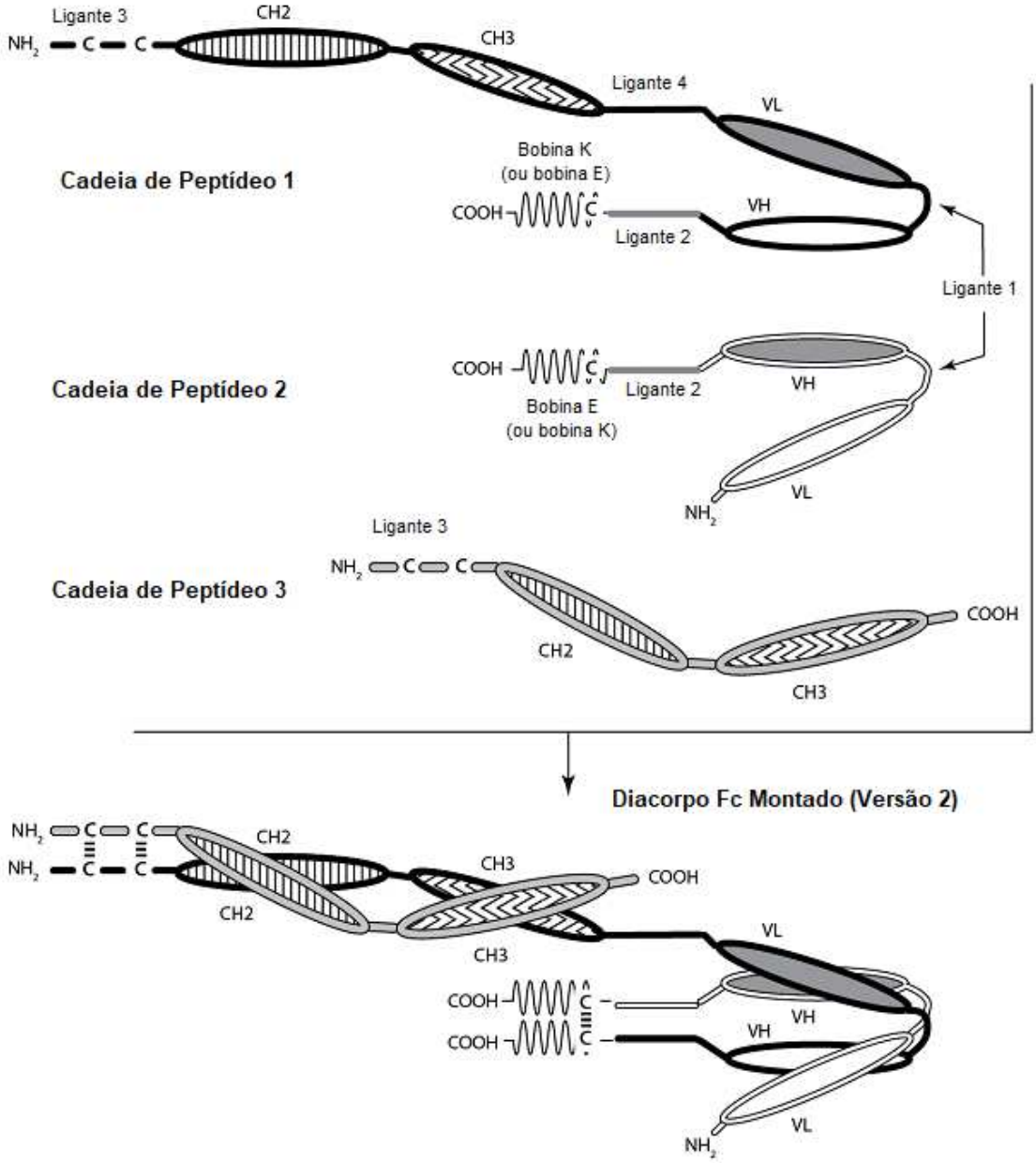

Ligante 3
CH2
NH2
C
C
CH3
Ligante 4
VL
Bobina K
(ou bobina E)
Cadeia de Peptídeo 1
COOH
VH
Ligante 2
Ligante 1
Cadeia de Peptídeo 2
COOH
Ligante 2
VH
Bobina E
(ou bobina K)
VL
NH2
Ligante 3
Cadeia de Peptídeo 3
NH2
COOH
CH2
CH3
Diacorpo Fc Montado (Versão 2)
NH2
NH2
CH2
CH3
COOH
CH2
VL
CH3
COOH
VH
COOH
VH
VL
NH2

Figura 4B

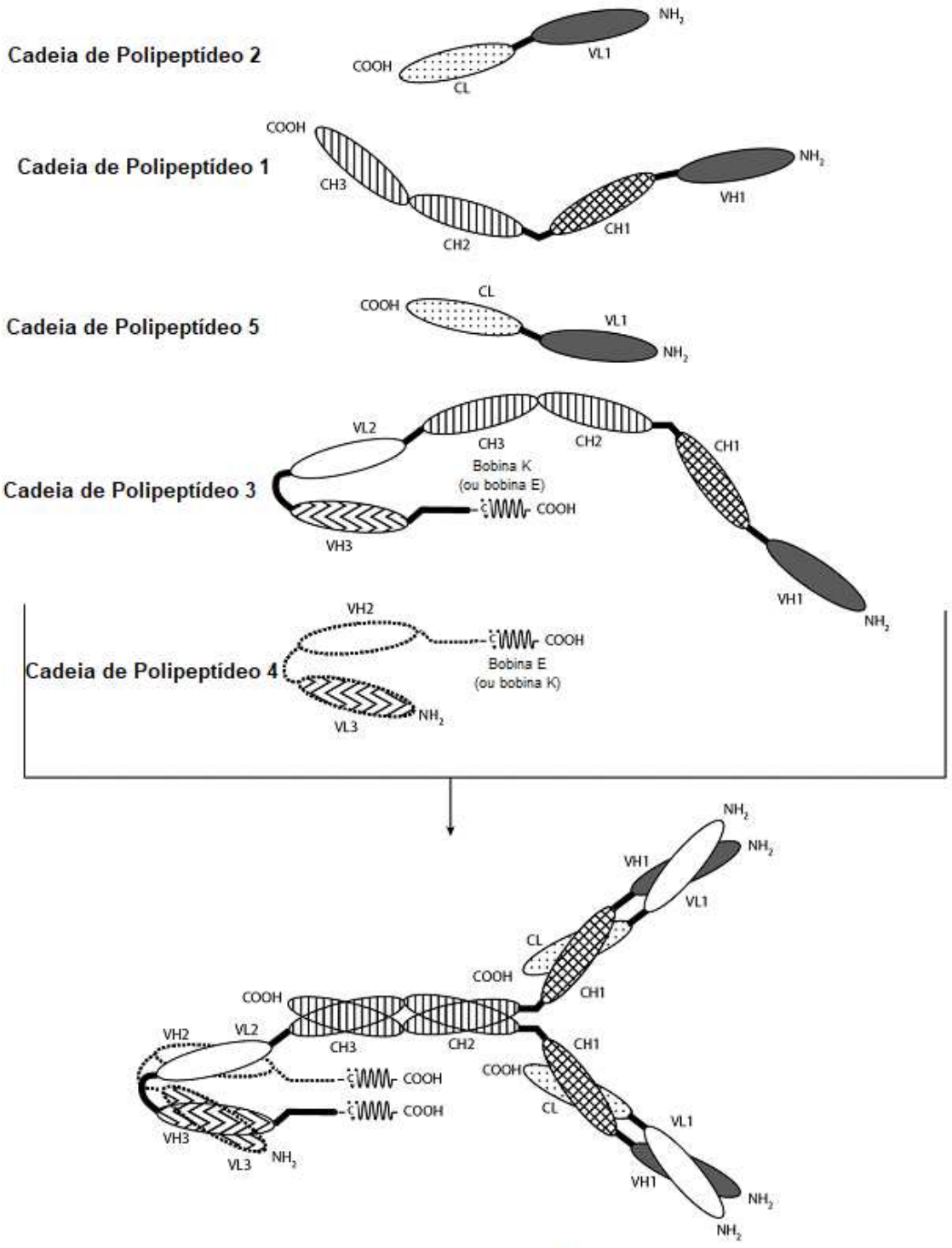

Cadeia de Polipeptídeo 2
NH2
VL1
COOH
CL
Cadeia de Polipeptídeo 1
COOH
CH3
NH2
VH1
CH2
CH1
Cadeia de Polipeptídeo 5
CL
COOH
VL1
NH2
Cadeia de Polipeptídeo 3
VL2
CH3
CH2
CH1
Bobina K
(ou bobina E)
COOH
VH3
VH1
NH2
Cadeia de Polipeptídeo 4
VH2
COOH
Bobina E
(ou bobina K)
VL3
NH2
NH2
NH2
VH1
VL1
CL
COOH
CH1
COOH
VH2
VL2
CH3
CH2
CH1
COOH
COOH
CL
VH3
VL3
NH2
VL1
VH1
NH2
NH2

Figura 5

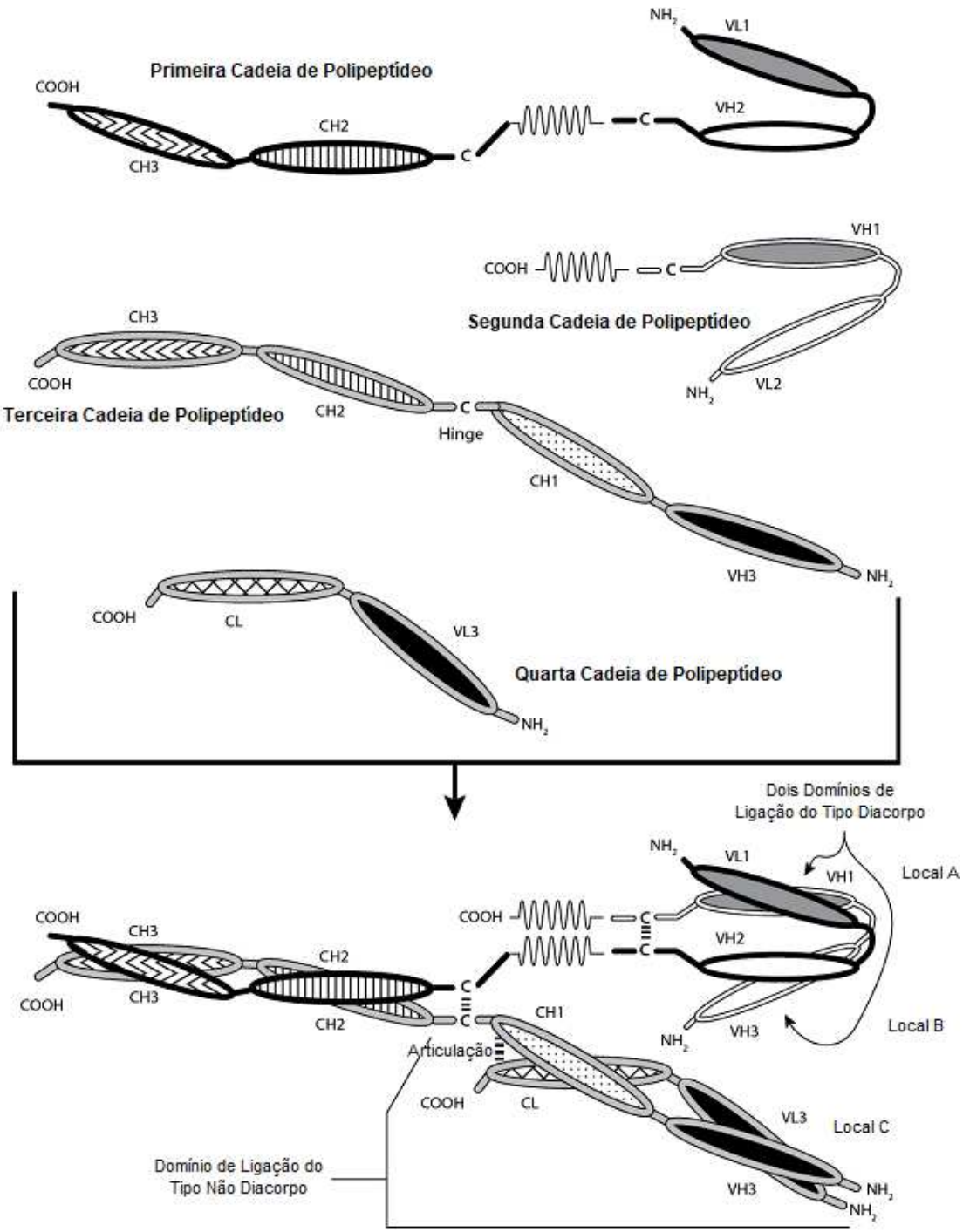

Primeira Cadeia de Polipeptídeo
COOH
CH2
CH3
C
C
NH2
VL1
VH2
Segunda Cadeia de Polipeptídeo
COOH
C
VH1
NH2
VL2
Terceira Cadeia de Polipeptídeo
CH3
COOH
CH2
C
Hinge
CH1
VH3
NH2
Quarta Cadeia de Polipeptídeo
COOH
CL
VL3
NH2
Dois Domínios de
Ligação do Tipo Diacorpo
Local A
Local B
Local C
Articulação
Domínio de Ligação do
Tipo Não Diacorpo

Figura 6A

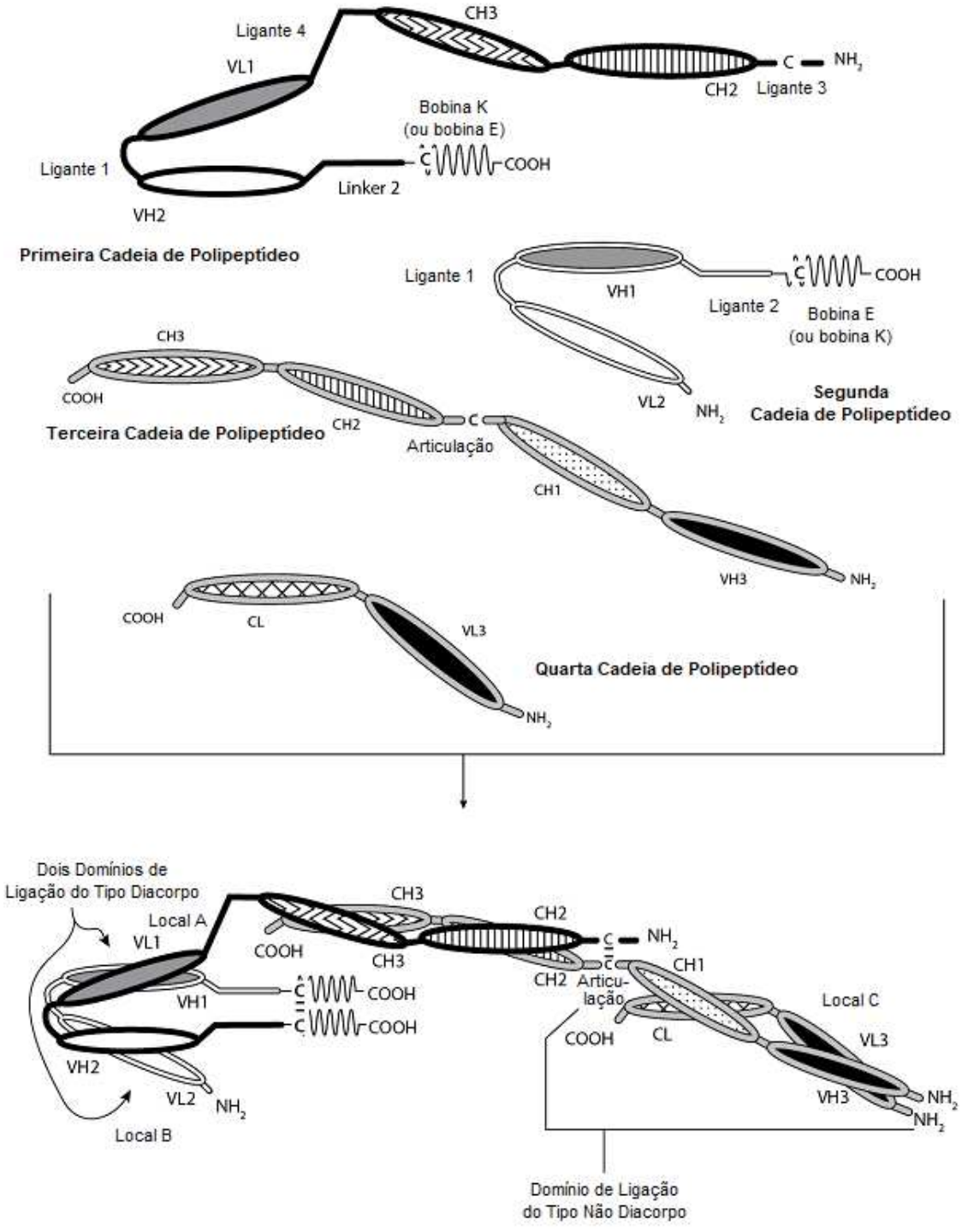

Ligante 4
CH3
VL1
C
NH2
CH2
Ligante 3
Bobina K
(ou bobina E)
Ligante 1
COOH
Linker 2
VH2
Primeira Cadeia de Polipeptídeo
Ligante 1
VH1
COOH
Ligante 2
Bobina E
(ou bobina K)
VL2
NH2
Segunda
Cadeia de Polipeptídeo
CH3
COOH
CH2
C
Terceira Cadeia de Polipeptídeo
Articulação
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Quarta Cadeia de Polipeptídeo
NH2
Dois Domínios de
Ligação do Tipo Diacorpo
Local A
VL1
CH3
CH2
C
NH2
COOH
CH3
CH1
CH2
Articu-
lação
VH1
COOH
COOH
Local C
COOH
CL
VL3
VH2
VH3
NH2
NH2
VL2
NH2
Local B
Domínio de Ligação
do Tipo Não Diacorpo

Figura 6B

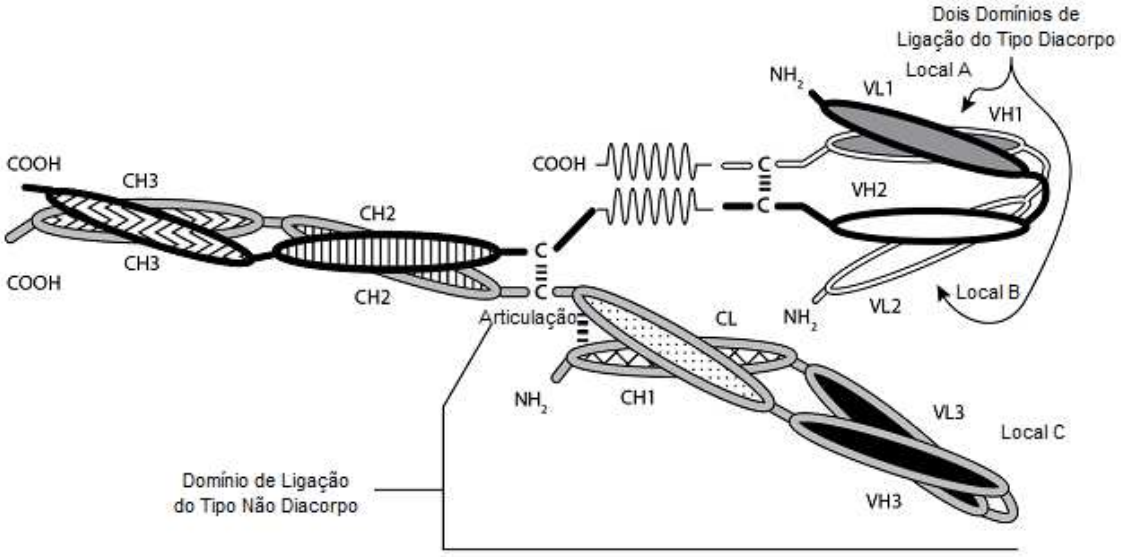


Figura 6C

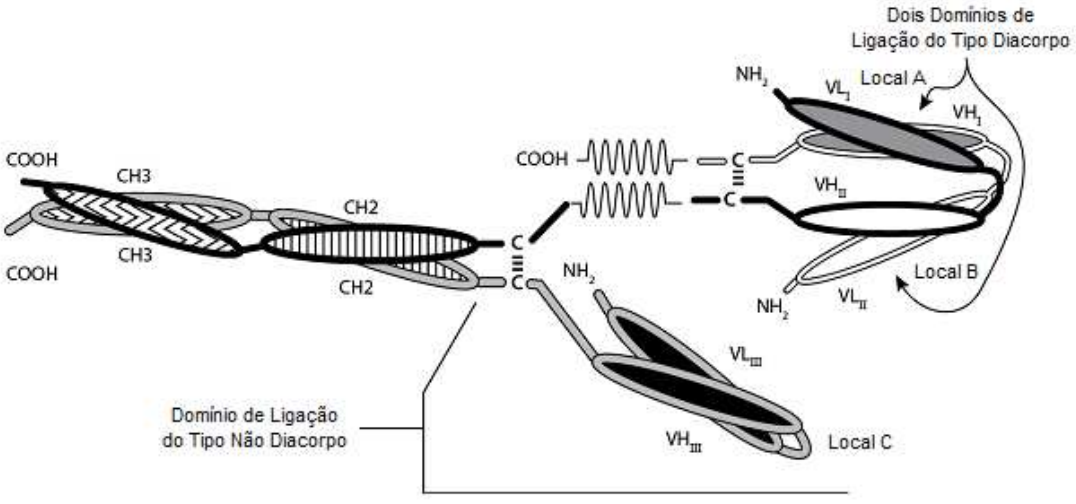


Figura 6D

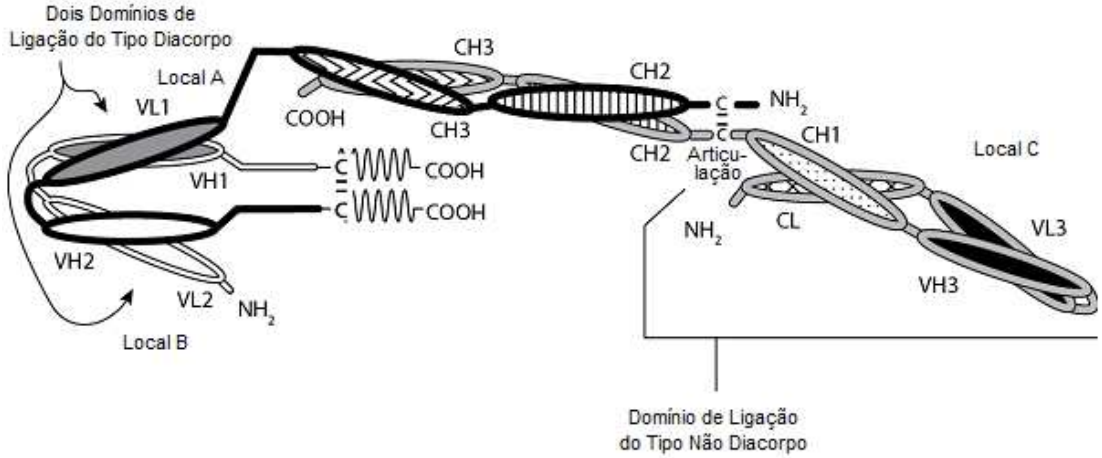


Figura 6E

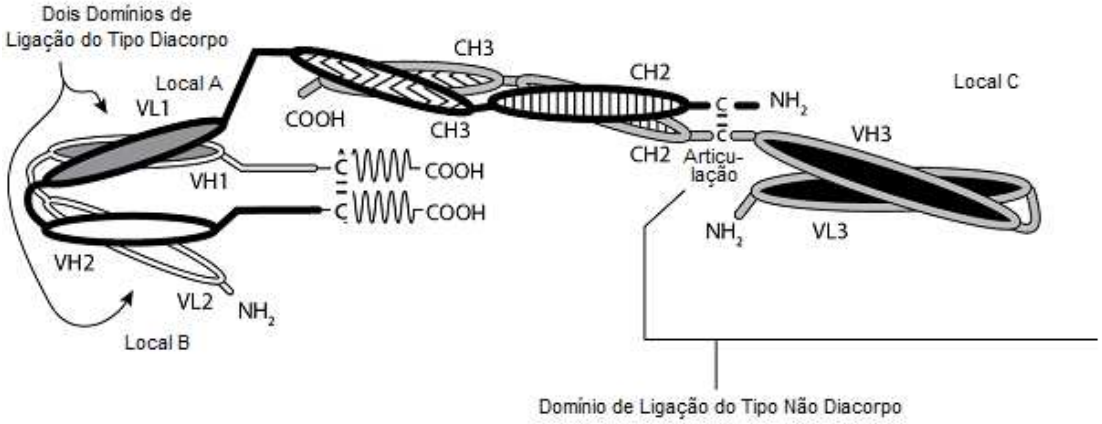


Figura 6F

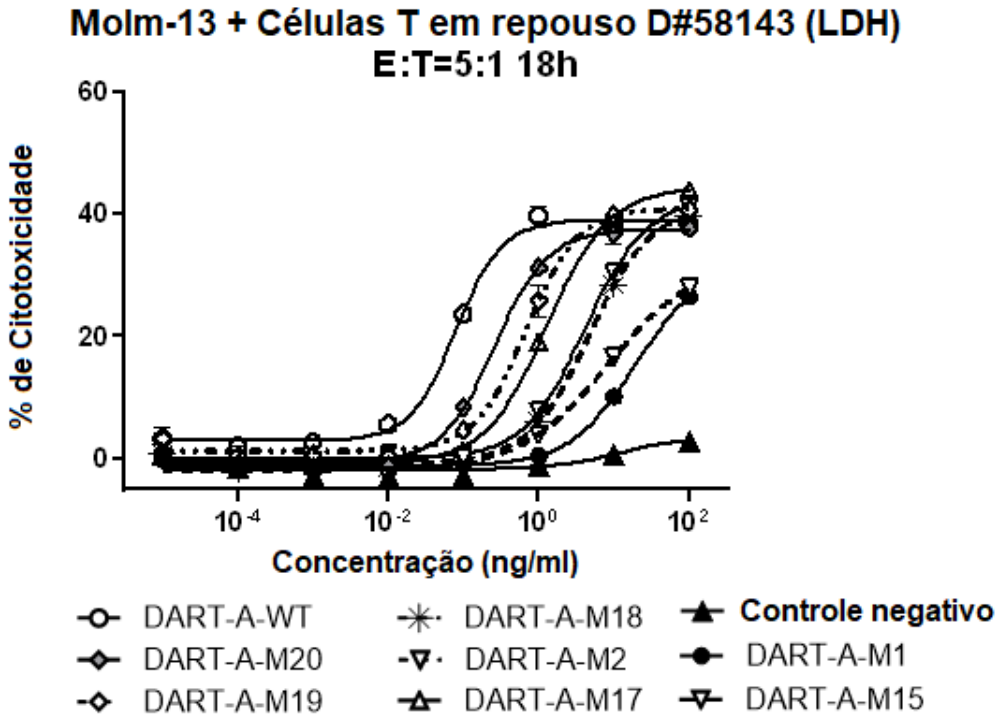


Figura 7A

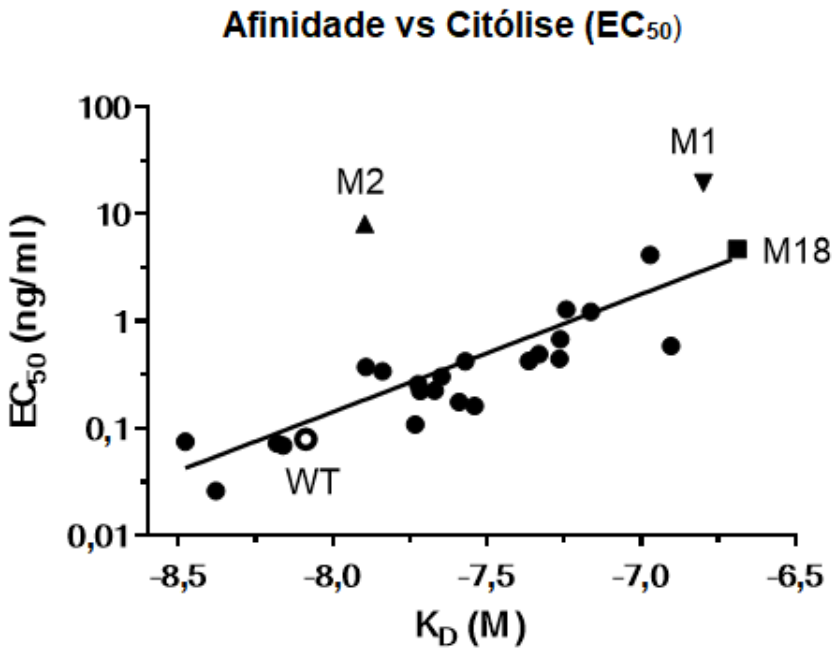


Figura 7B

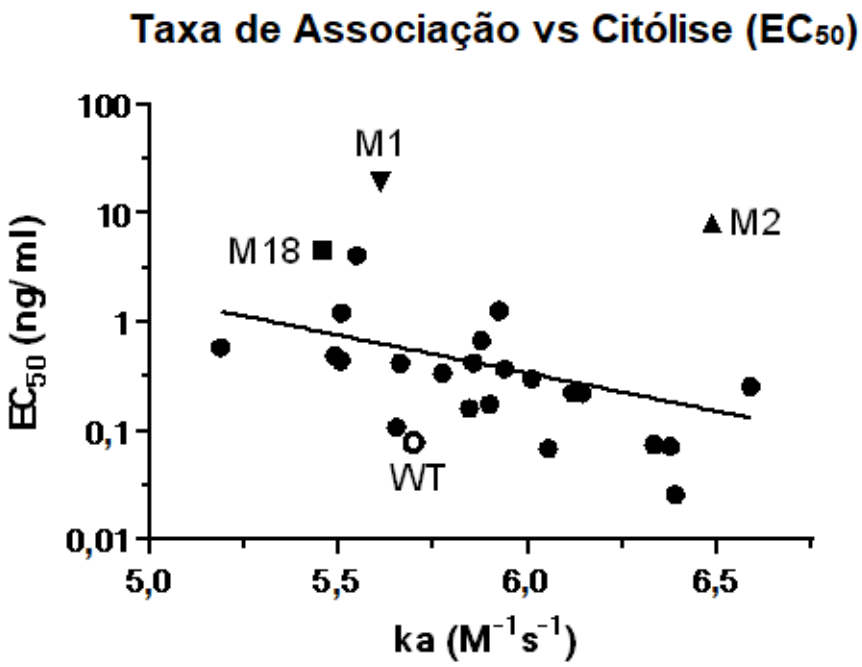


Figura 7C

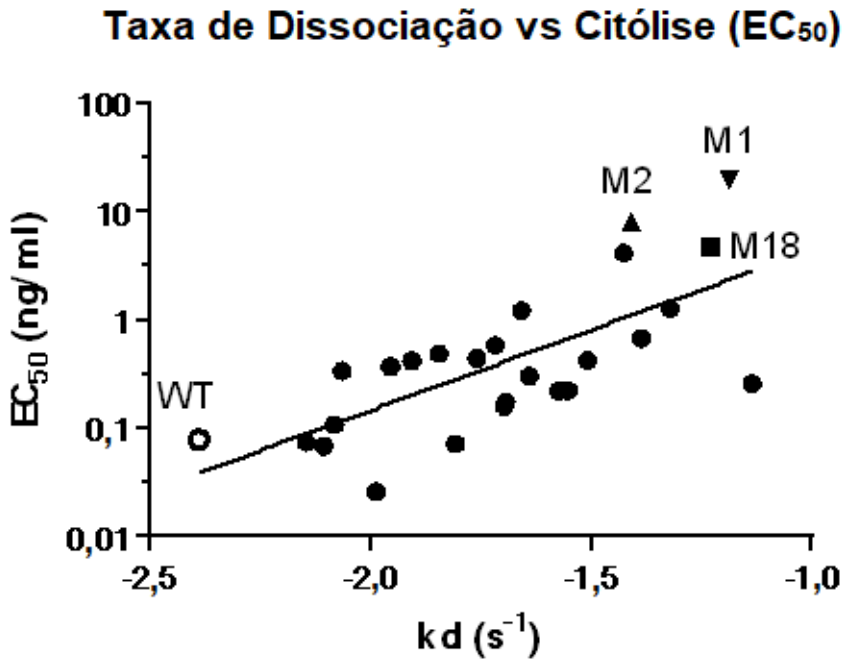
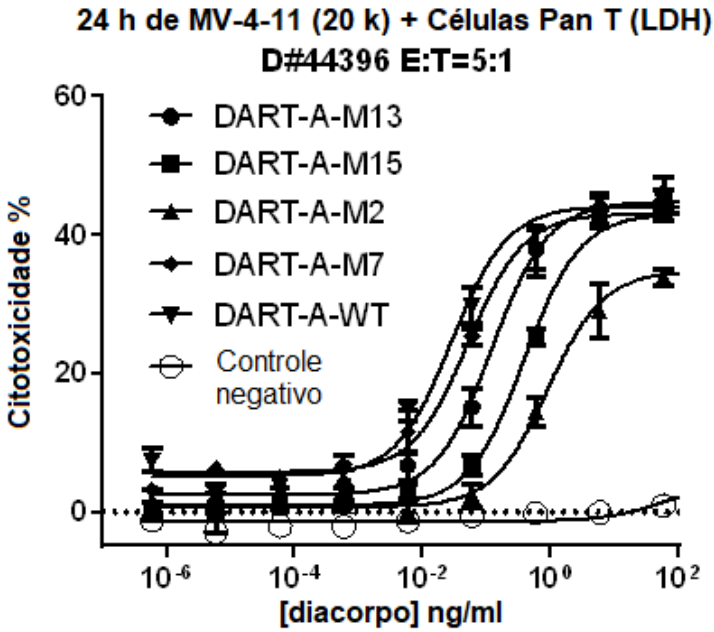


Figura 7D



	EC50
DART-A-M13	0,12
DART-A-M15	0,39
DART-A-M2	0,92
DART-A-M7	0,052
DART-A-WT	0,029

Figura 8A

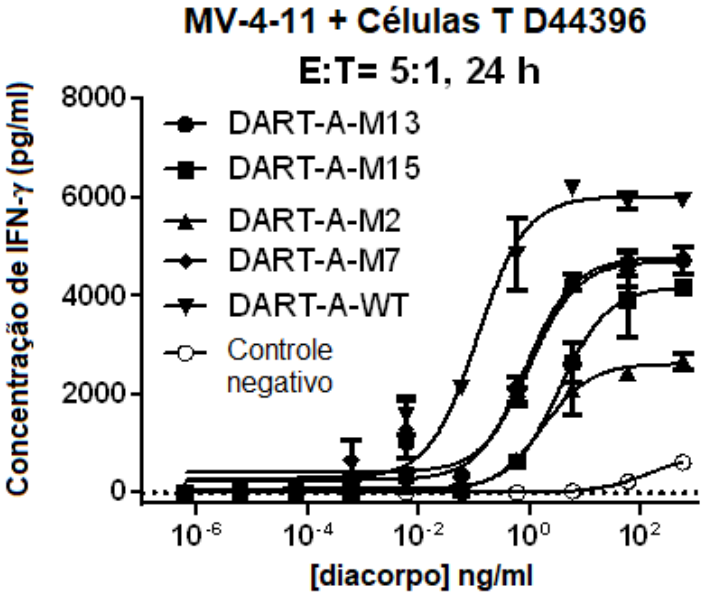


Figura 8B

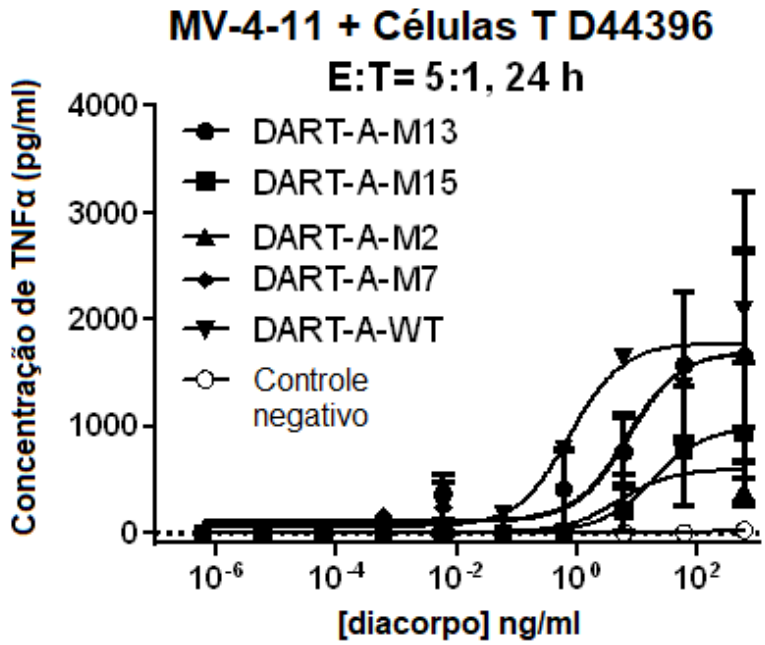


Figura 8C

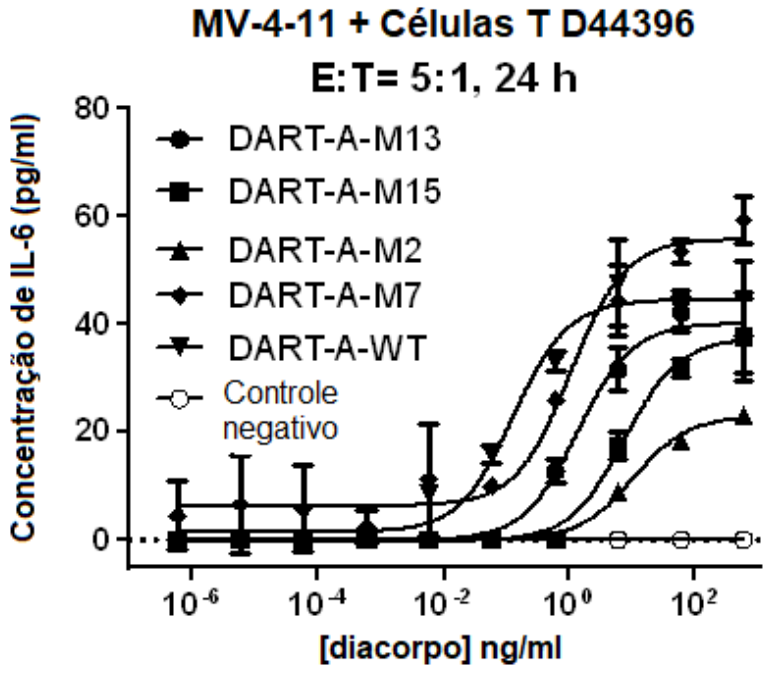


Figura 8D

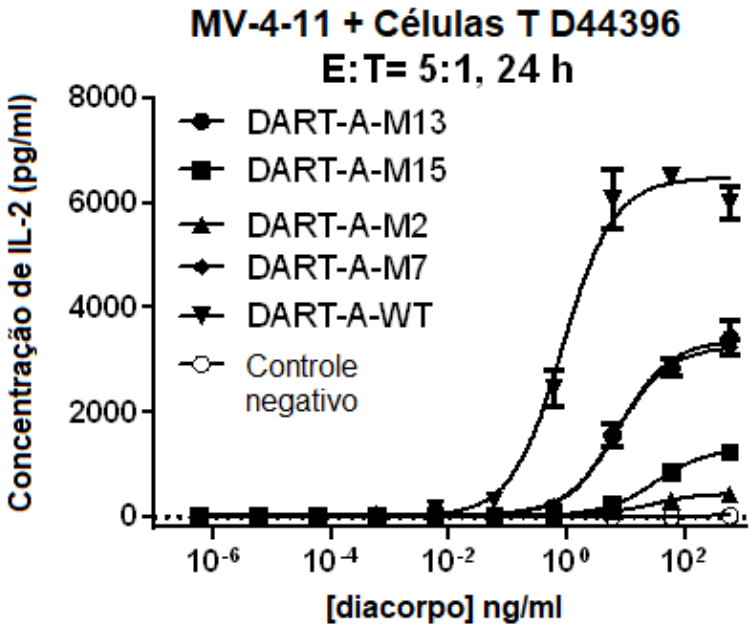


Figura 8E

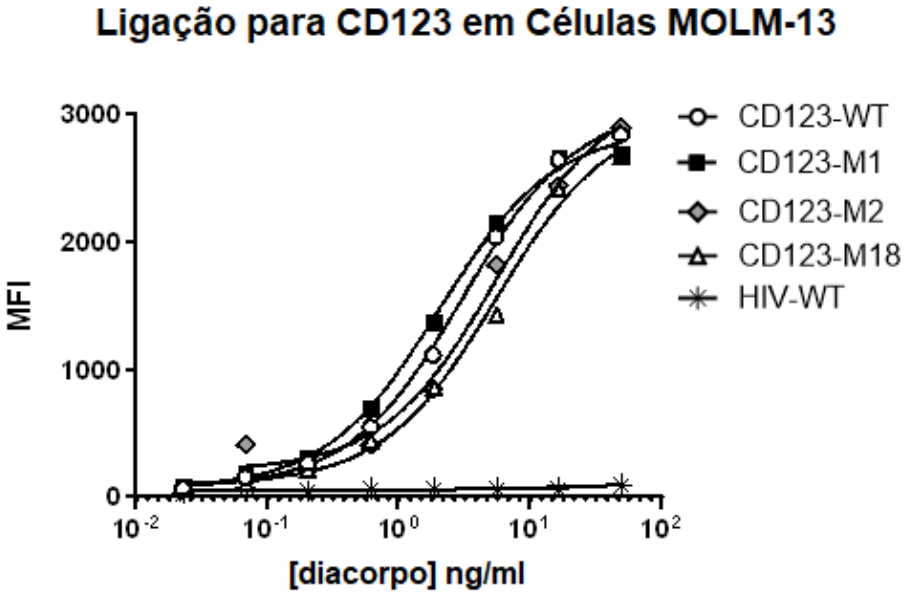


Figura 9A

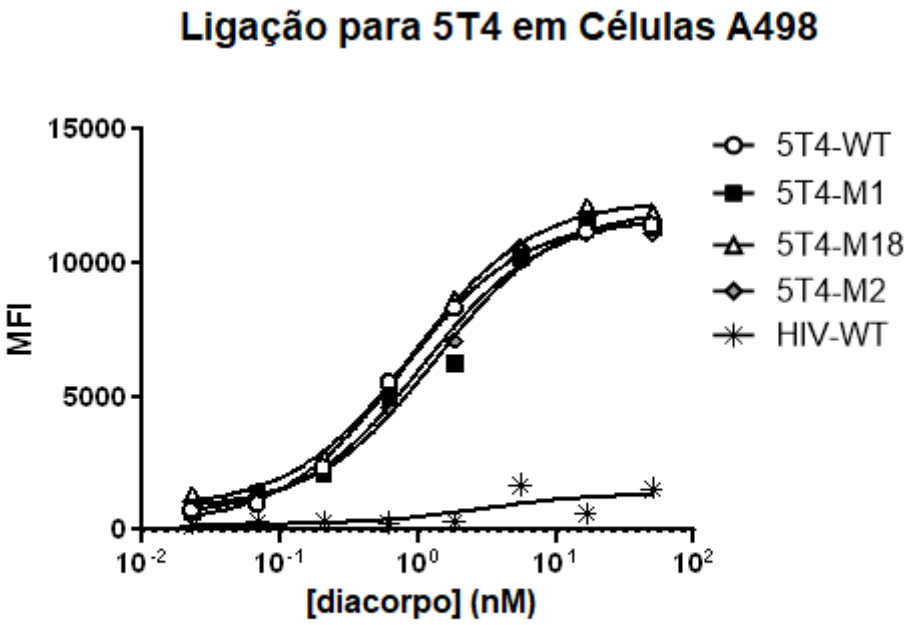


Figura 9B

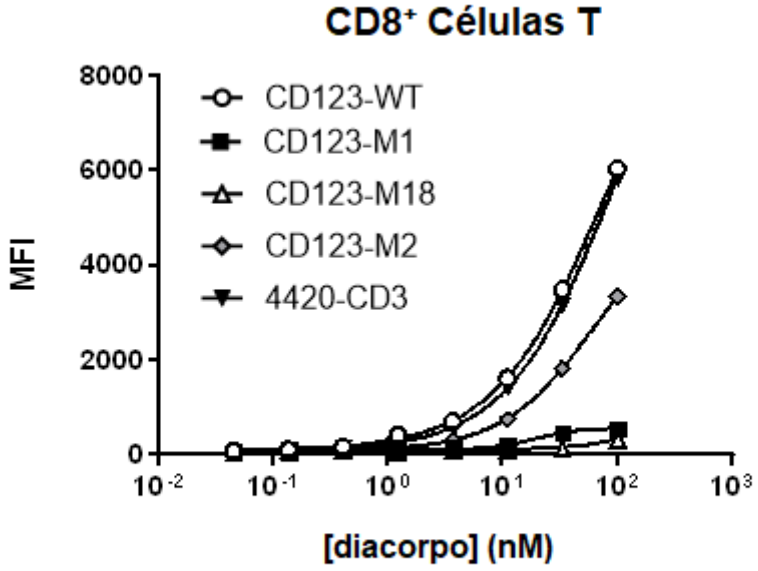


Figura 10A

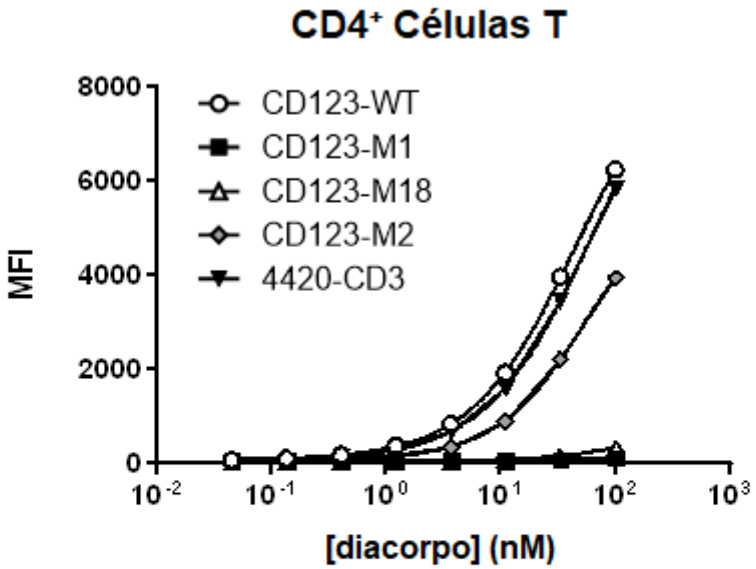


Figura 10B

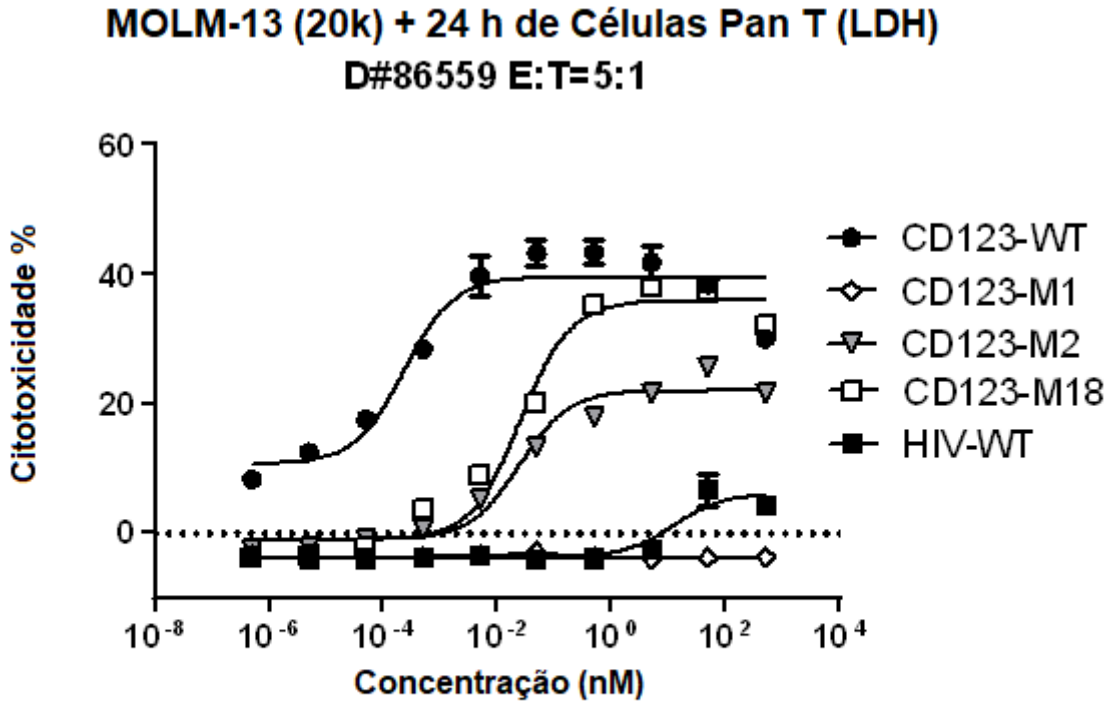


Figura 11A

	EC50
CD123-WT - CTL	0,00024
IFN-g	0,0020

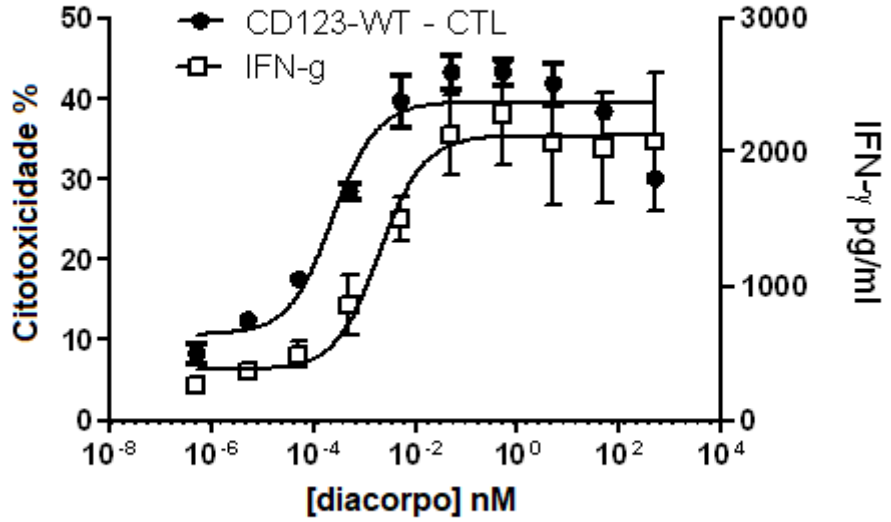


Figura 11B

	EC50
CD123-M2 - CTL	0,025
IFN-g	0,073

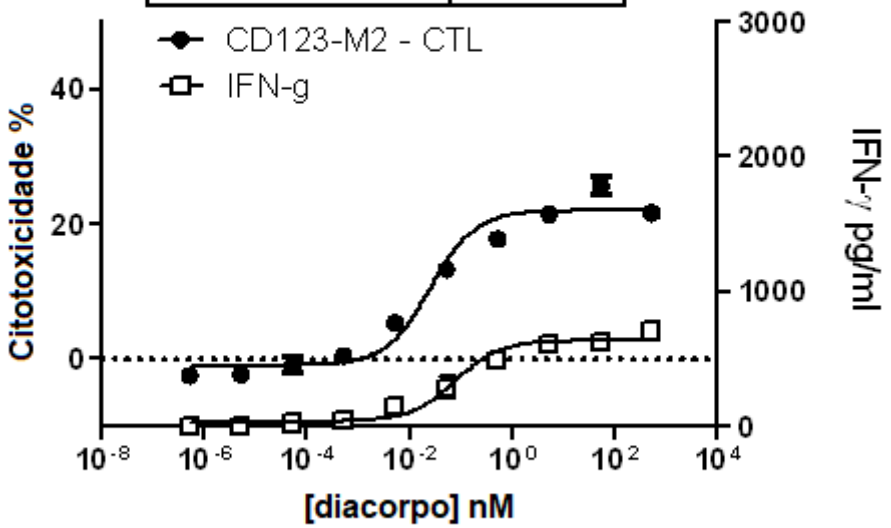


Figura 11C

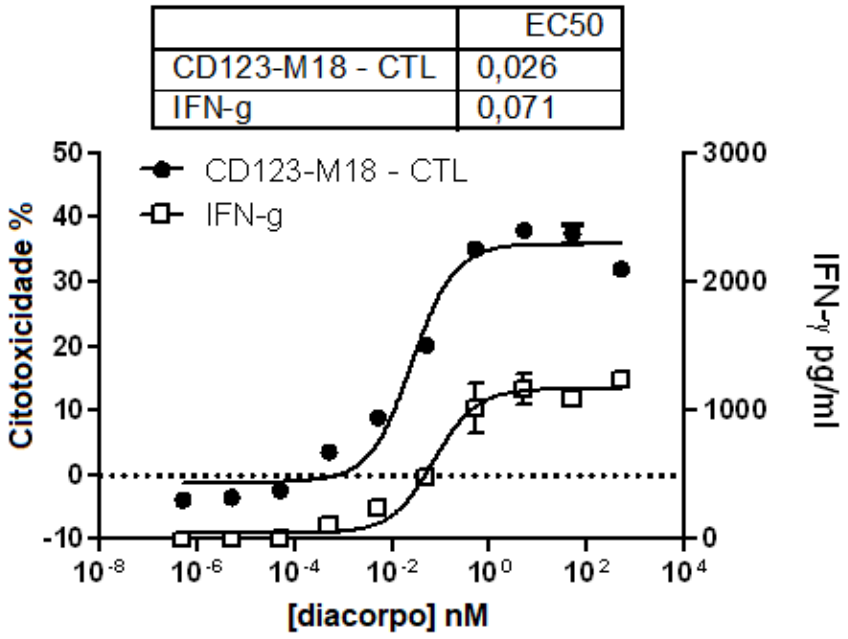


Figura 11D

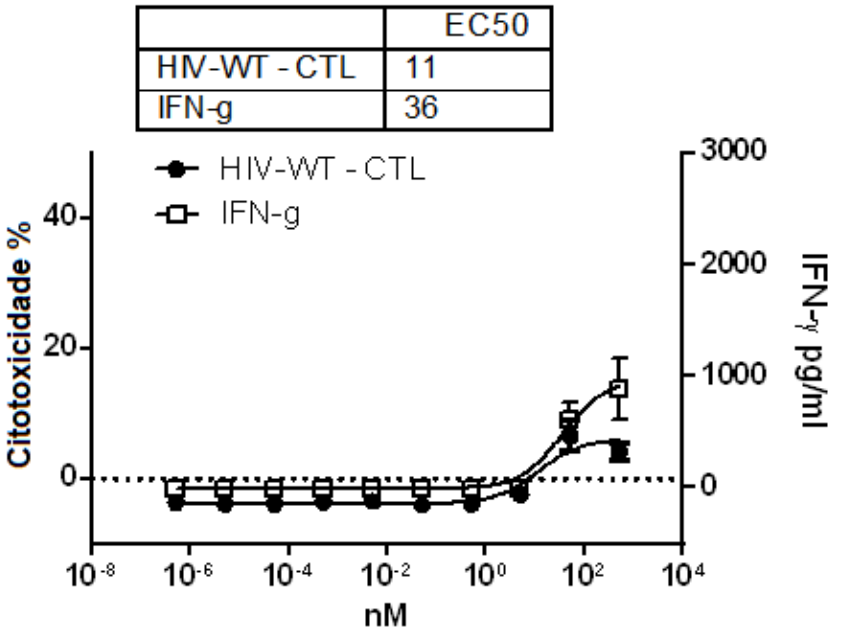


Figura 11E

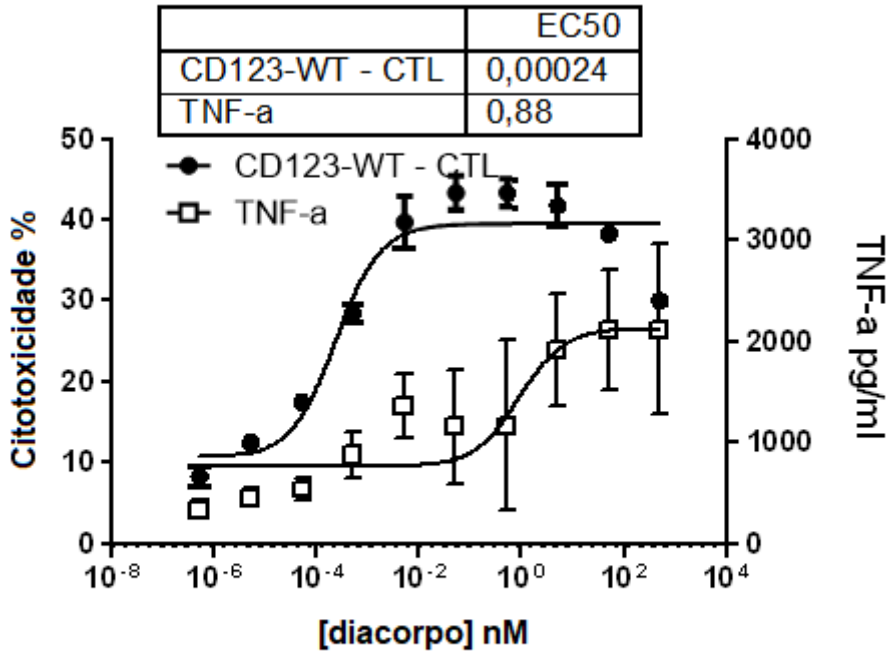


Figura 11F

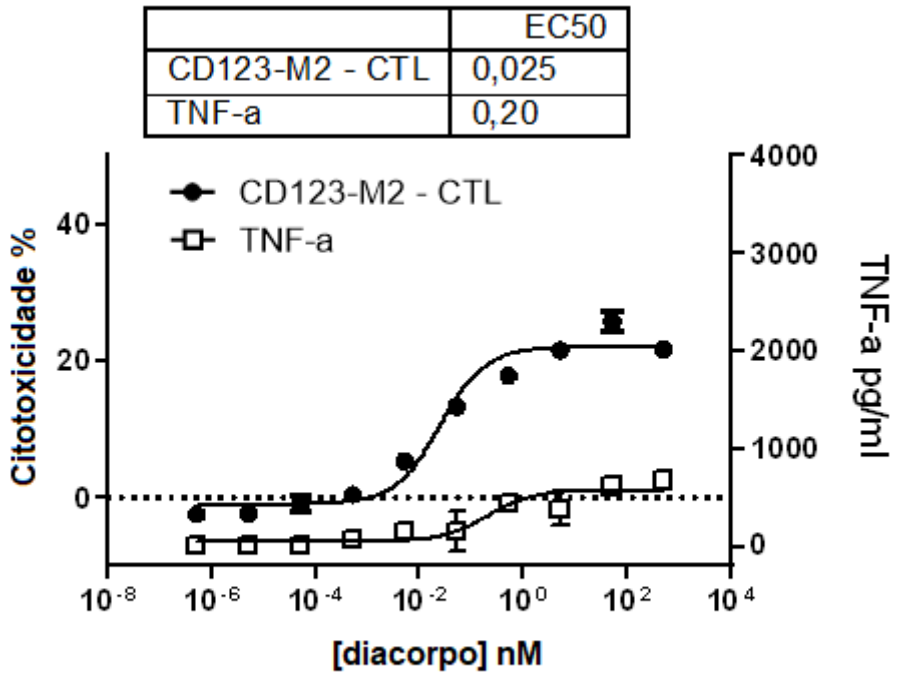


Figura 11G

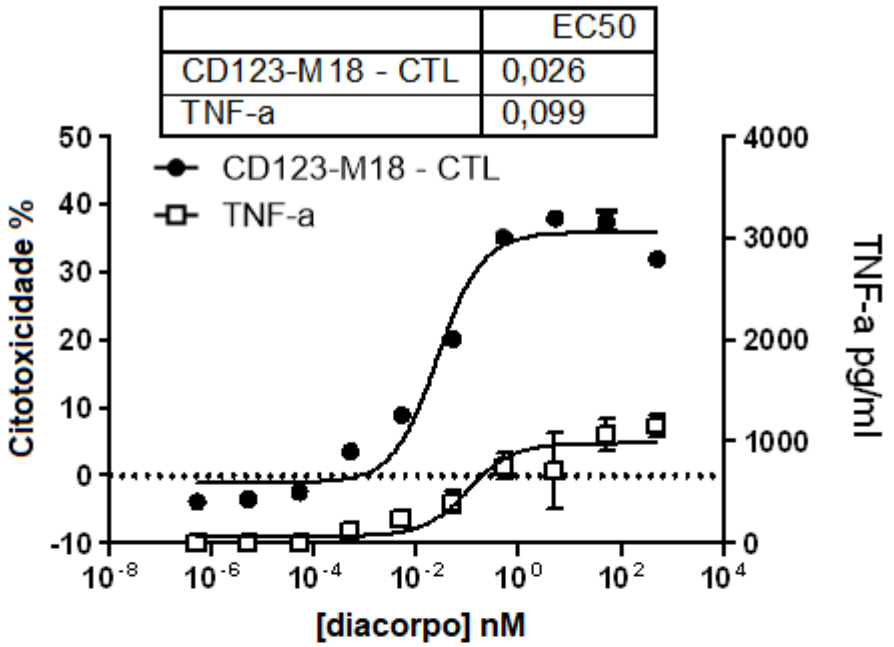


Figura 11H

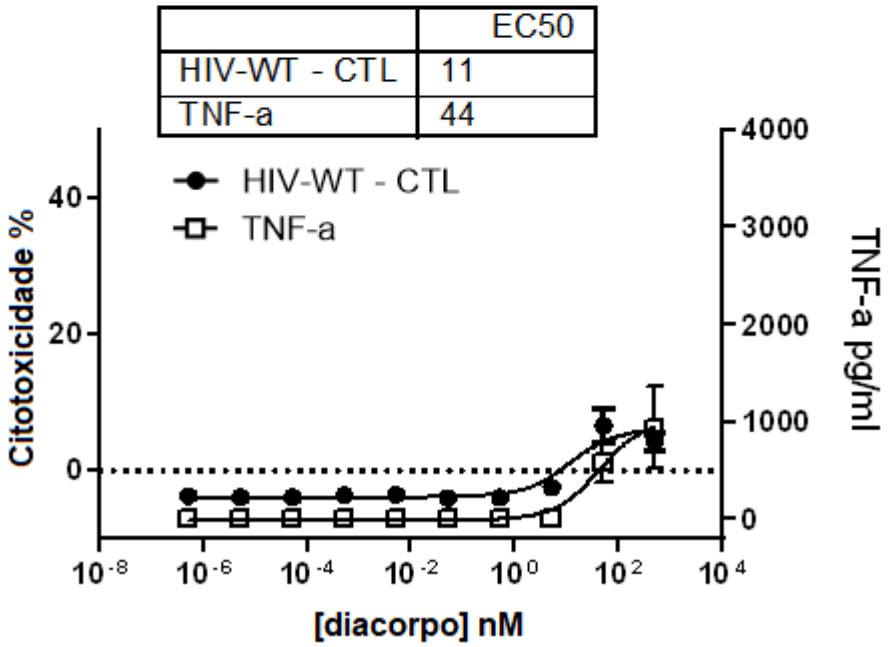


Figura 11I

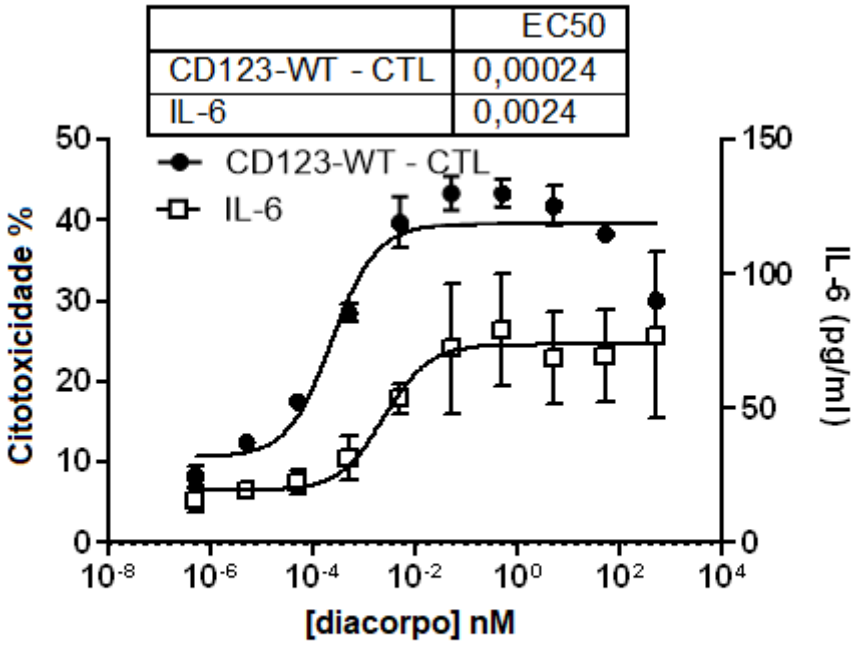


Figura 11J

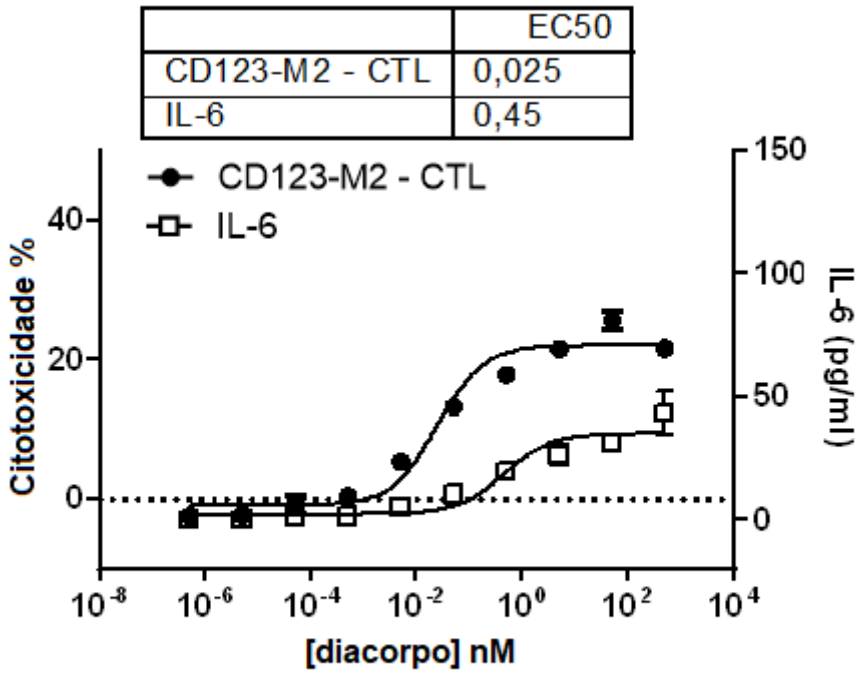


Figura 11K

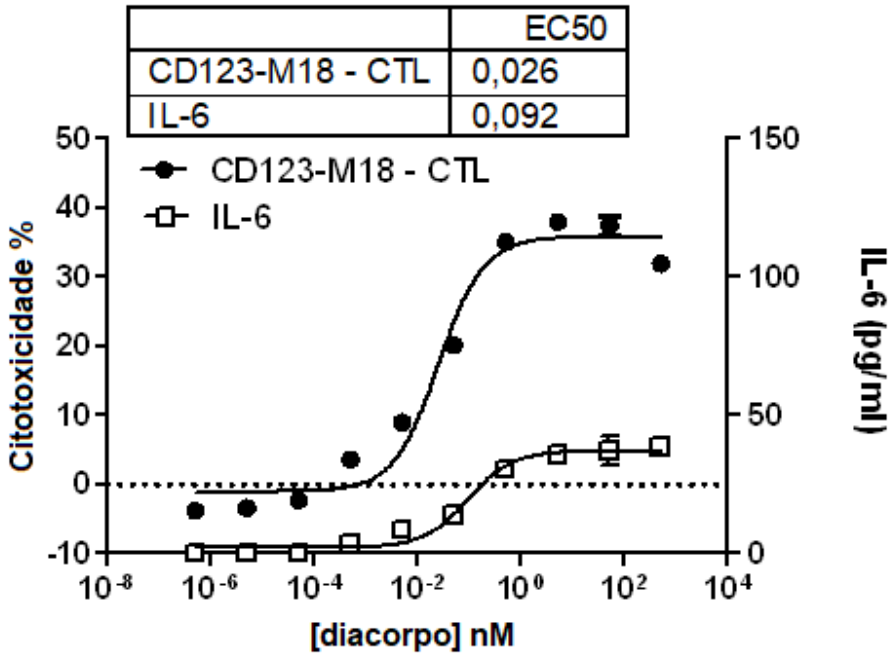


Figura 11L

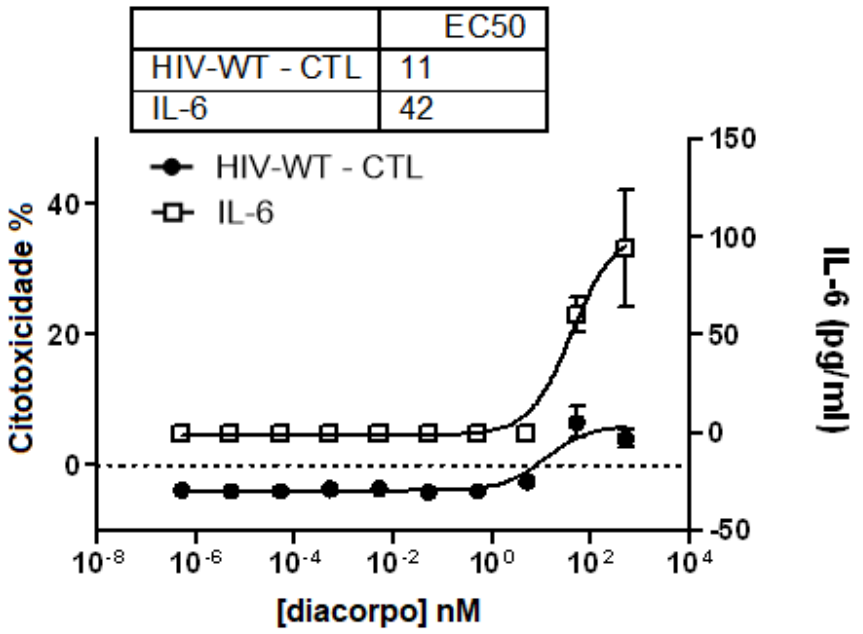


Figura 11M

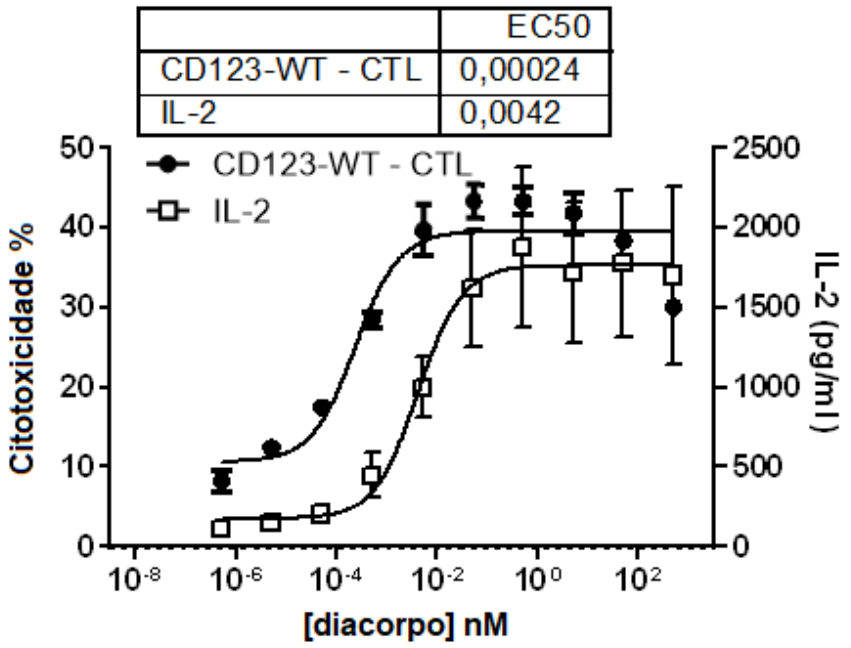


Figura 11N

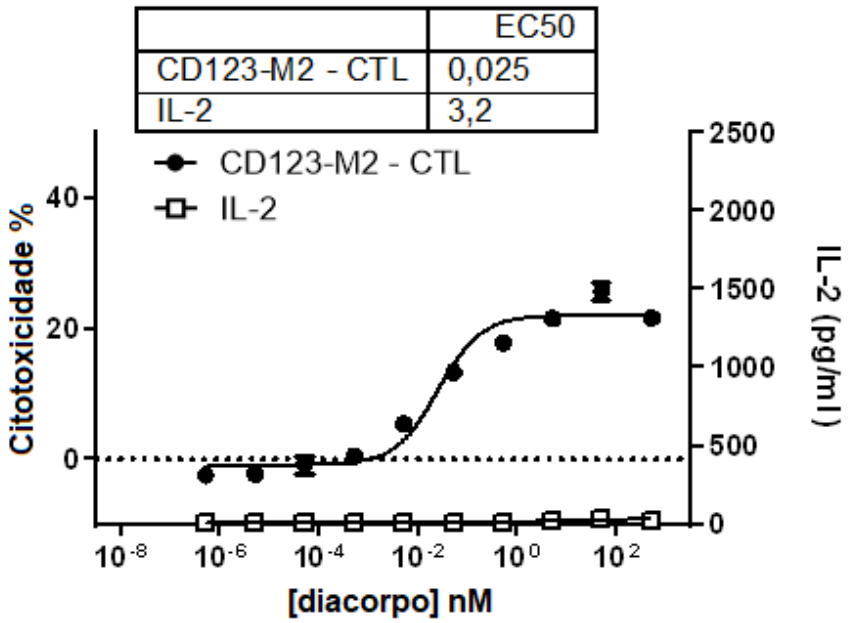


Figura 11O

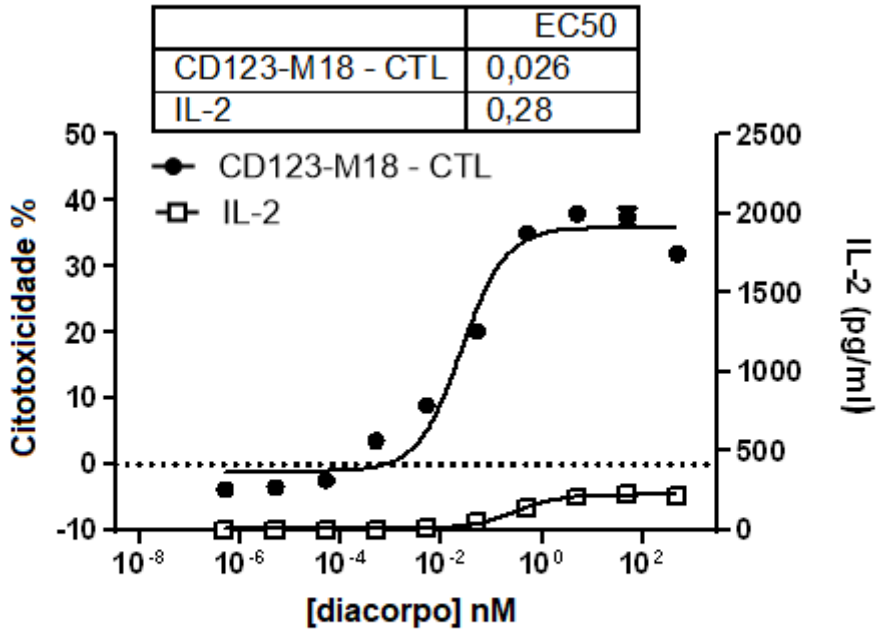


Figura 11P

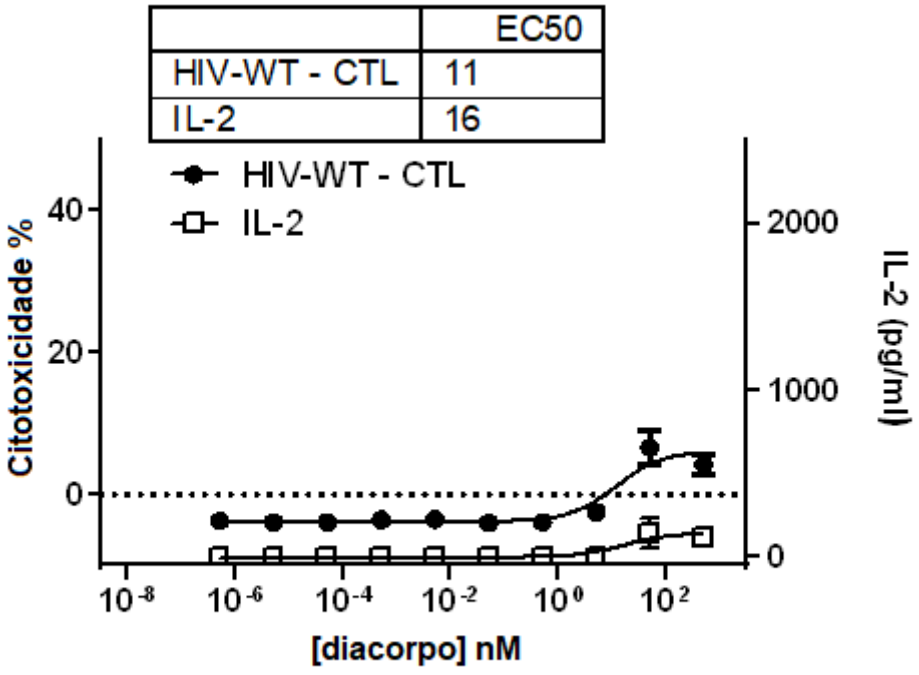
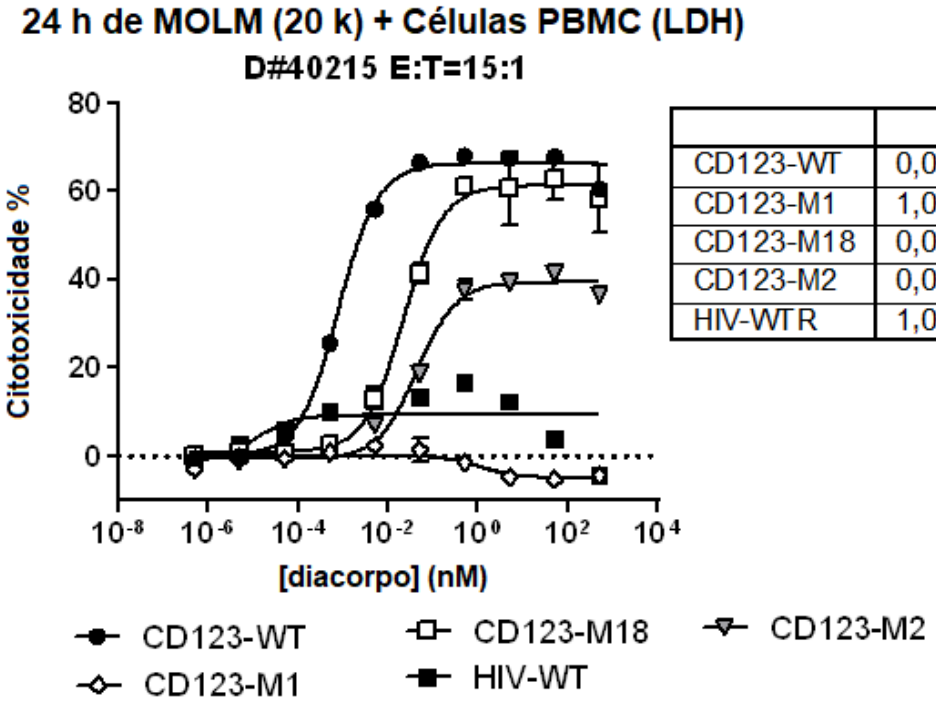
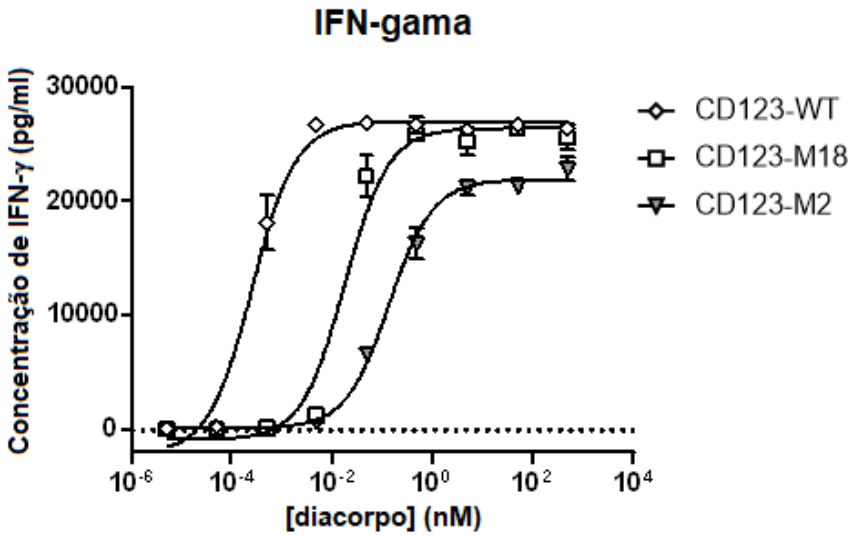


Figura 11Q



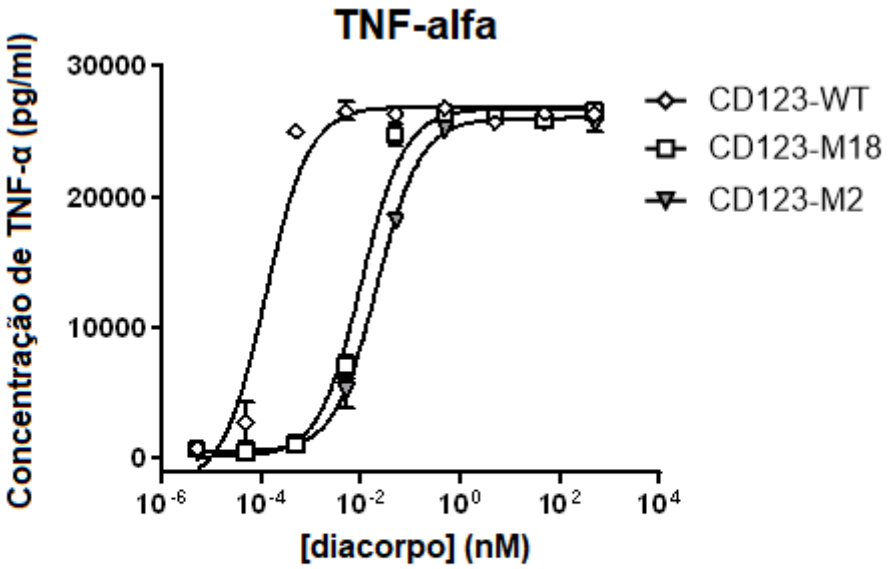
	EC50
CD123-WT	0,0008035
CD123-M1	1,050
CD123-M18	0,02238
CD123-M2	0,04500
HIV-WTR	1,033e-005

Figura 12A



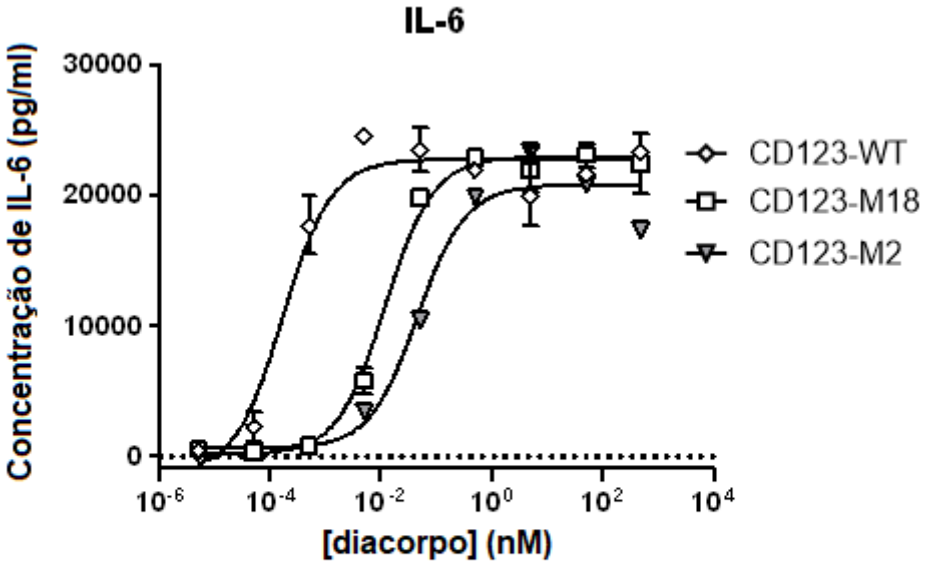
	CD123-WT	CD123-M18	CD123-M2
EC50	0,0002582	0,01826	0,1391

Figura 12B



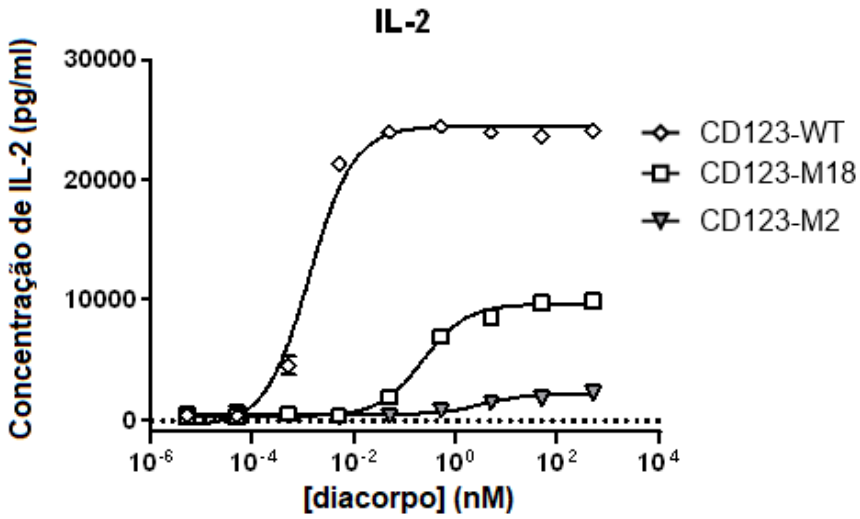
	CD123-WT	CD123-M18	CD123-M2
EC50	0,0001247	0,01043	0,02177

Figura 12C



	CD123-WT	CD123-M18	CD123-M2
EC50	0,0001708	0,01198	0,04549

Figura 12D



	CD123-WT	CD123-M18	CD123-M2
EC50	0,001316	0,2249	3,164

Figura 12E

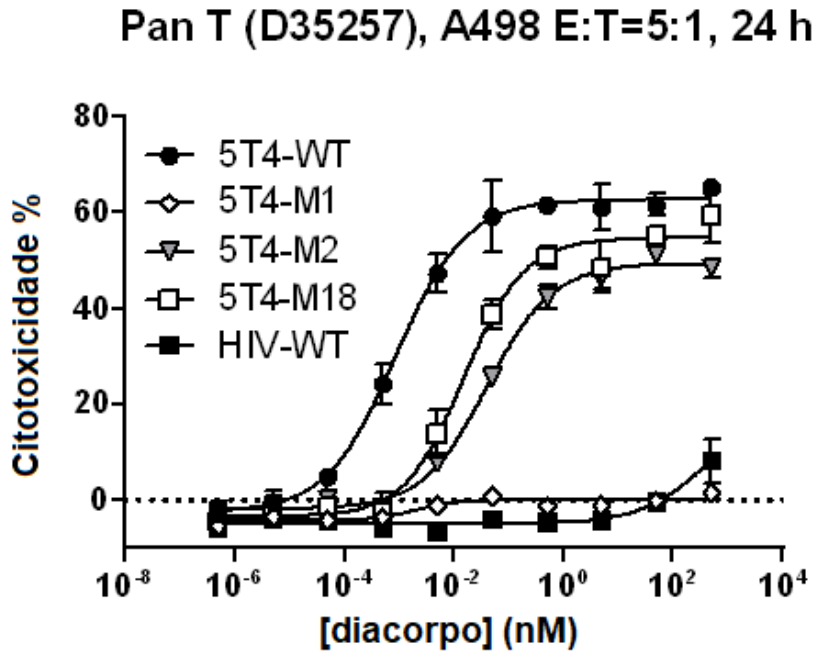


Figura 13A

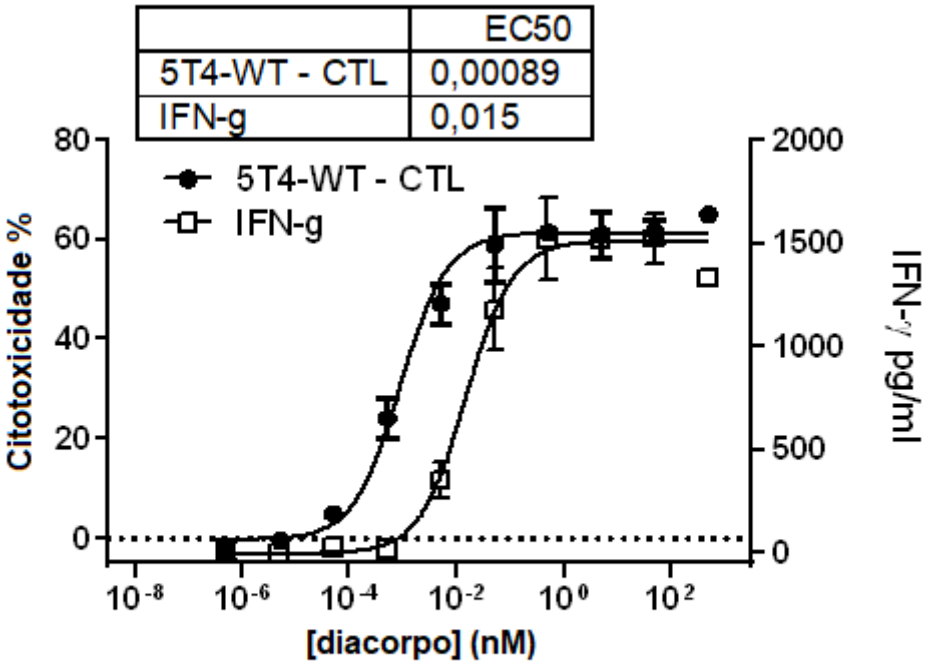


Figura 13B

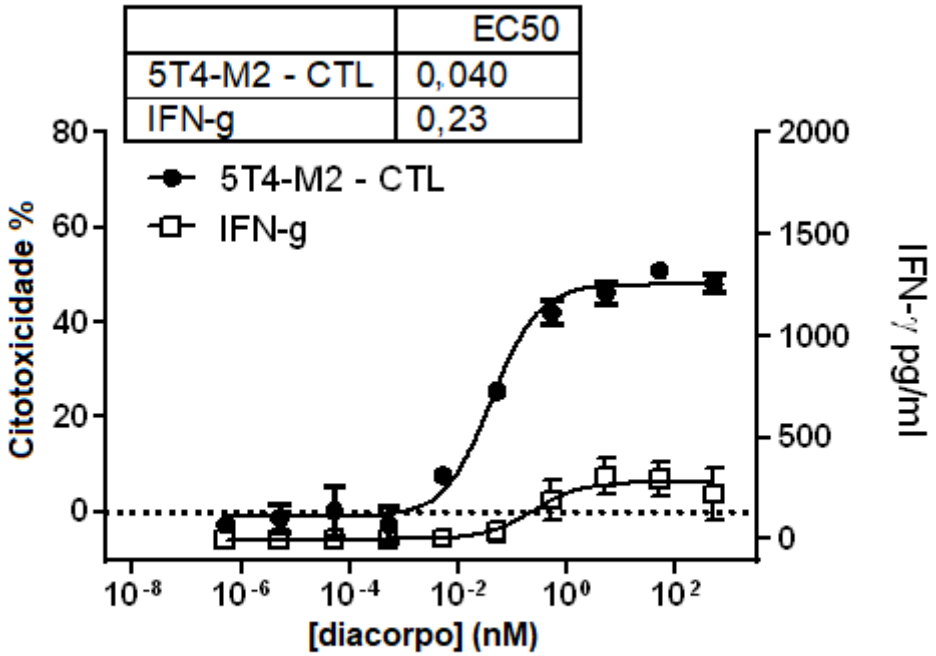


Figura 13C

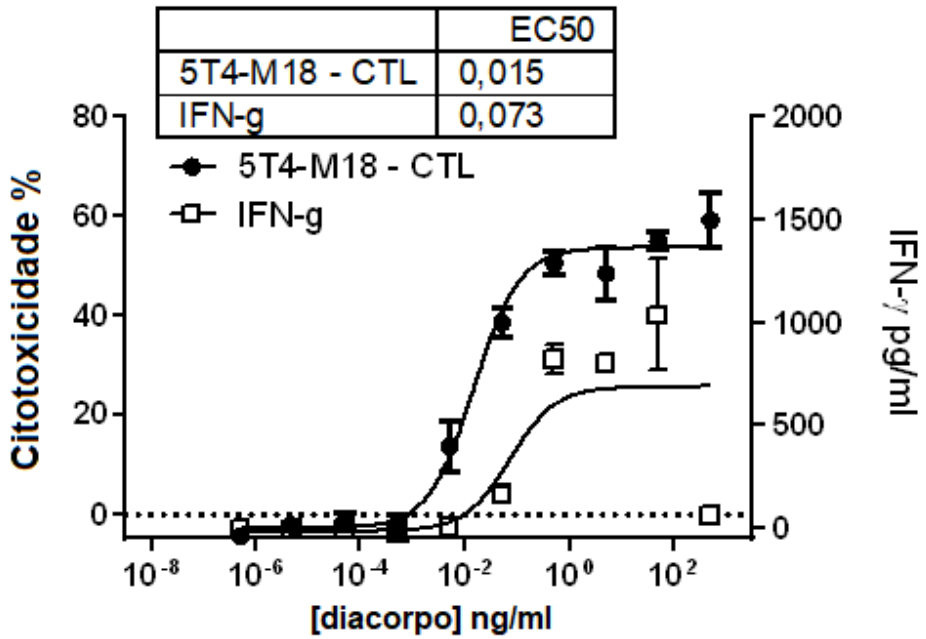


Figura 13D

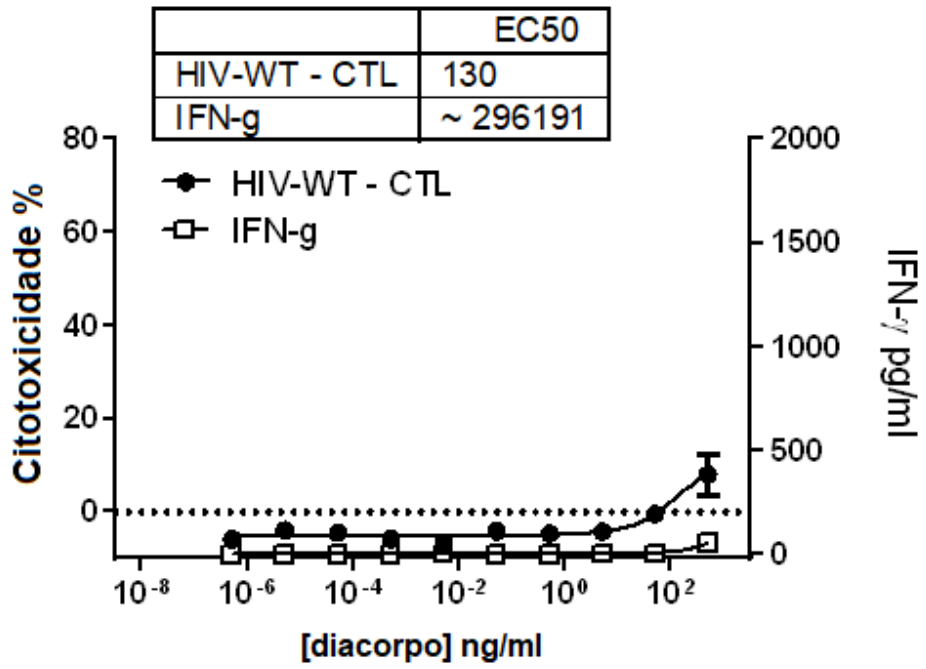


Figura 13E

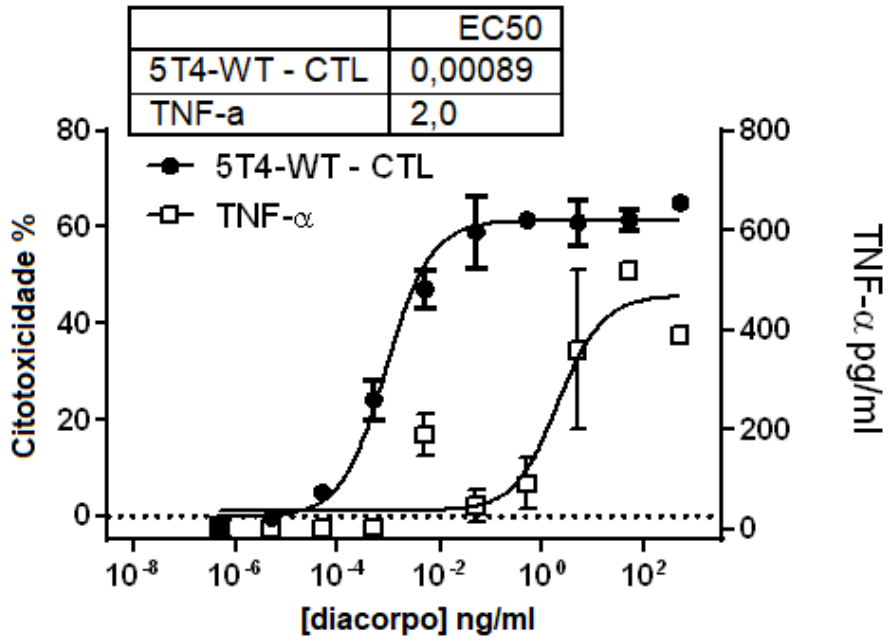


Figura 13F

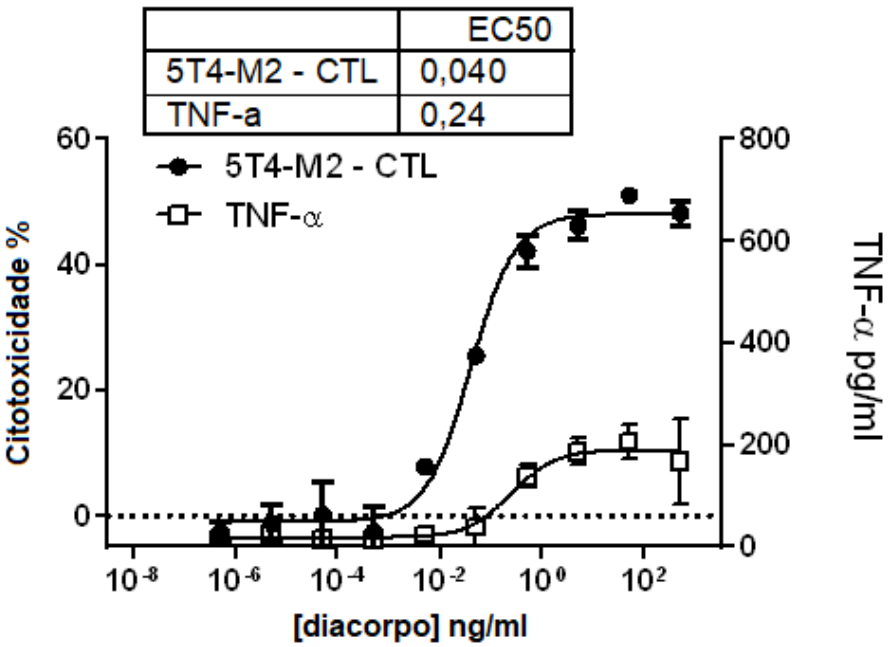


Figura 13G

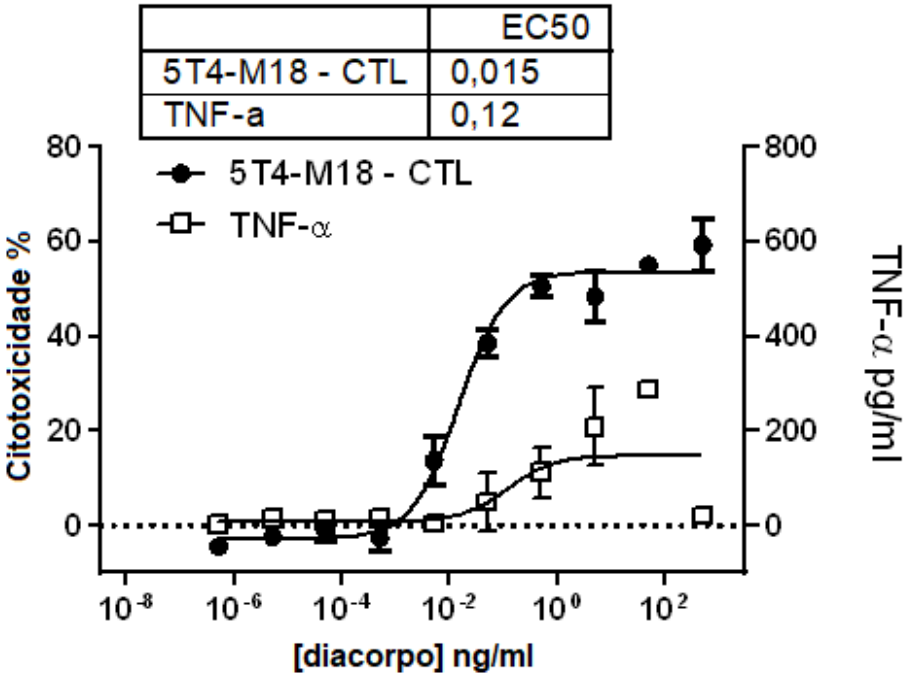


Figura 13H

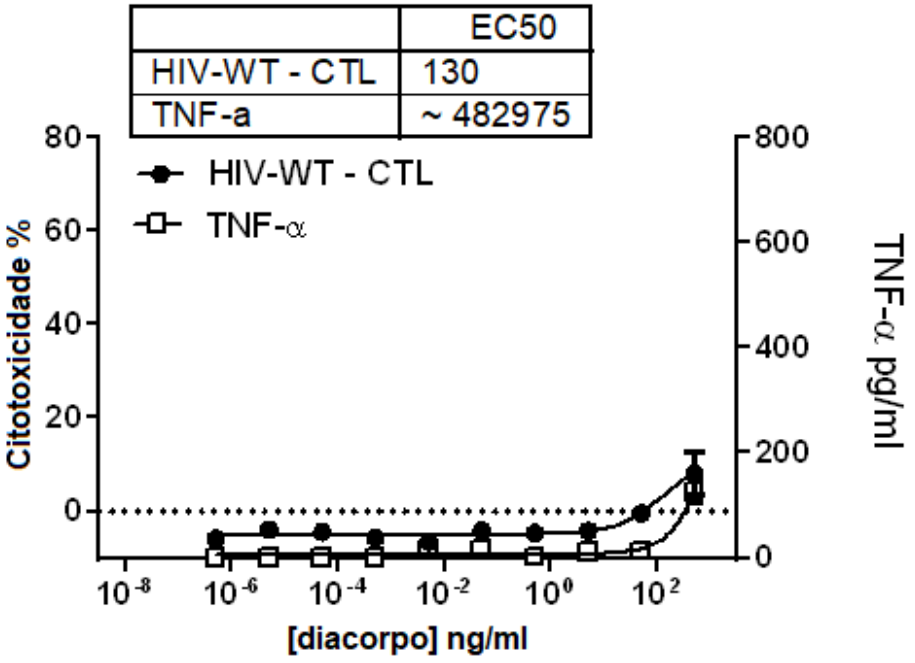


Figura 13I

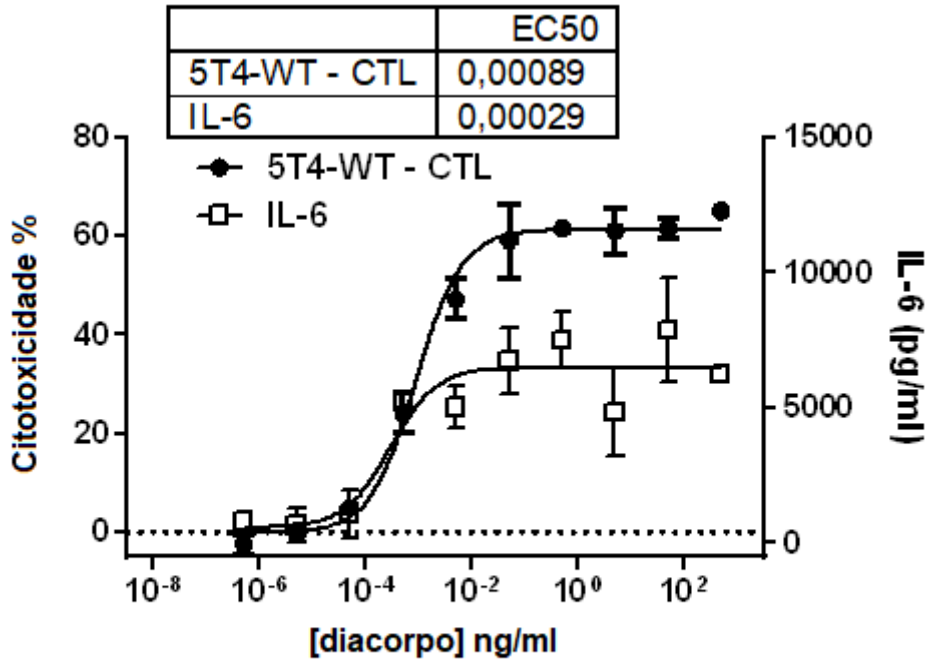


Figura 13J

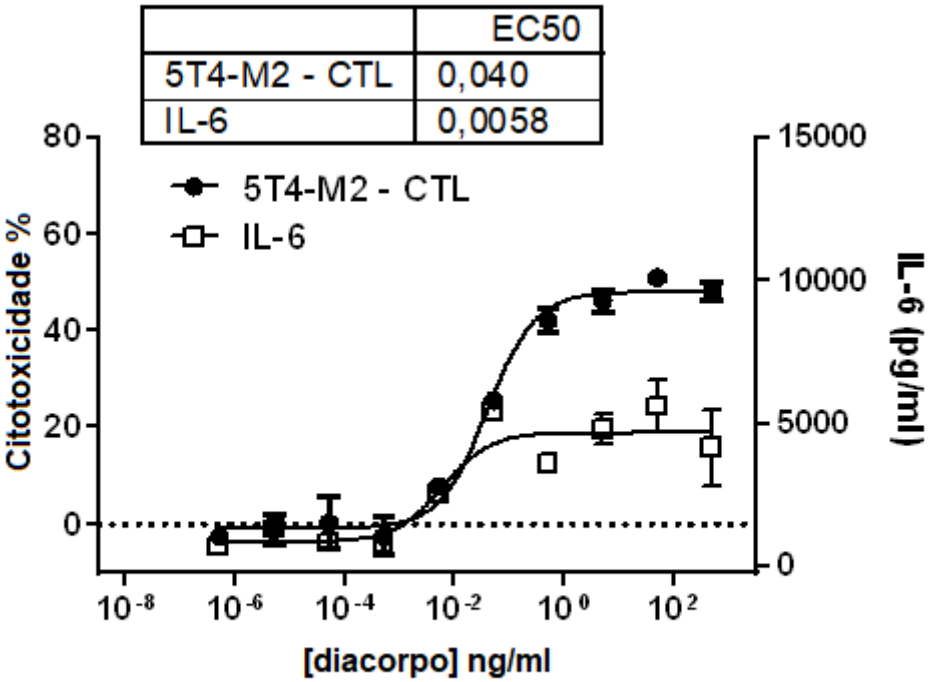


Figura 13K

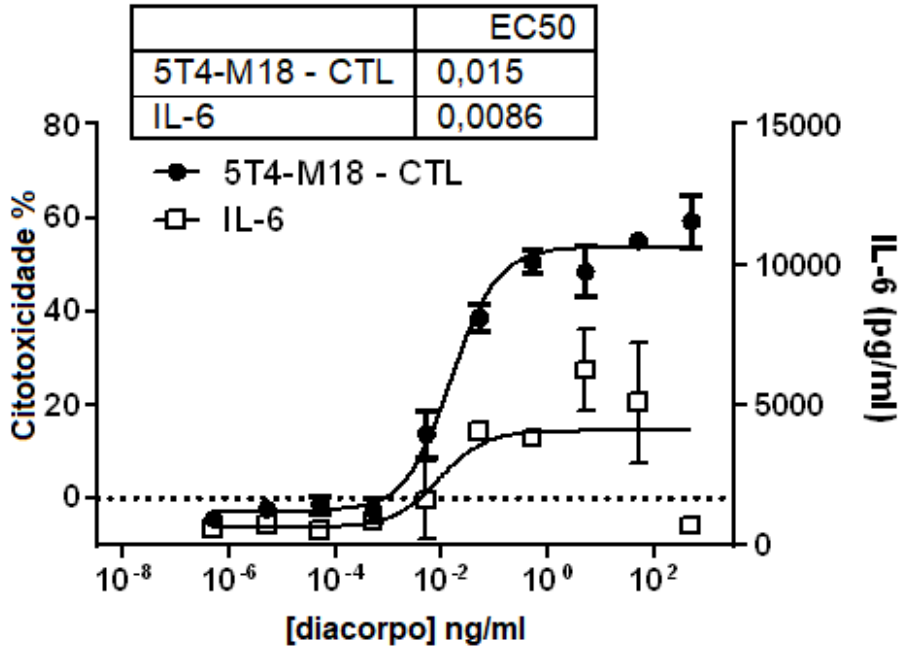


Figura 13L

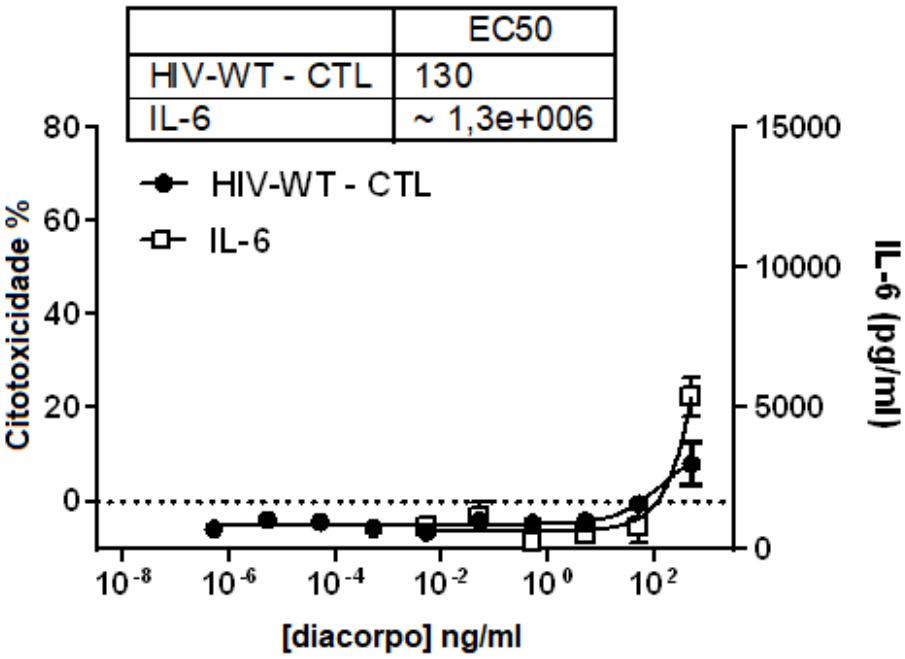


Figura 13M

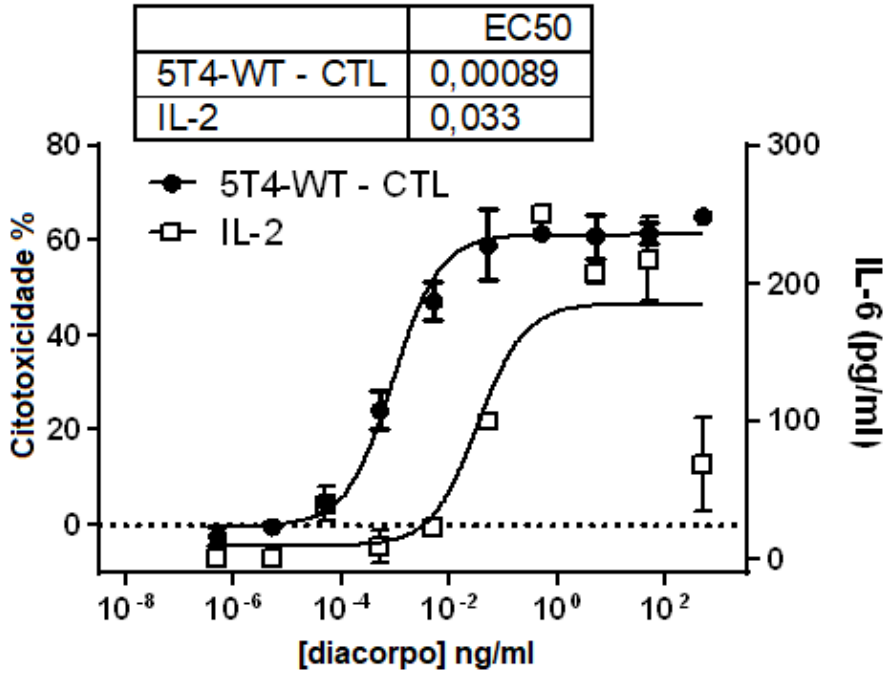


Figura 13N

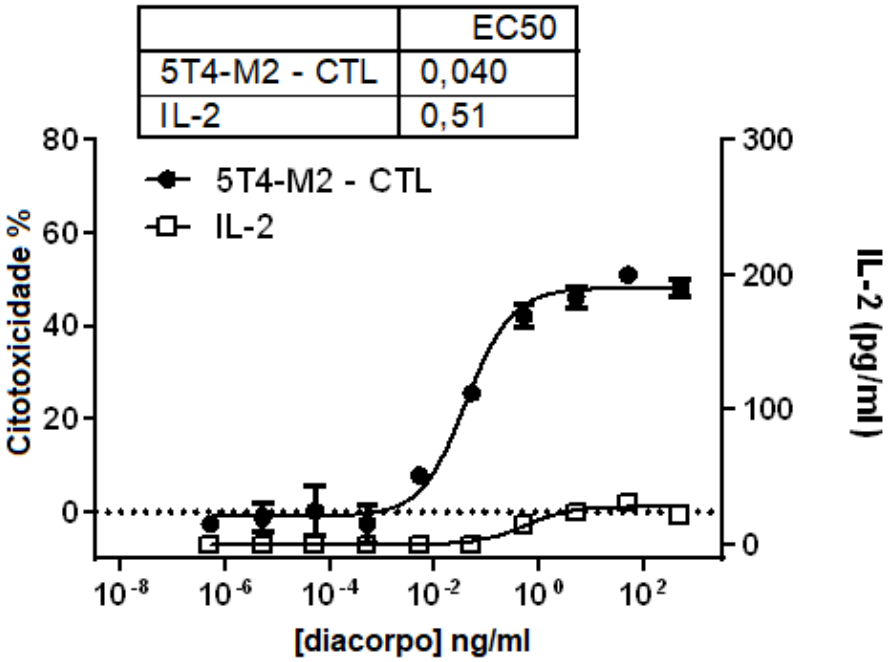


Figura 13O

	EC50
5T4-M18 - CTL	0,015
IL-2	0,24

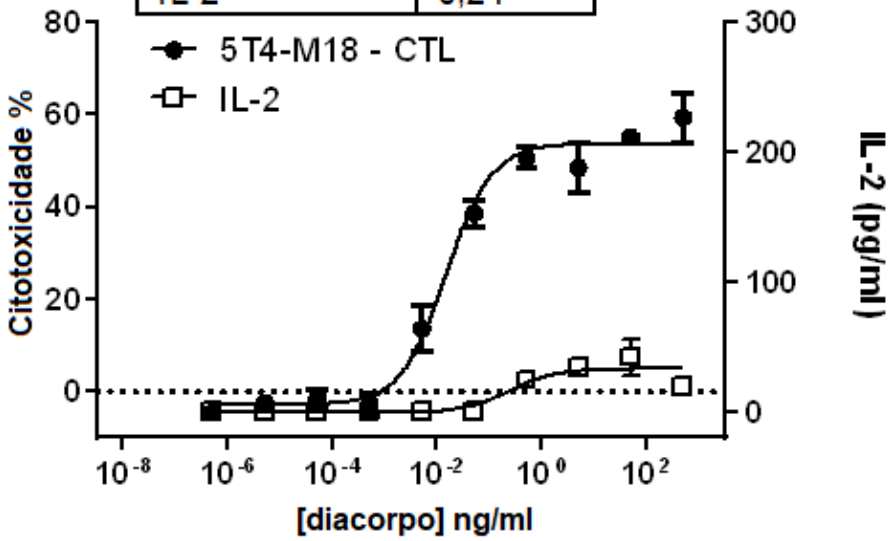


Figura 13P

	EC50
HIV-WT - CTL	130
IL-2	~ 1,6

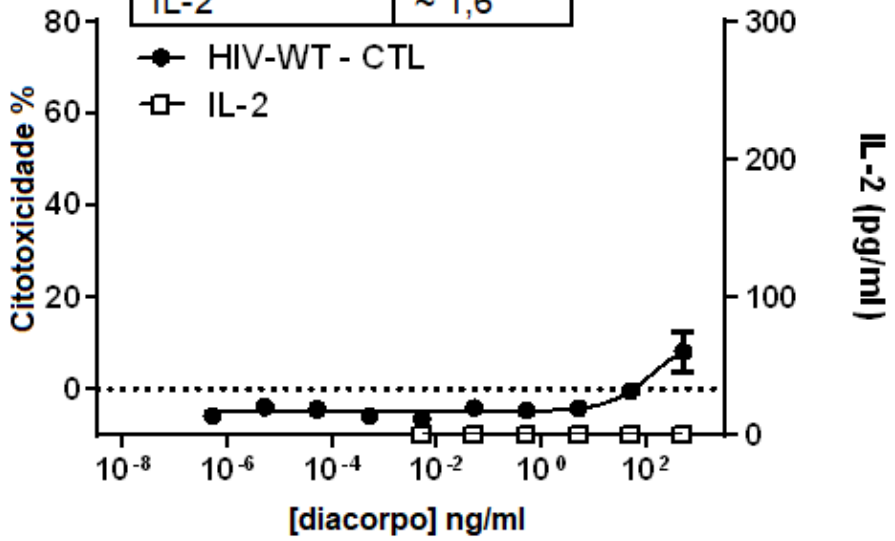


Figura 13Q

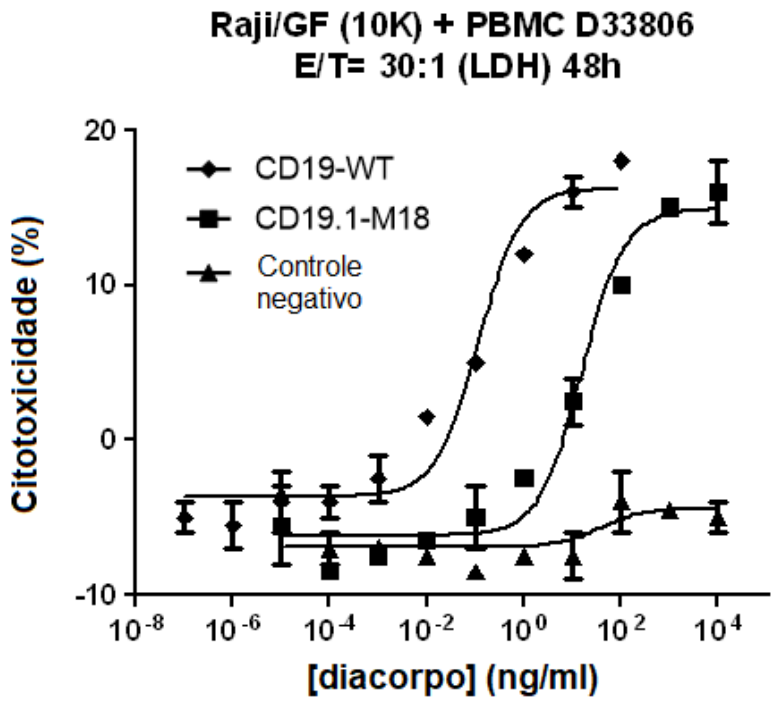


Figura 14A

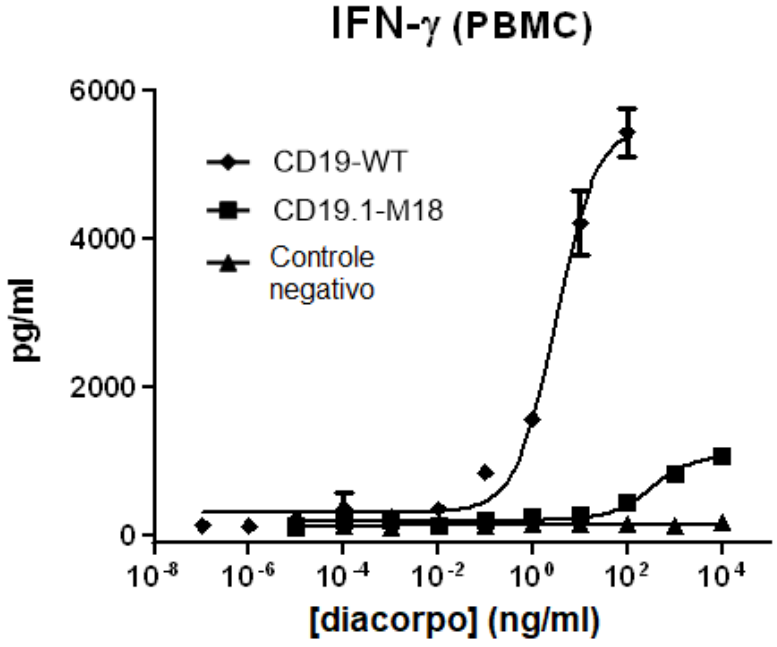


Figura 14B

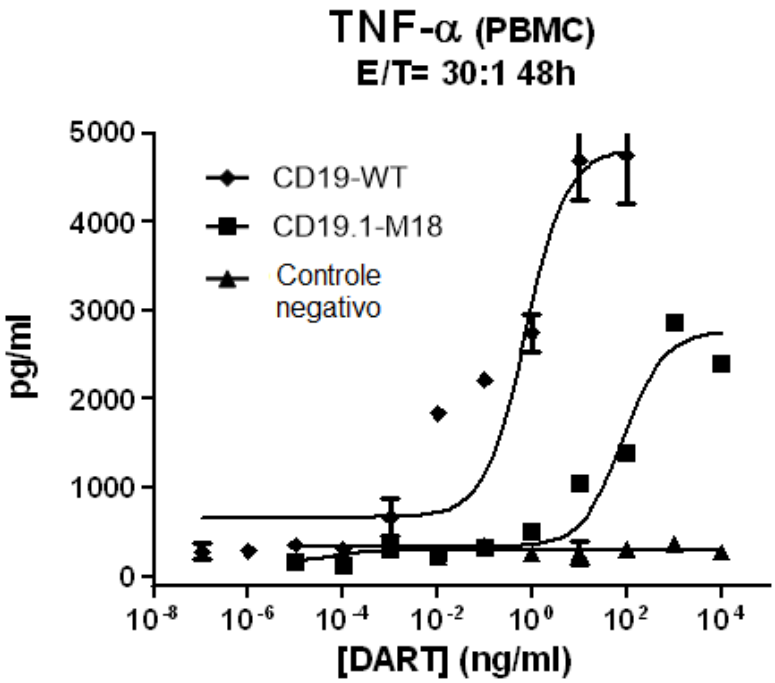
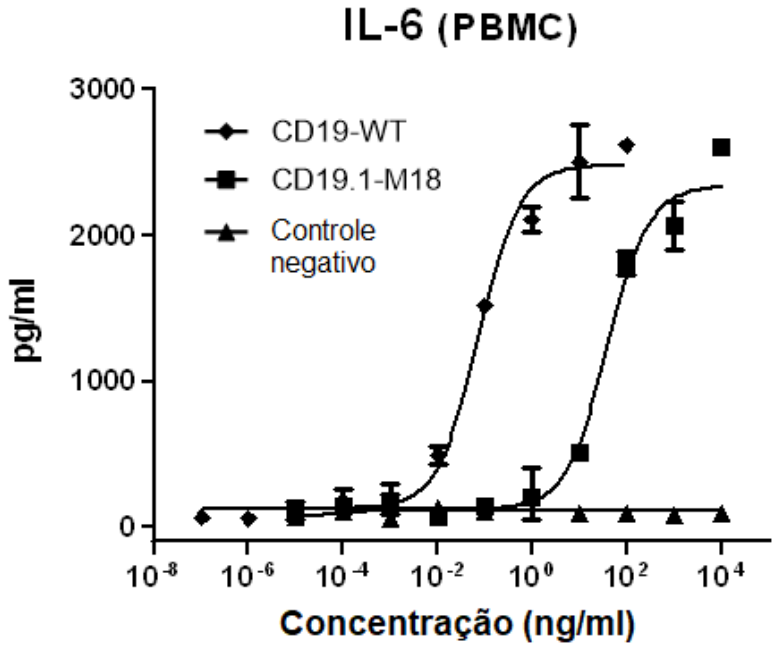


Figura 14C



p

FIGURA 14D

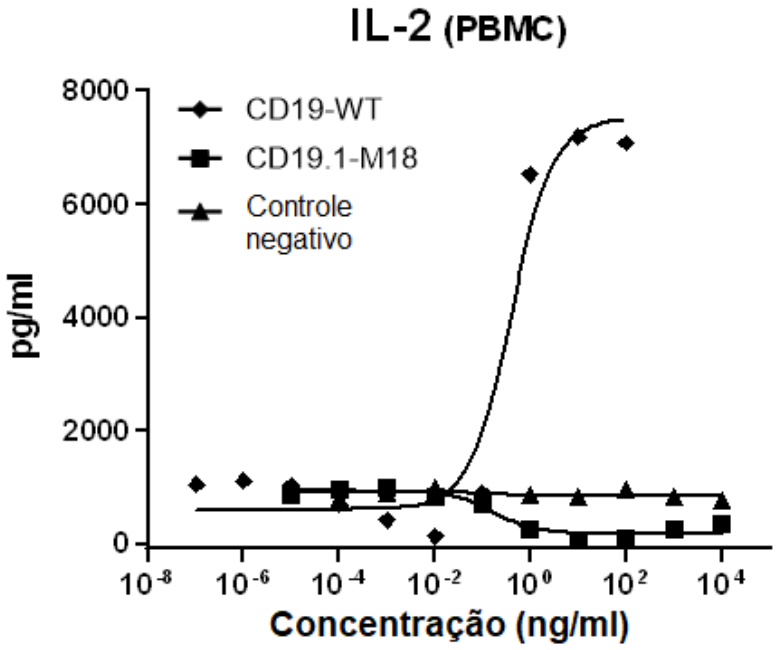


Figura 14E

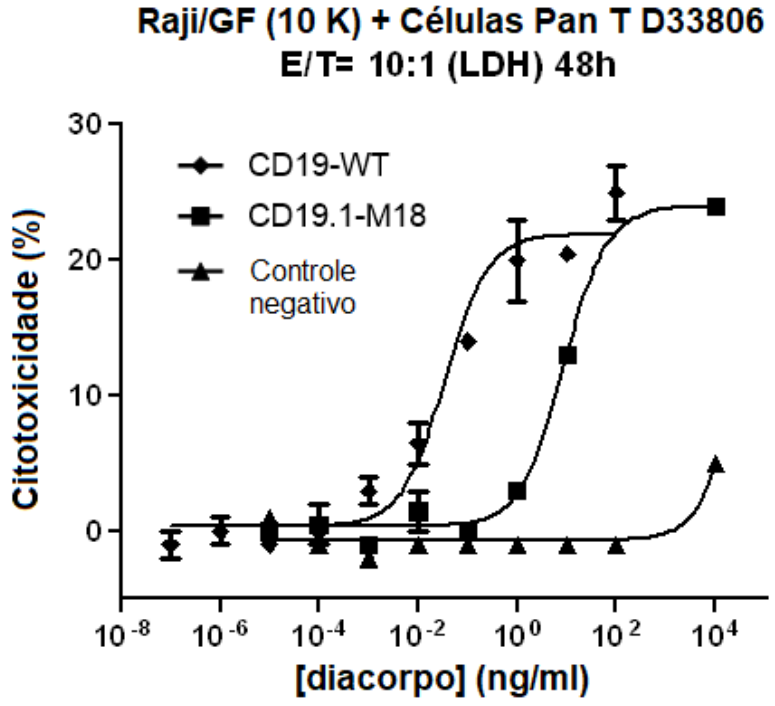


Figura 14F

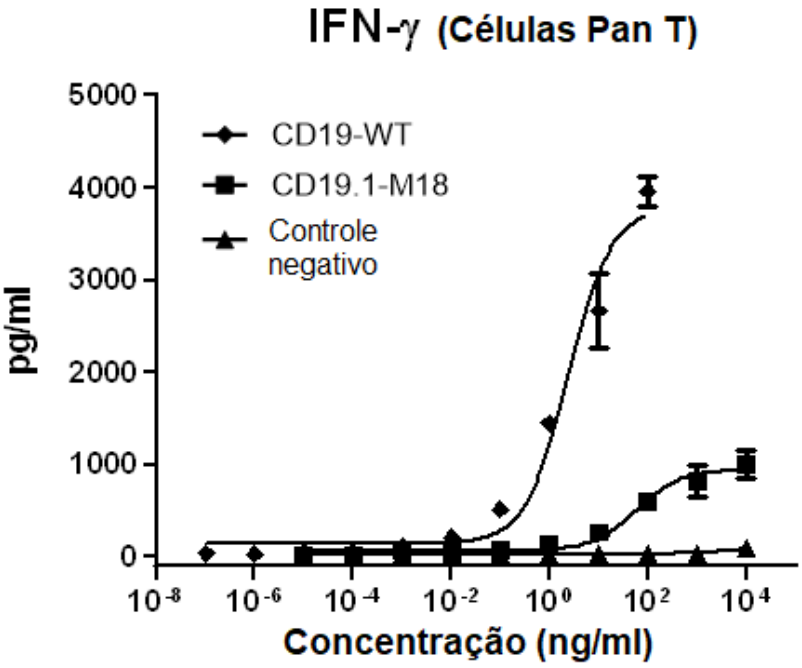


Figura 14G

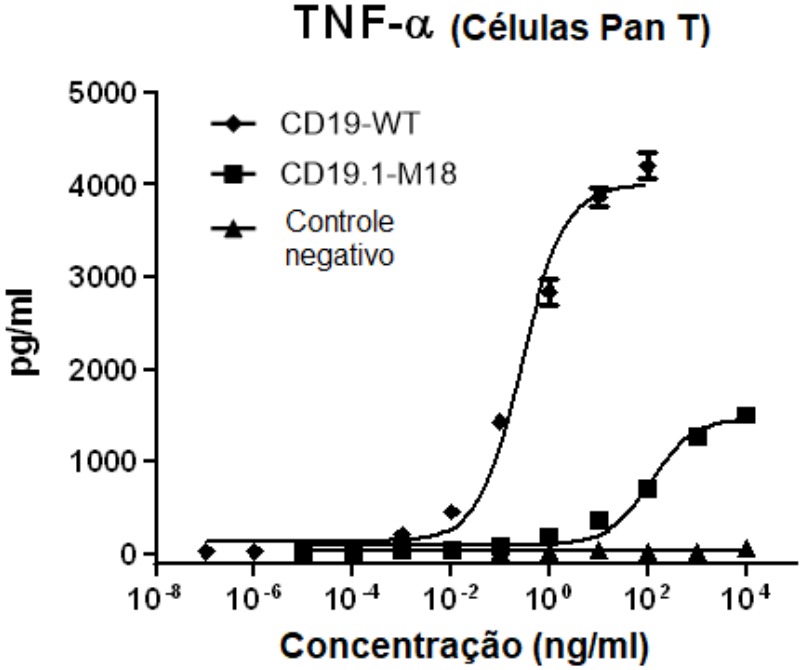


Figura 14H

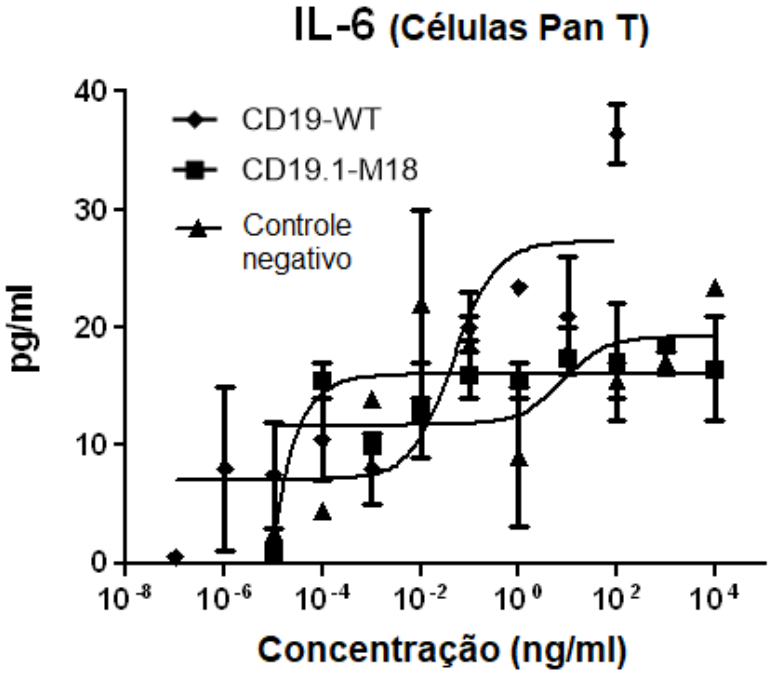


Figura 14I

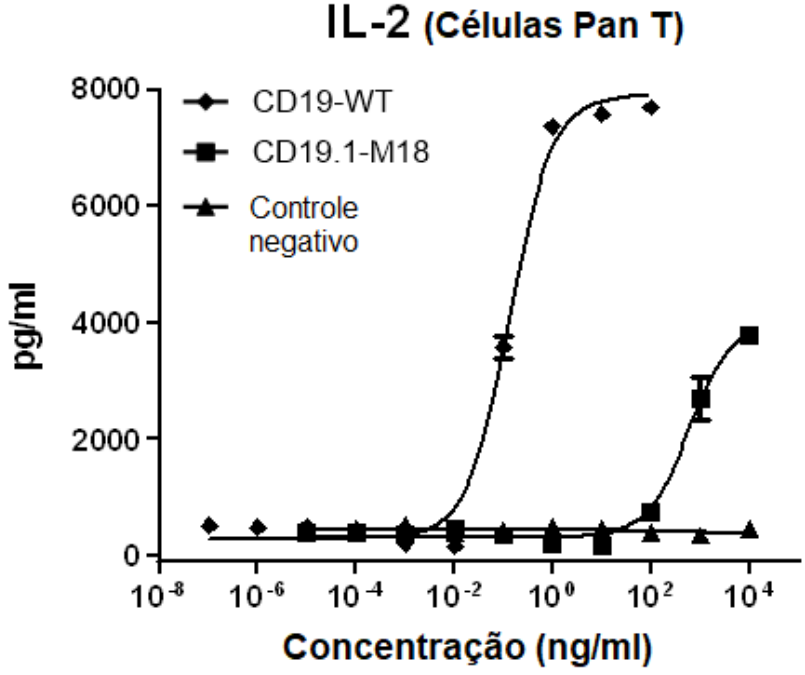


Figura 14J

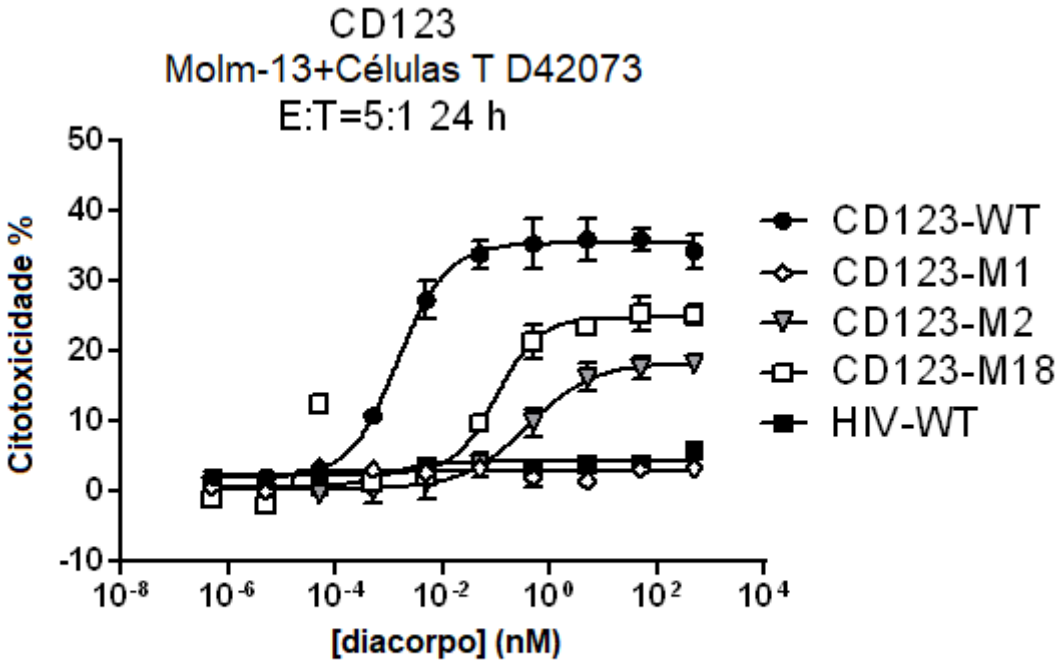


Figura 15A

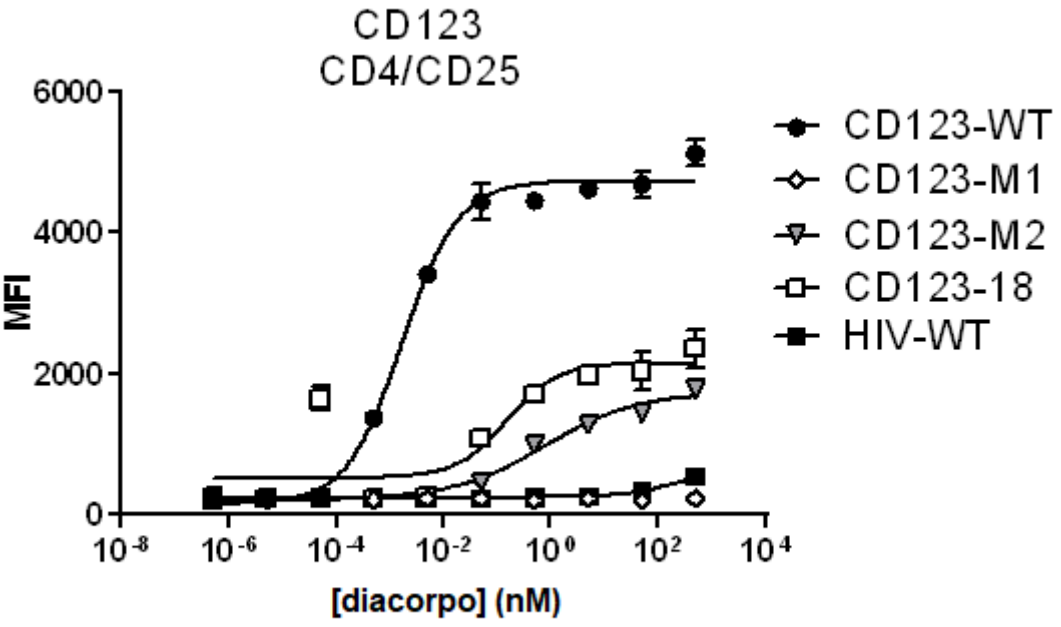


Figura 15B

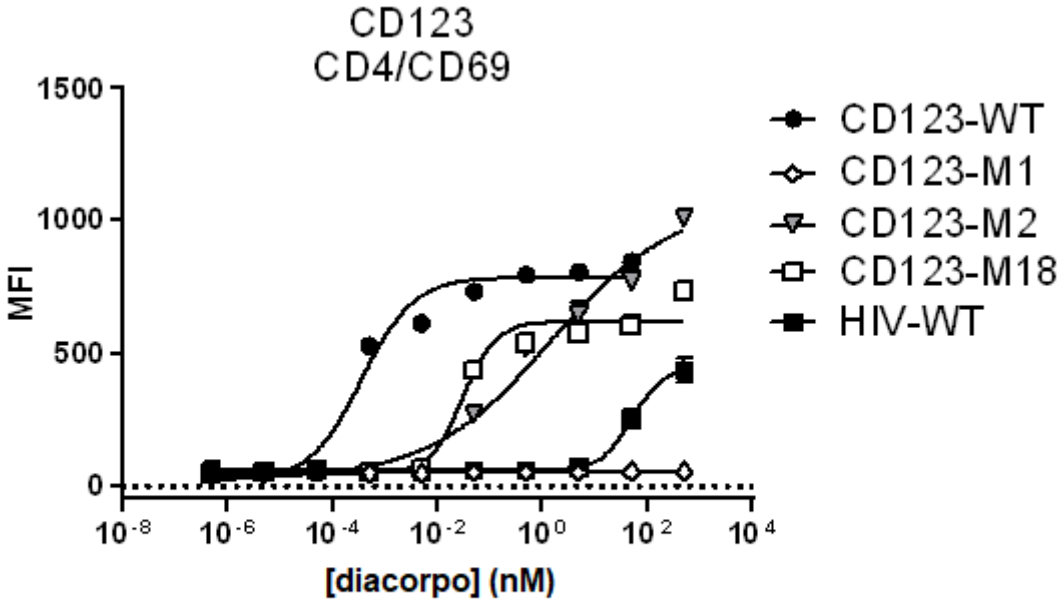


Figura 15C

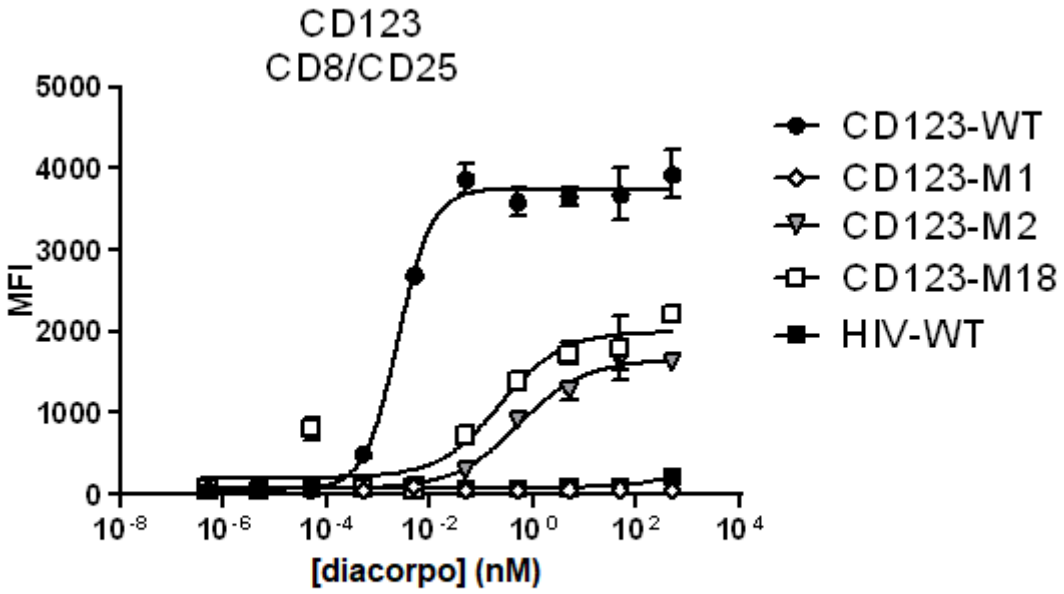


Figura 15D

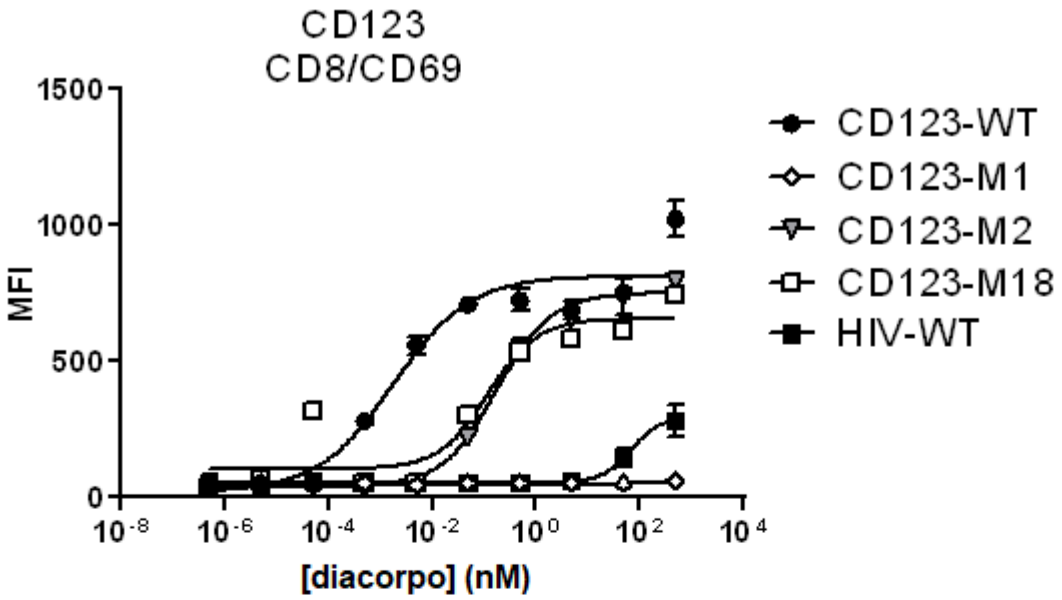


Figura 15E

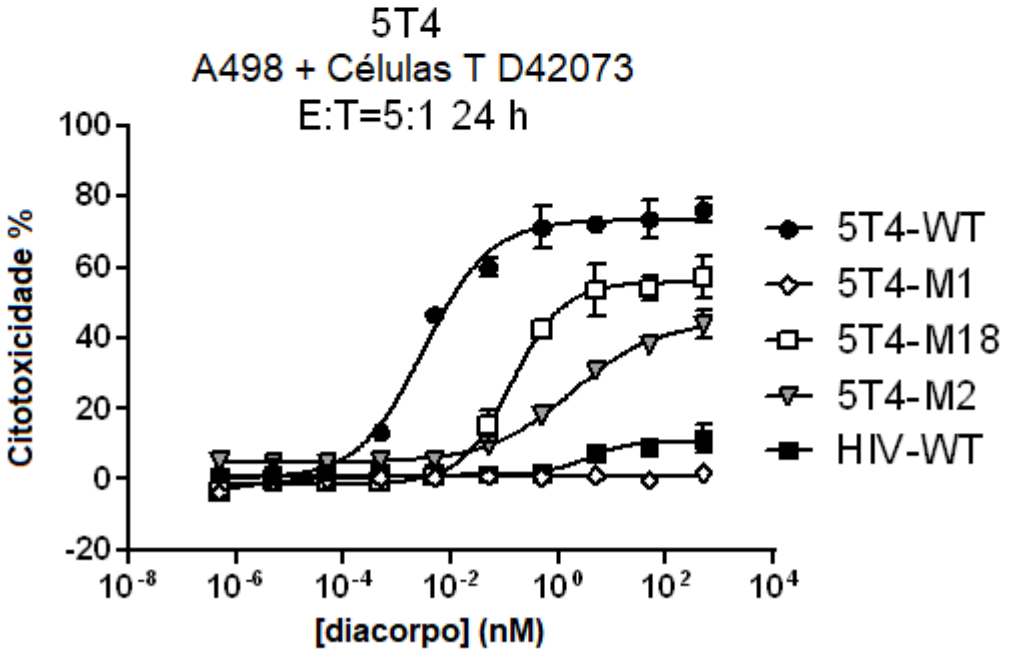


Figura 16A

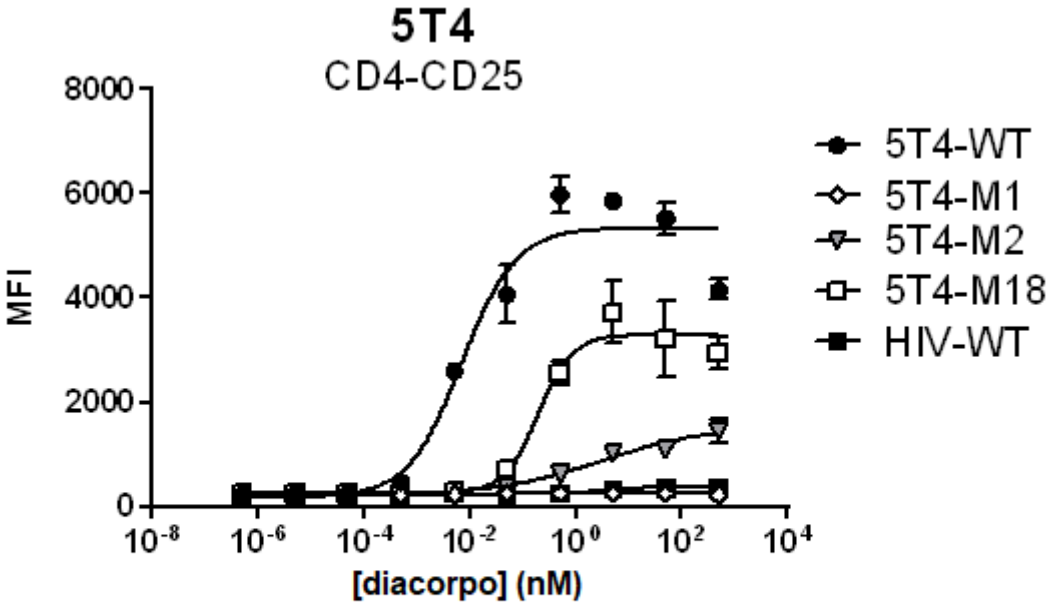


Figura 16B

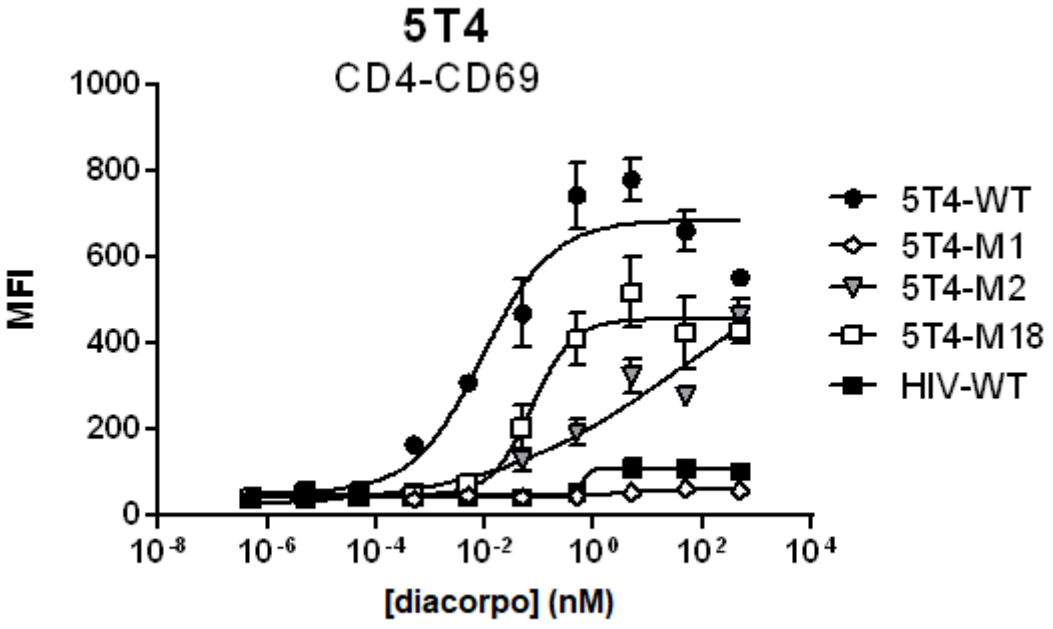


Figura 16C

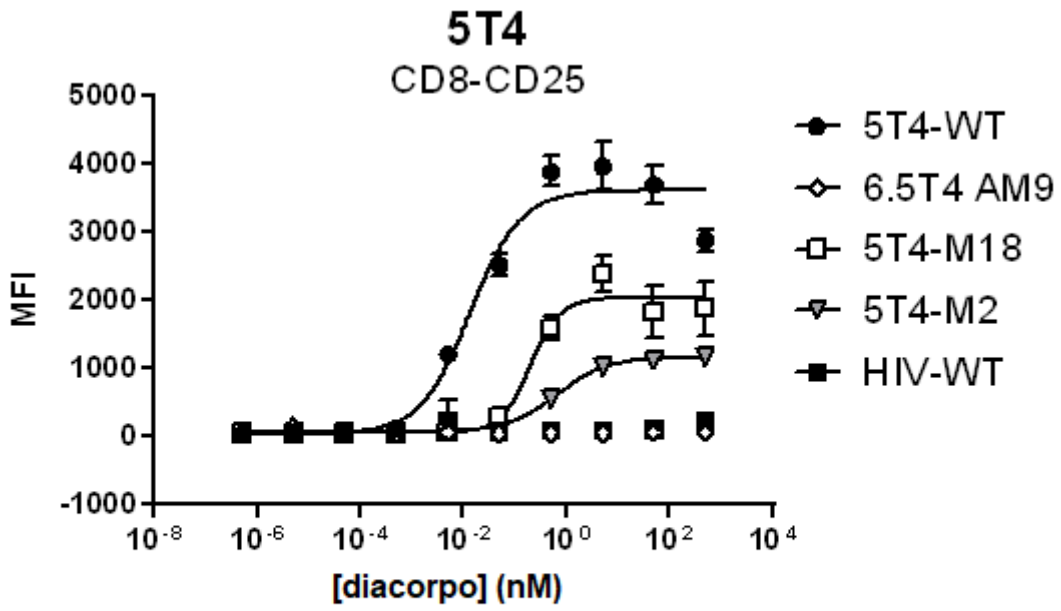


Figura 16D

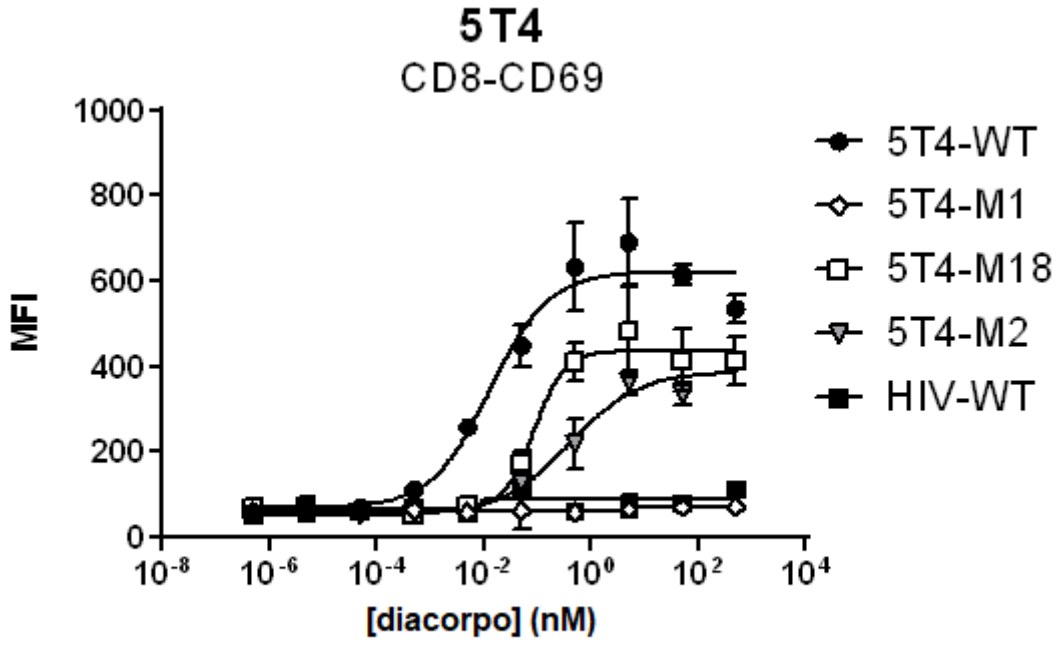


Figura 16E

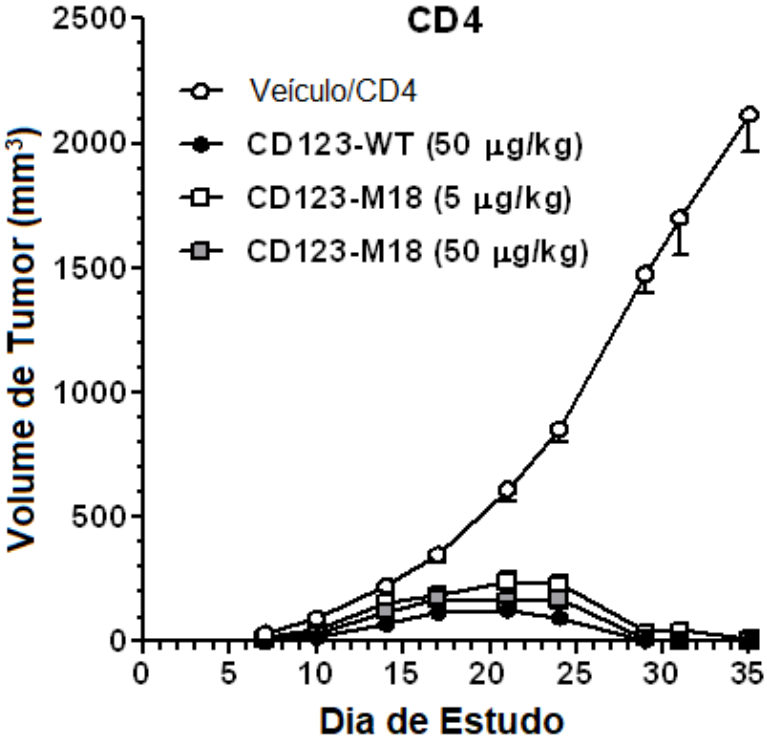


Figura 17A

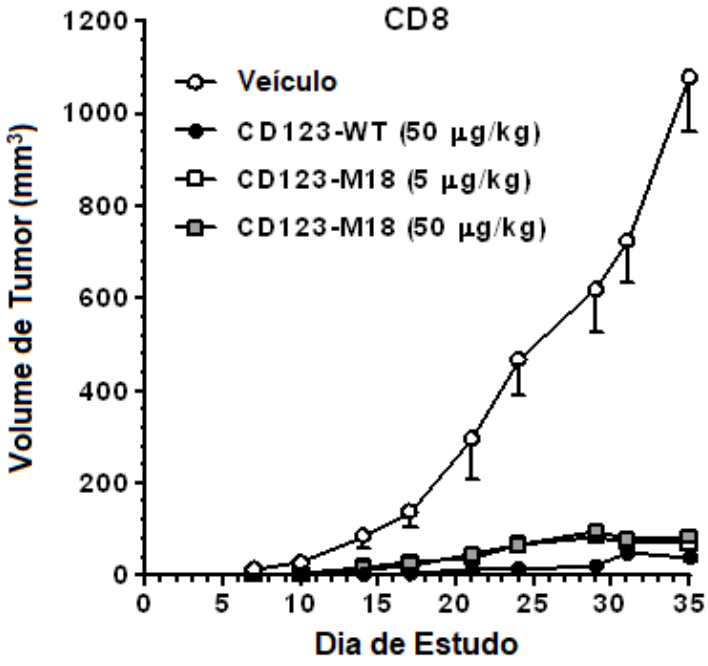


Figura 17B

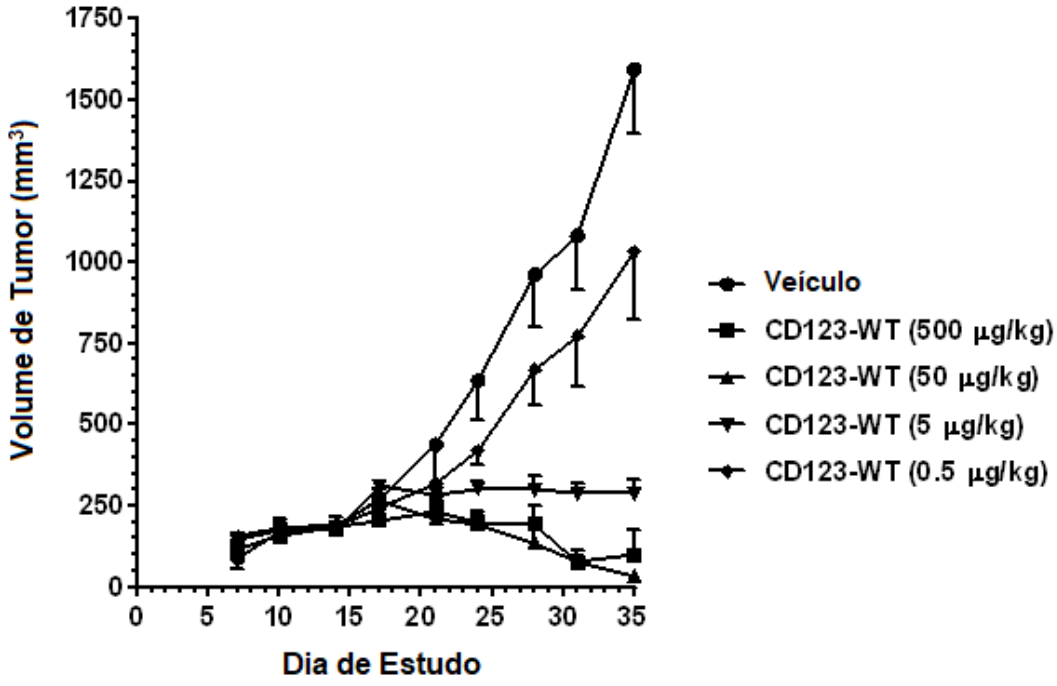


Figura 18A

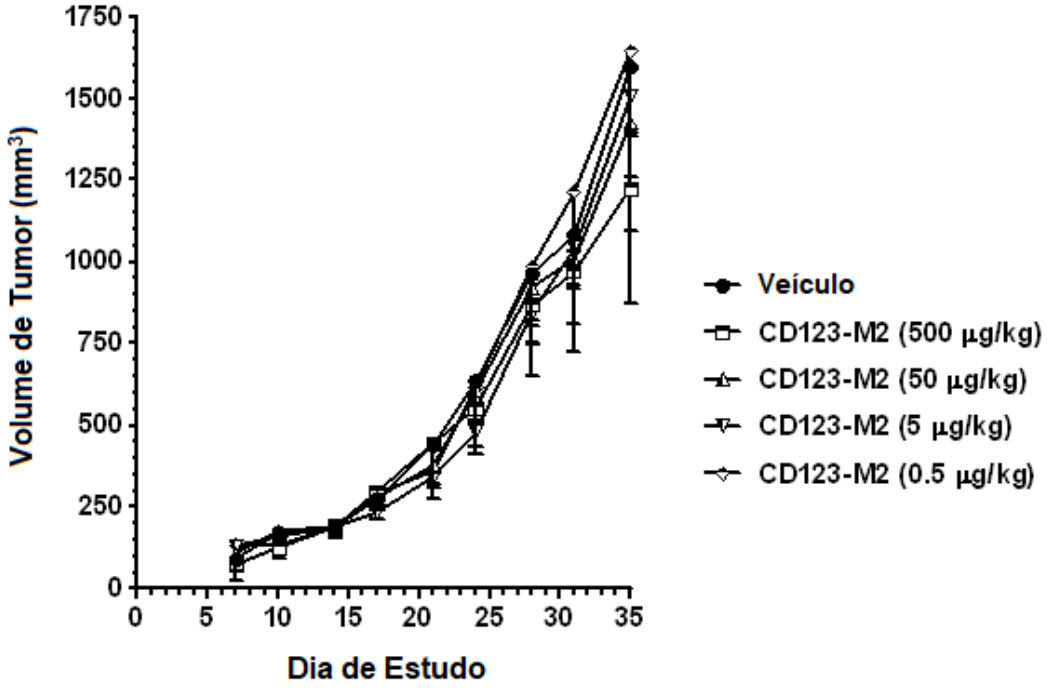


Figura 18B

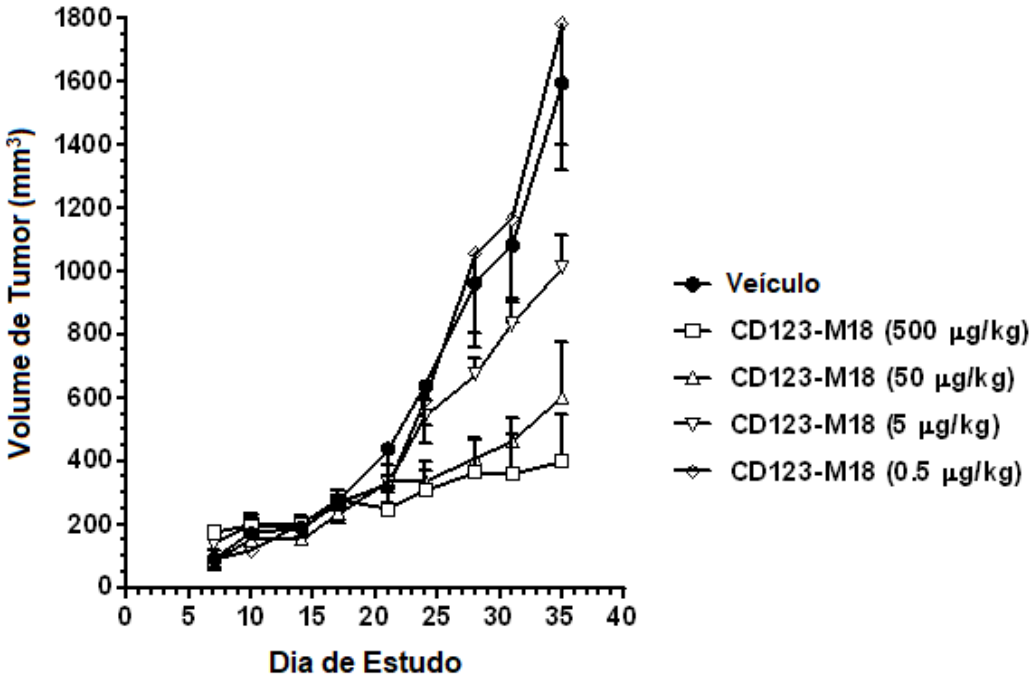


Figura 18C

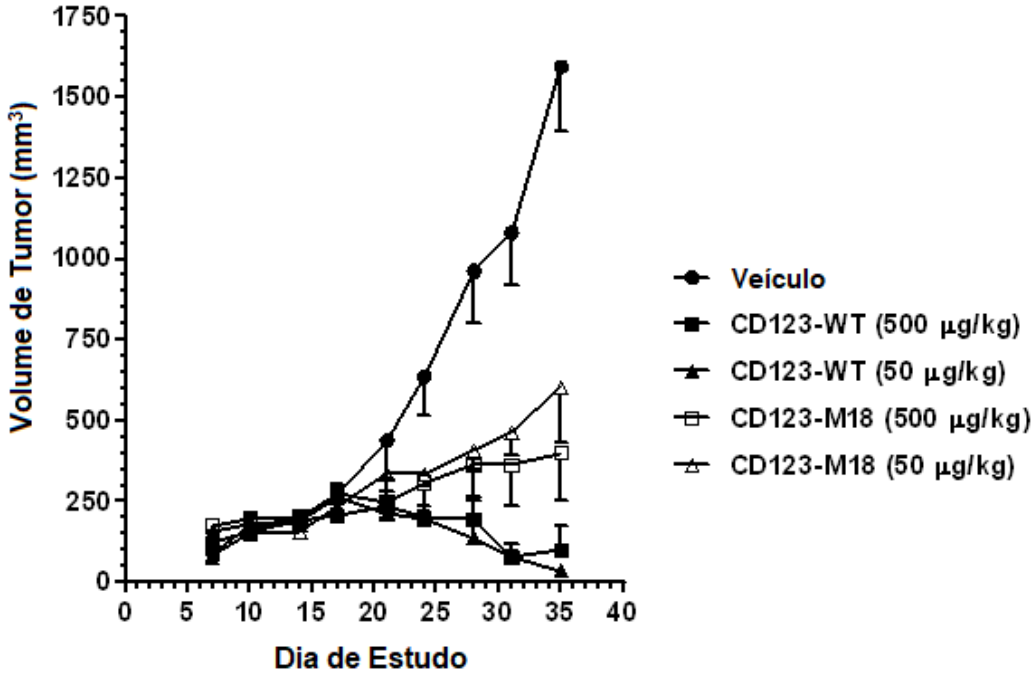


Figura 18D

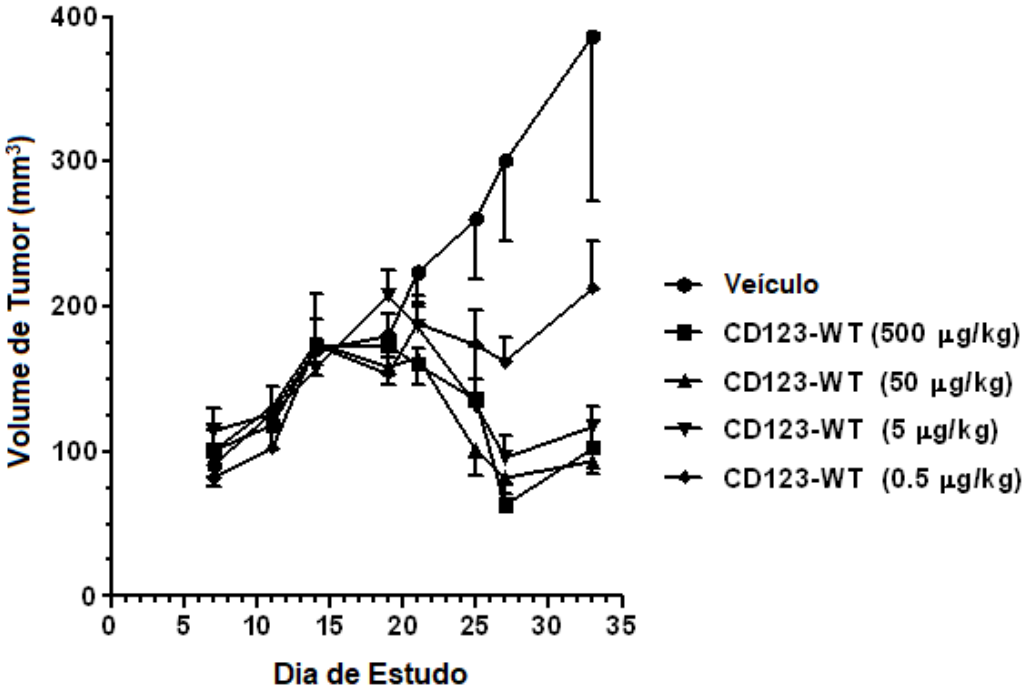


Figura 19A

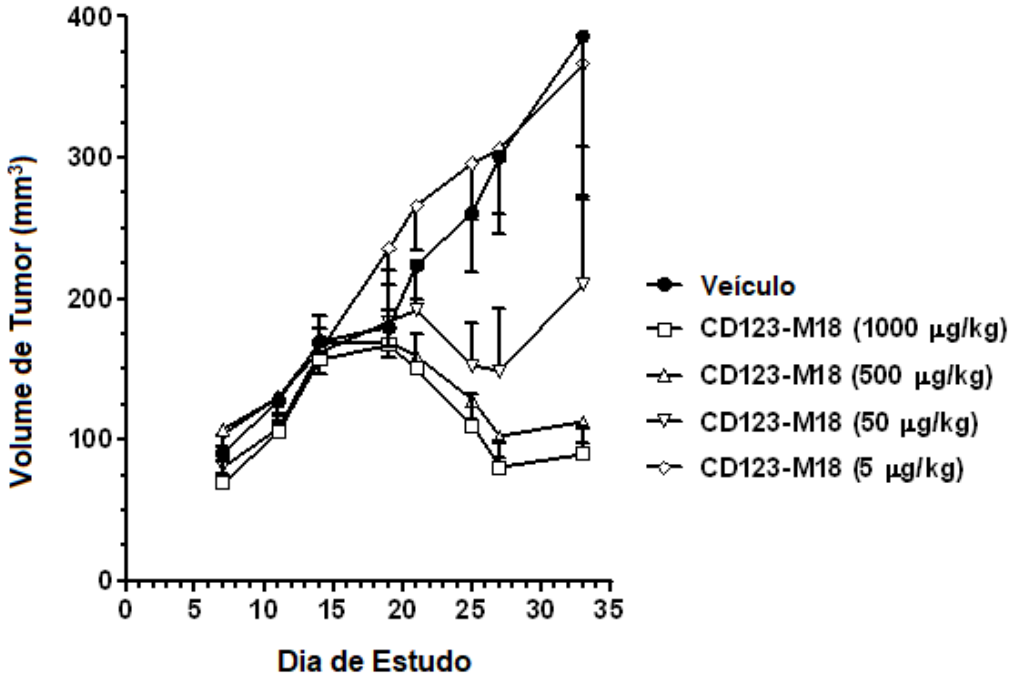


Figura 19B

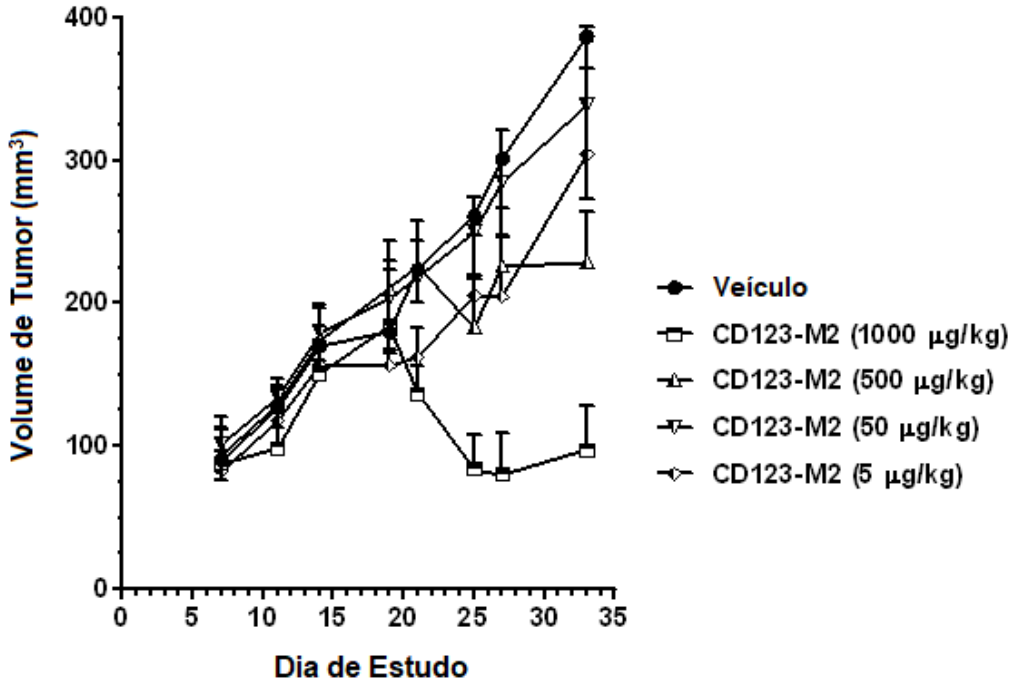


Figura 19C

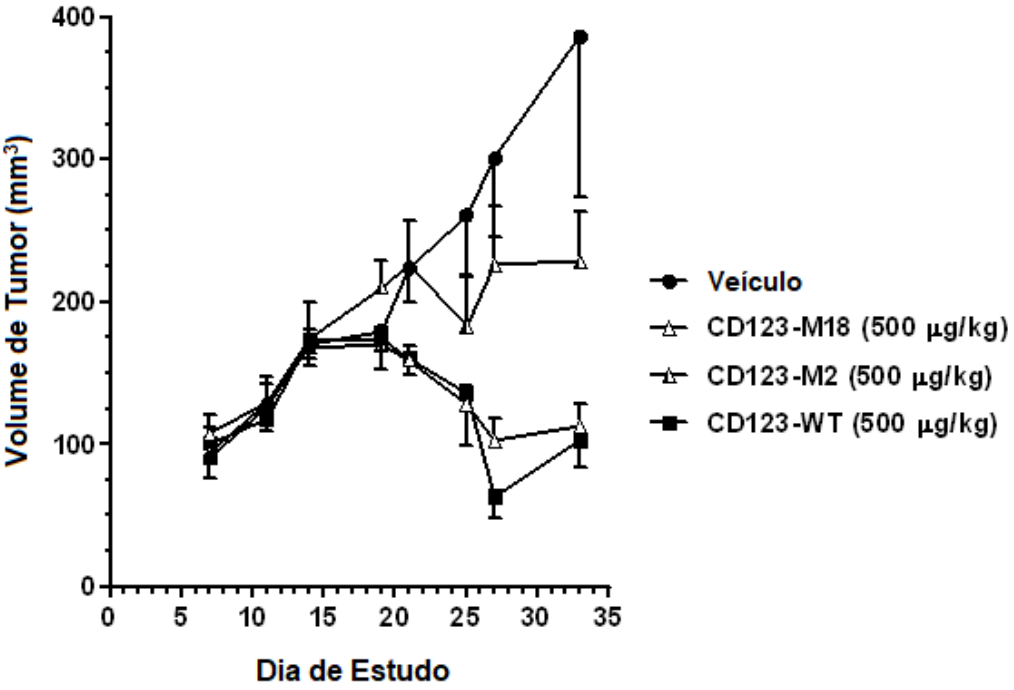


Figura 19D

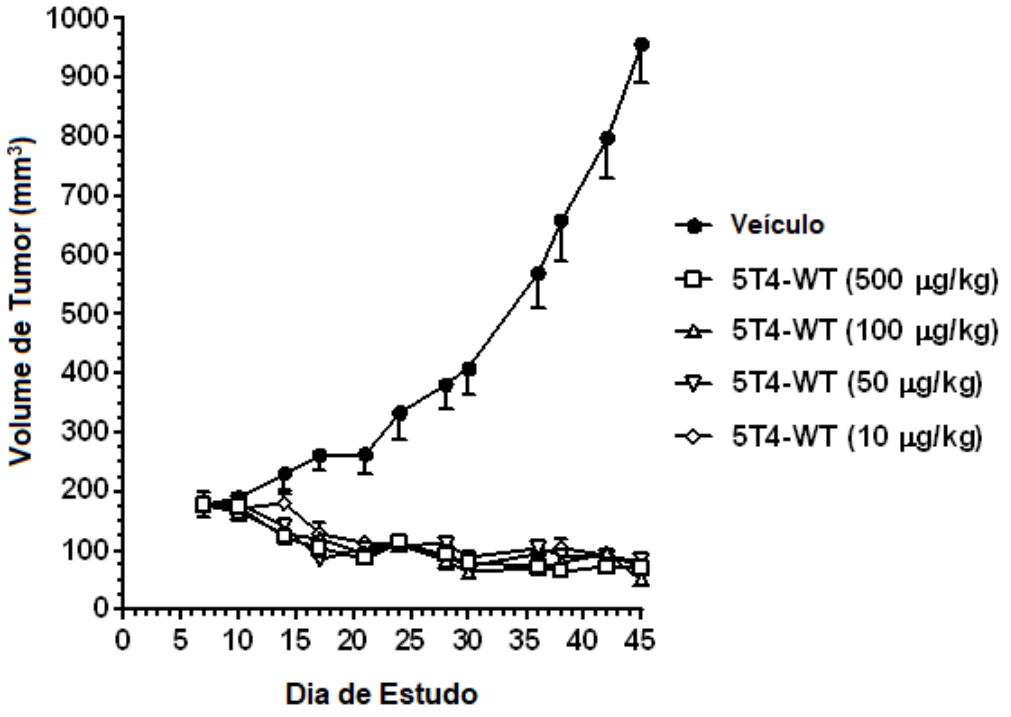


Figura 20A

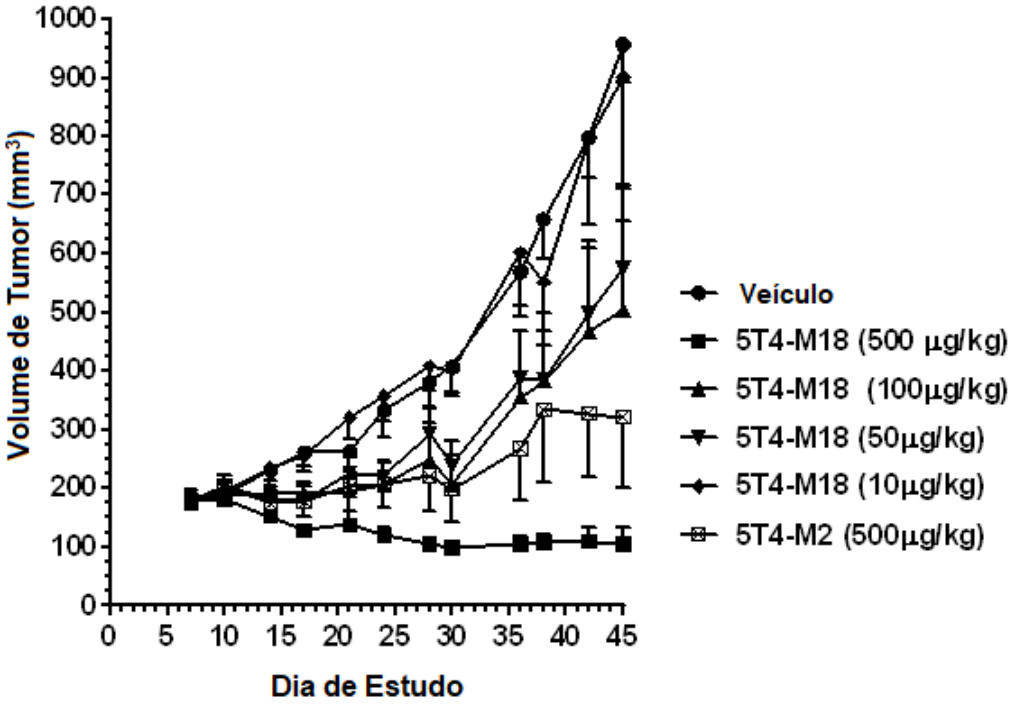


Figura 20B

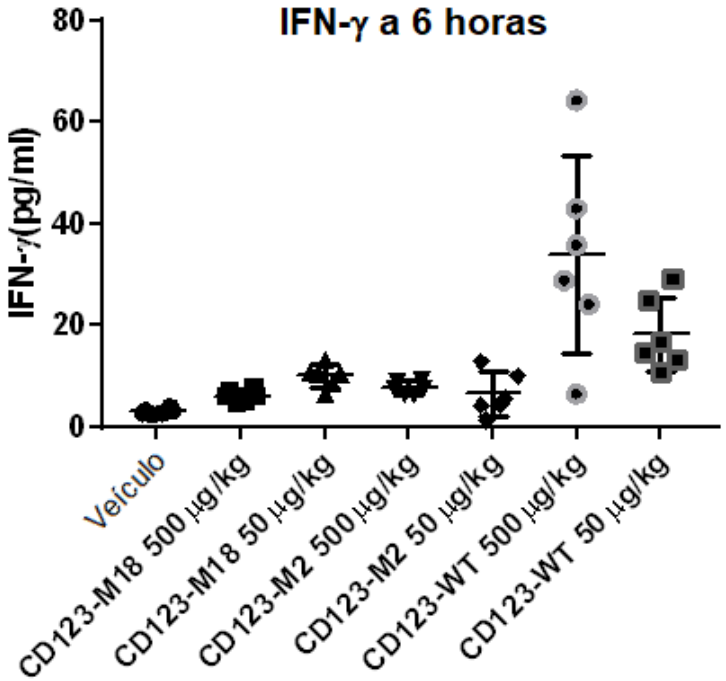


Figura 21A

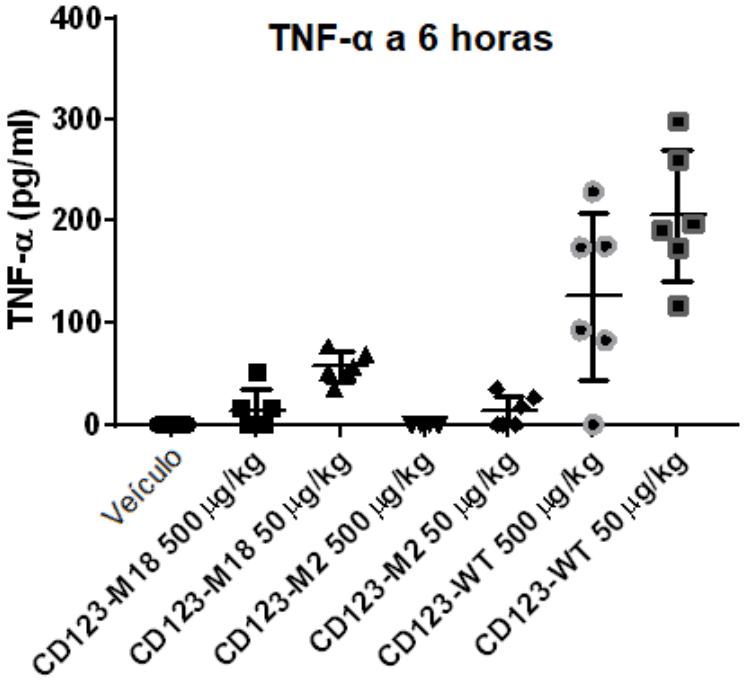


Figura 21B

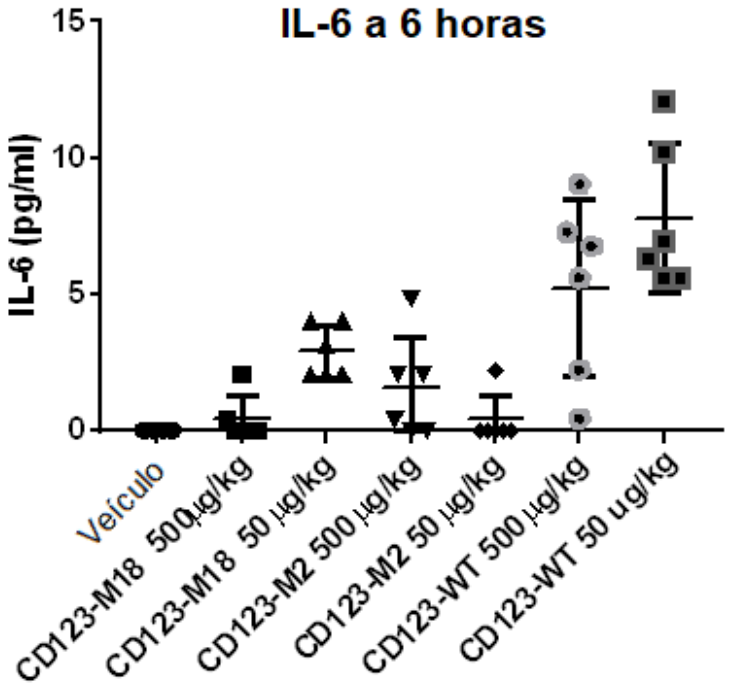


Figura 21C

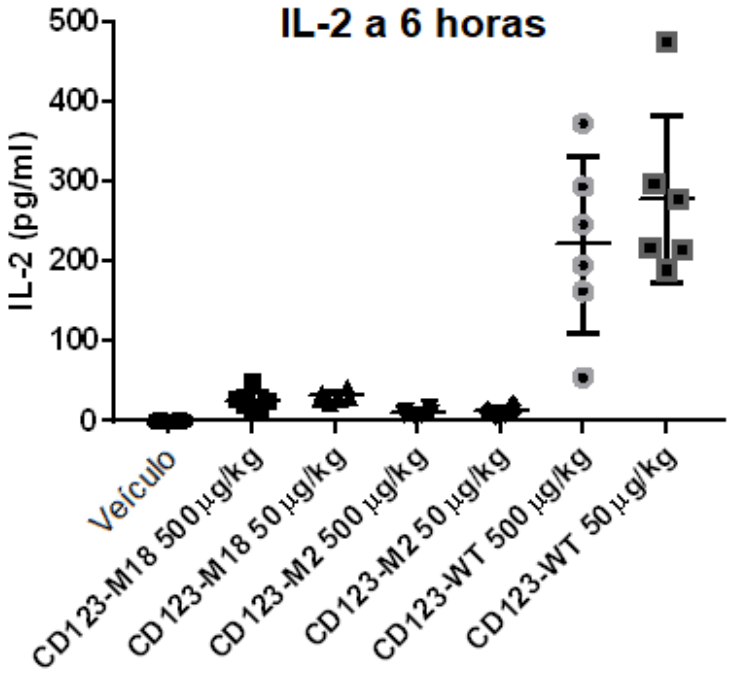


Figura 21D

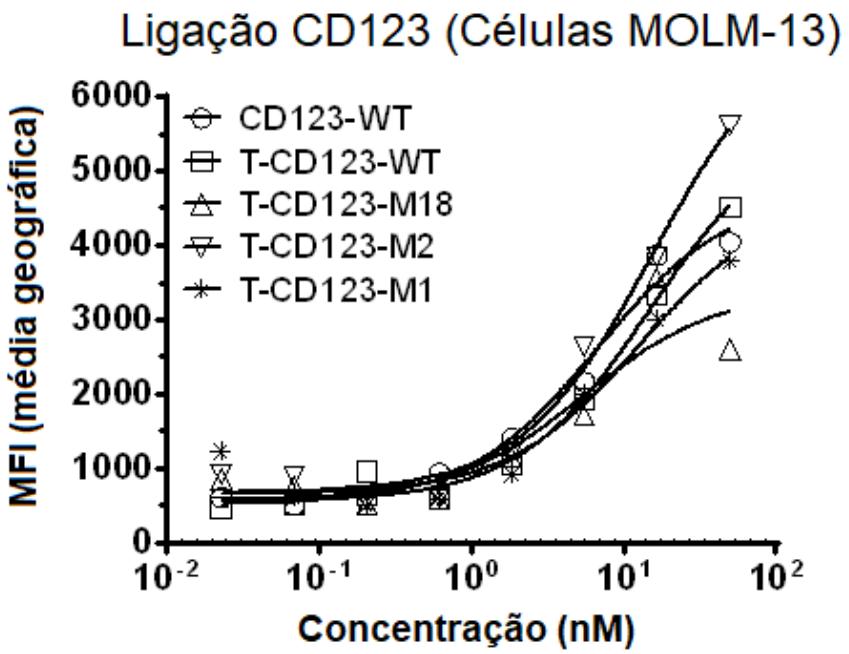


Figura 22A

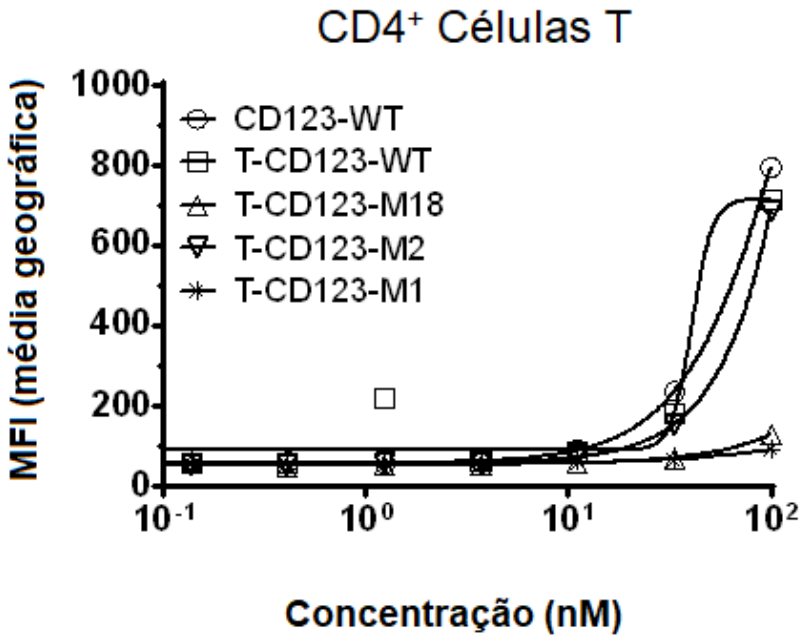


Figura 22B

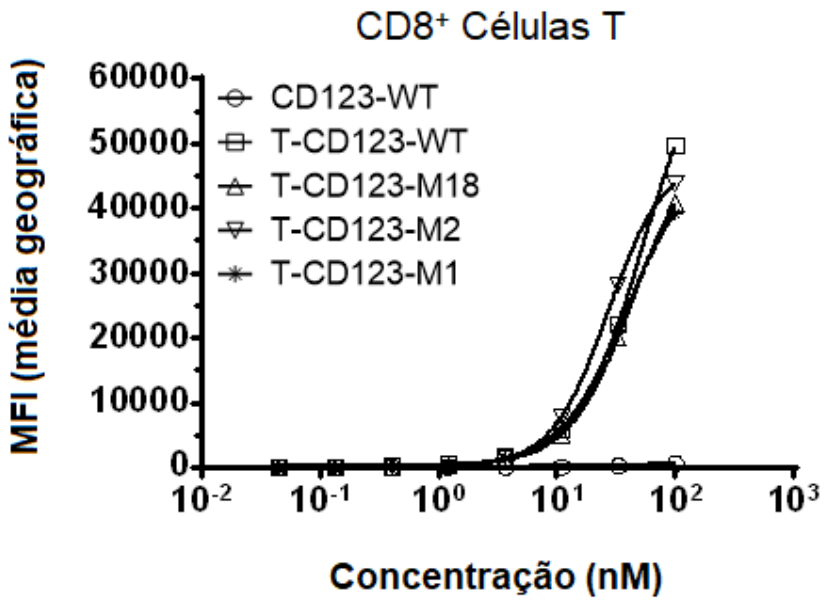


Figura 22C

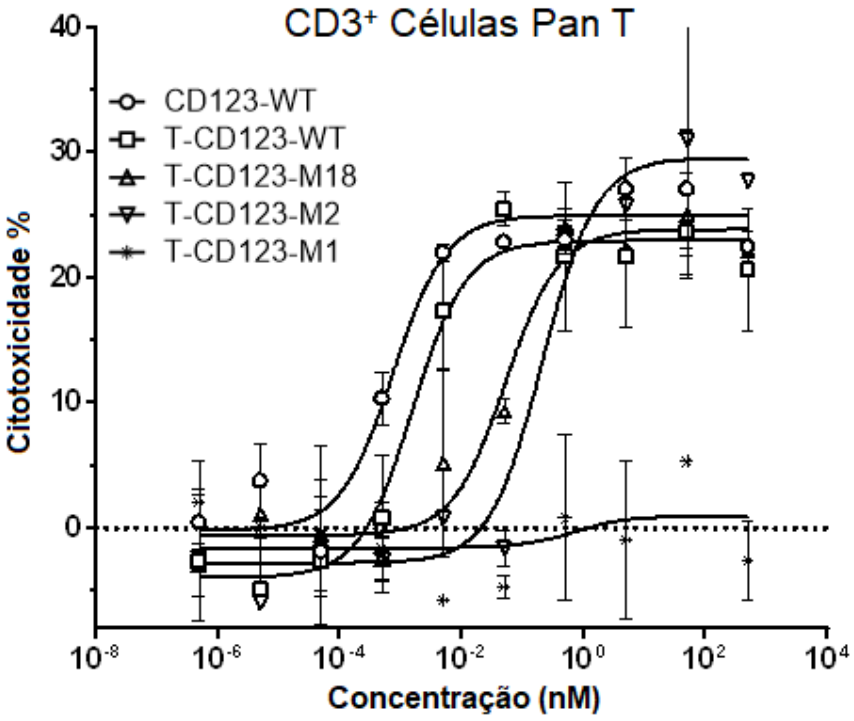


Figura 23A

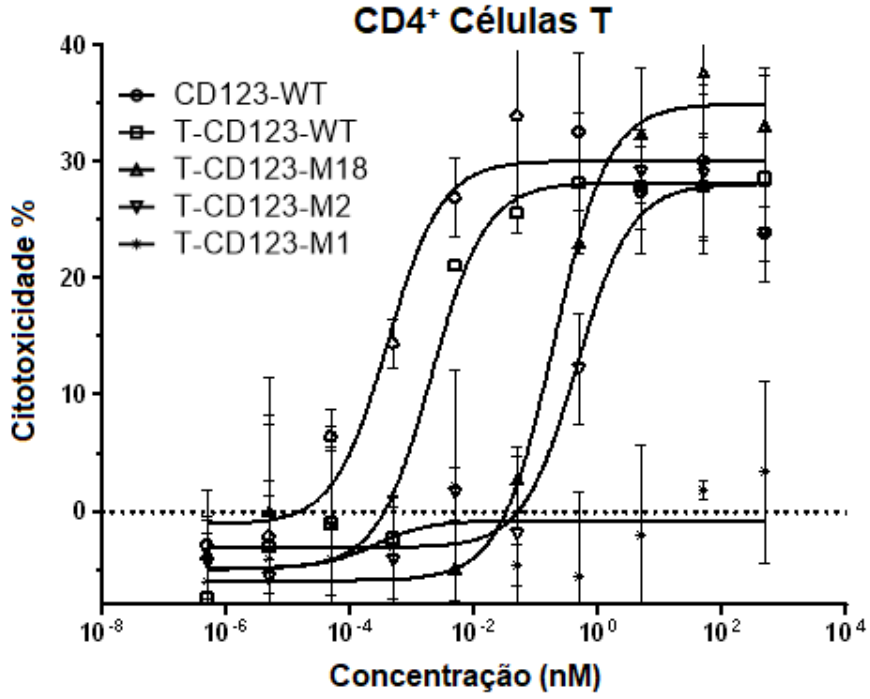


Figura 23B

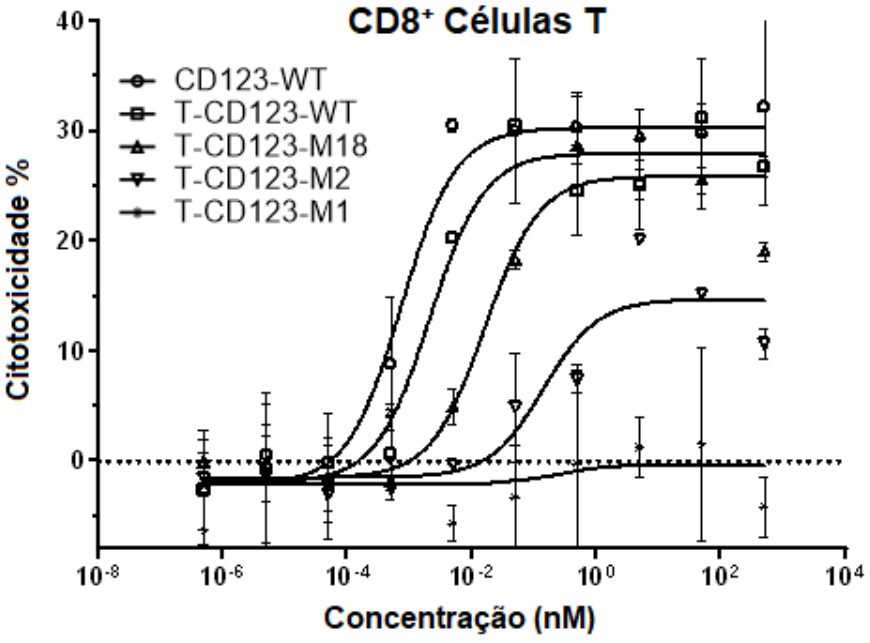


Figura 23C

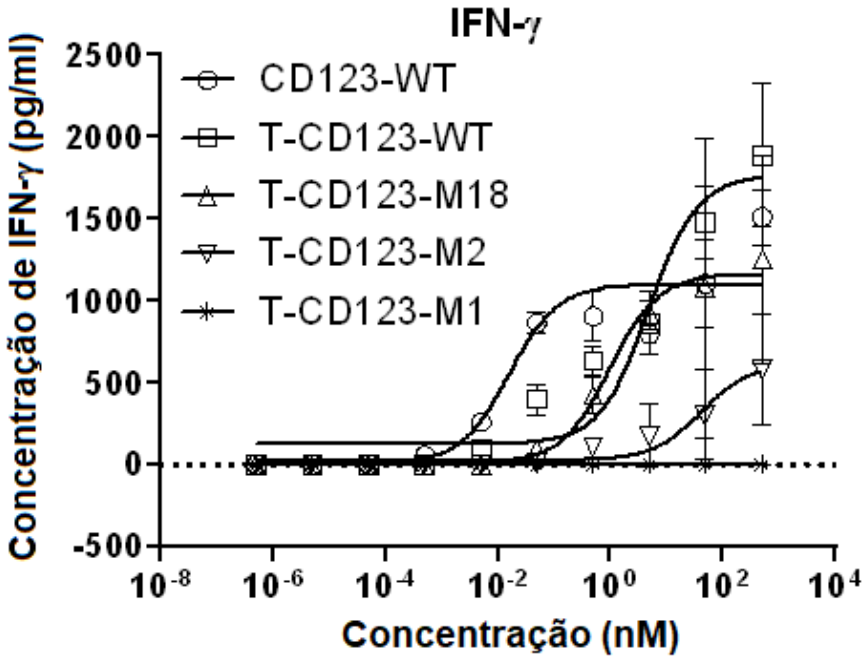


Figura 23D

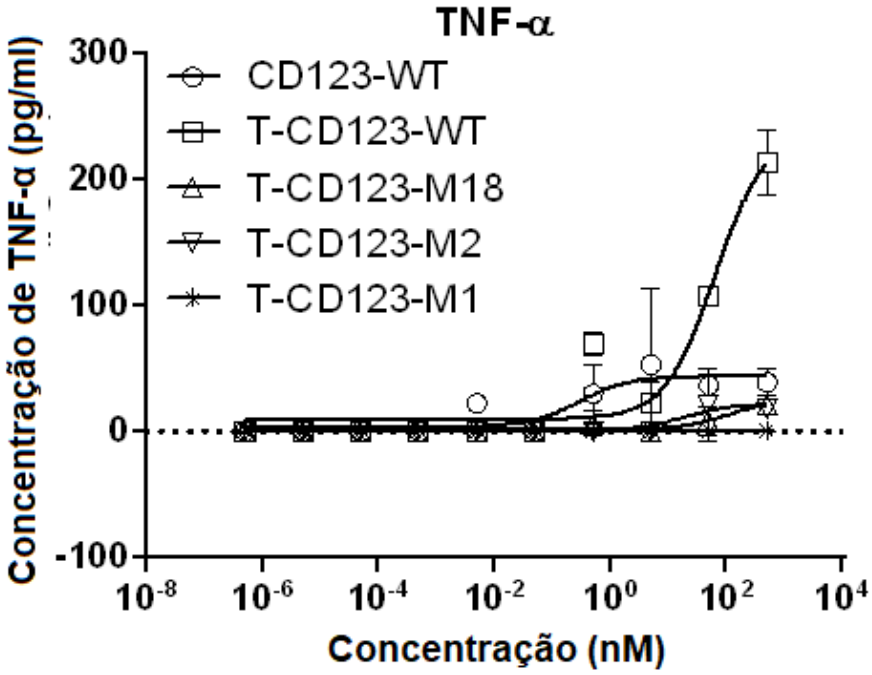


Figura 23E

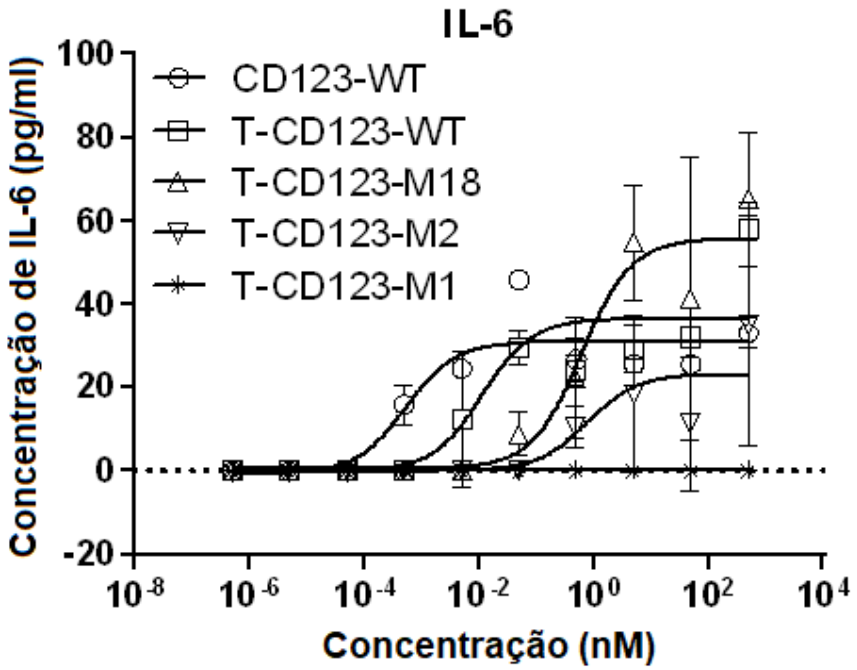


Figura 23F

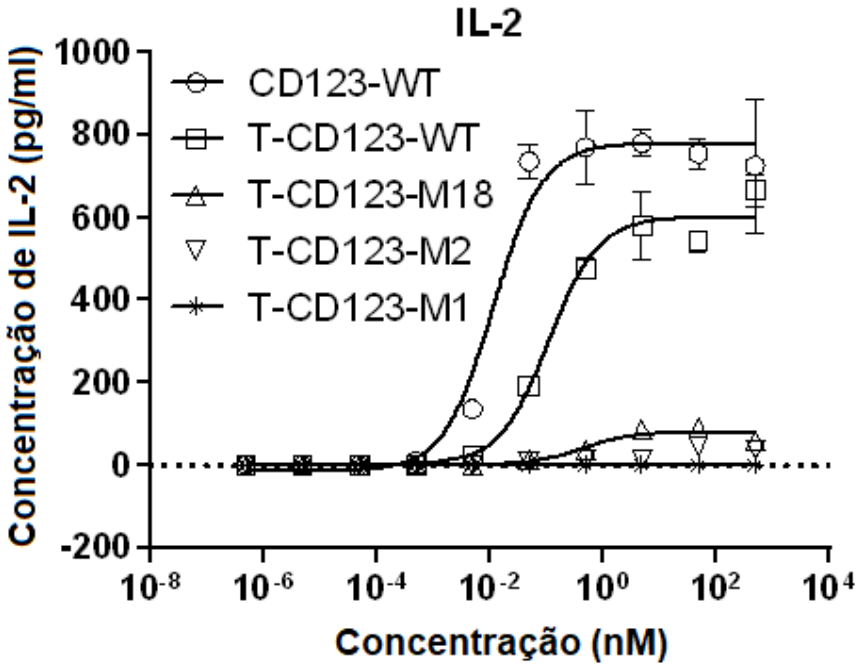


Figura 23G

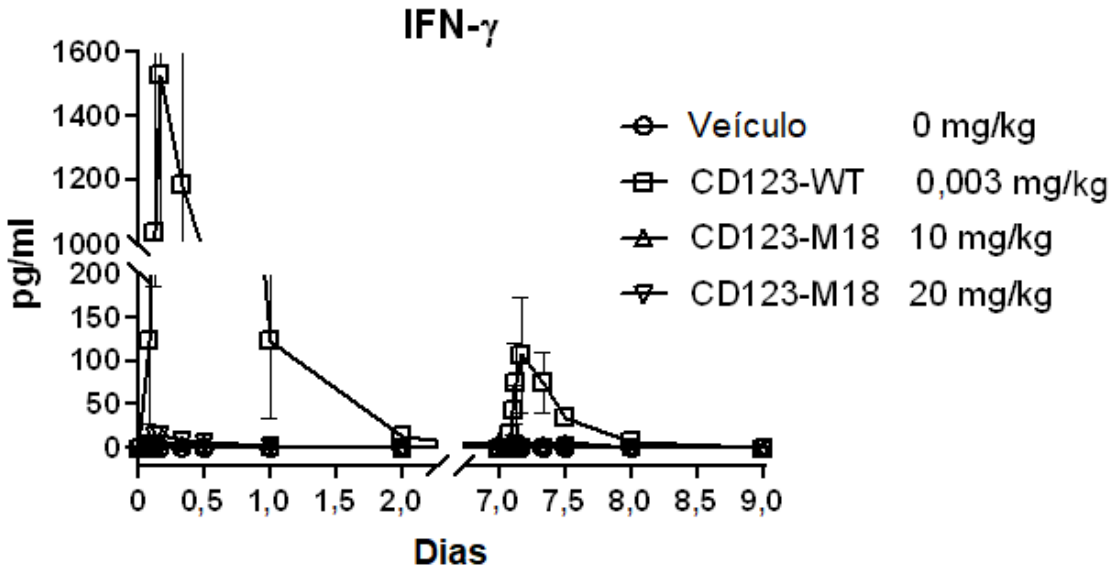


Figura 24A

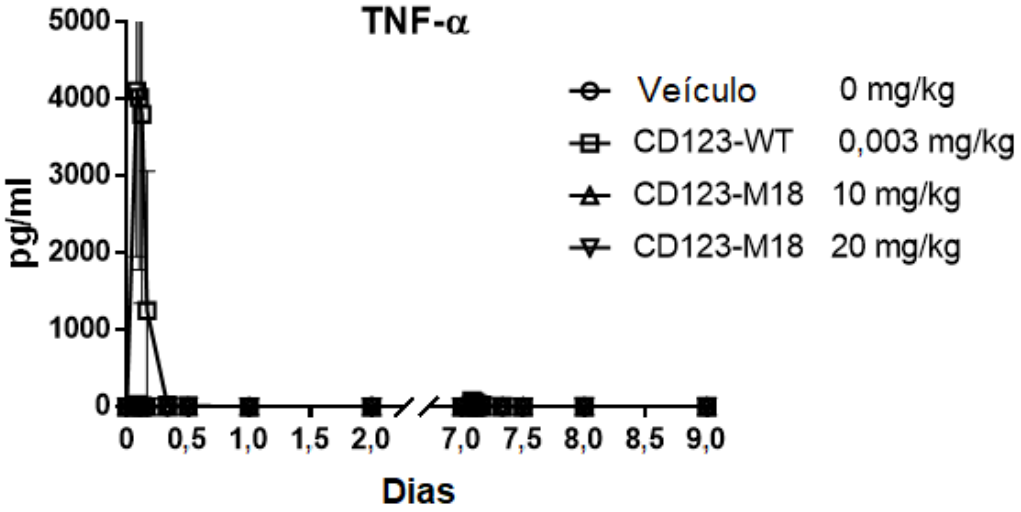


Figura 24B

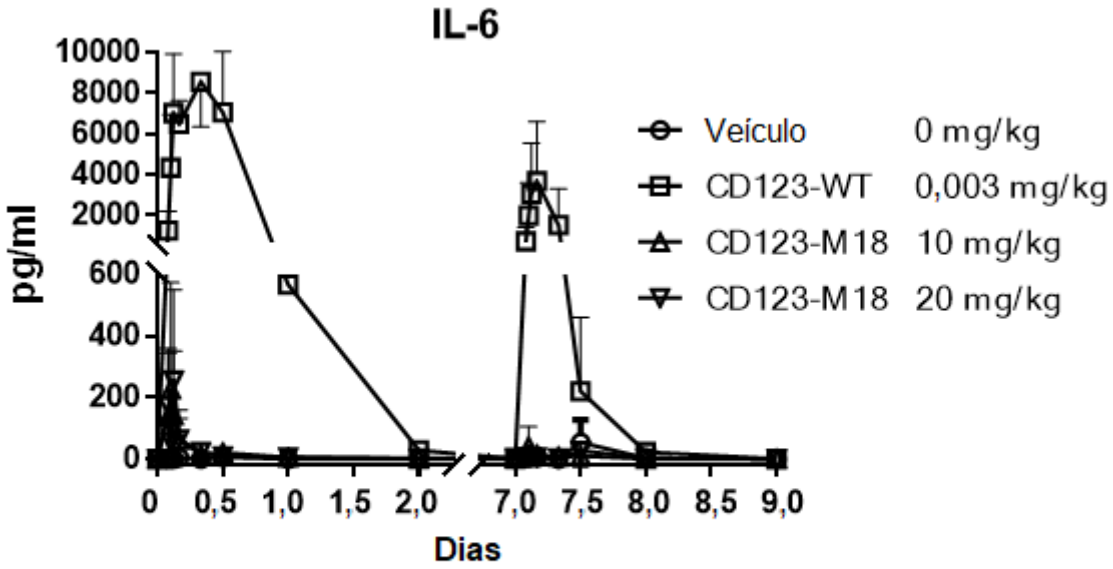


Figura 24C

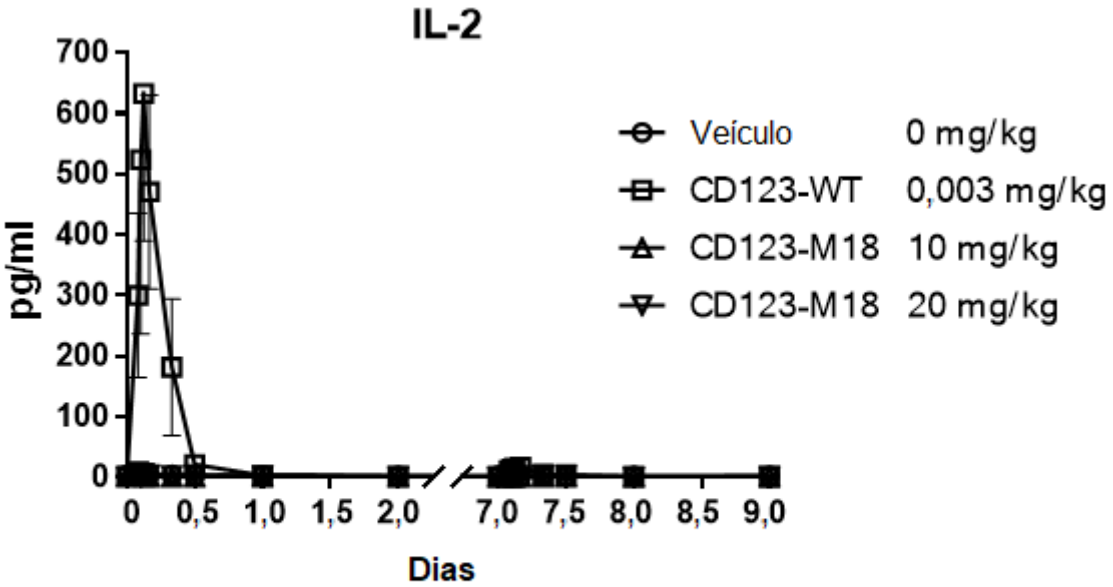


Figura 24D

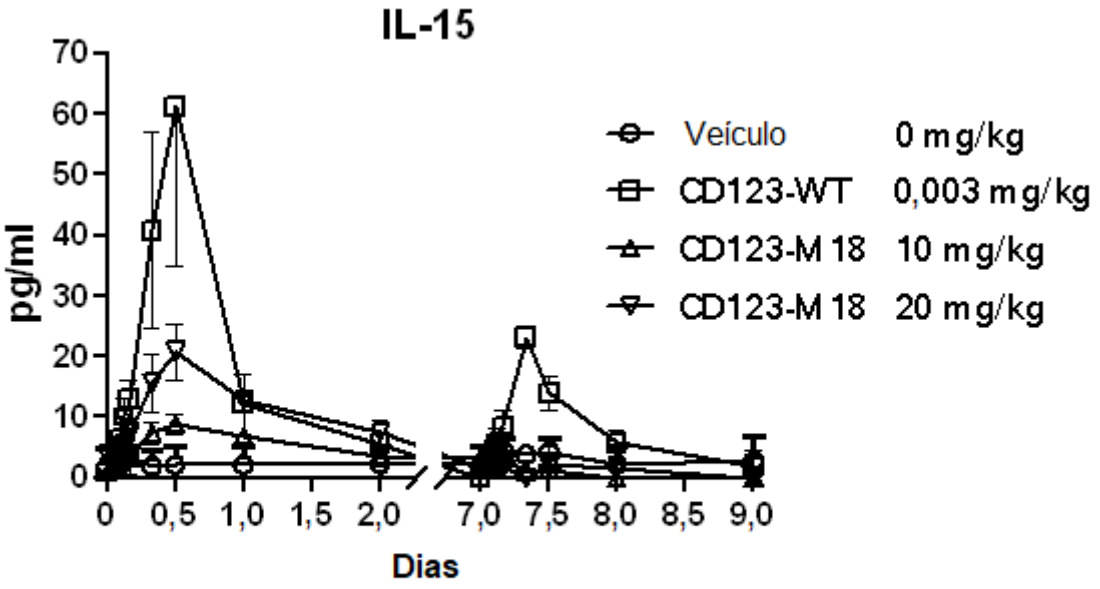


Figura 24E

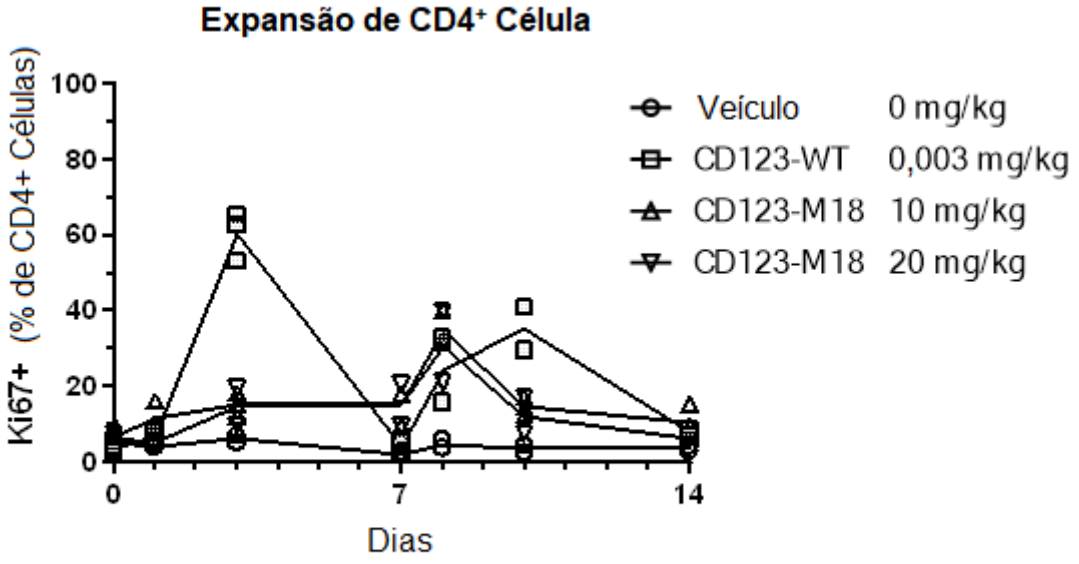


Figura 24F

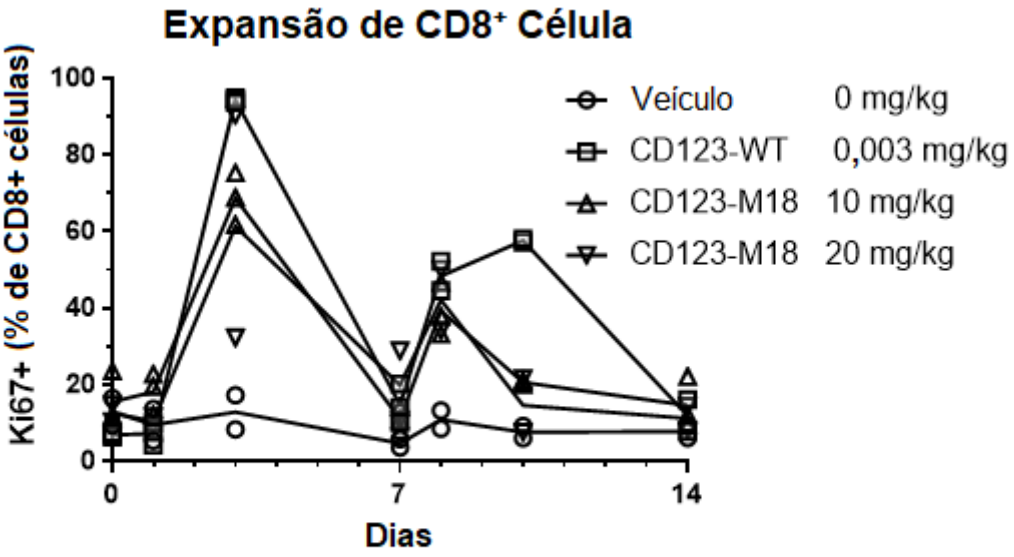


Figura 24G

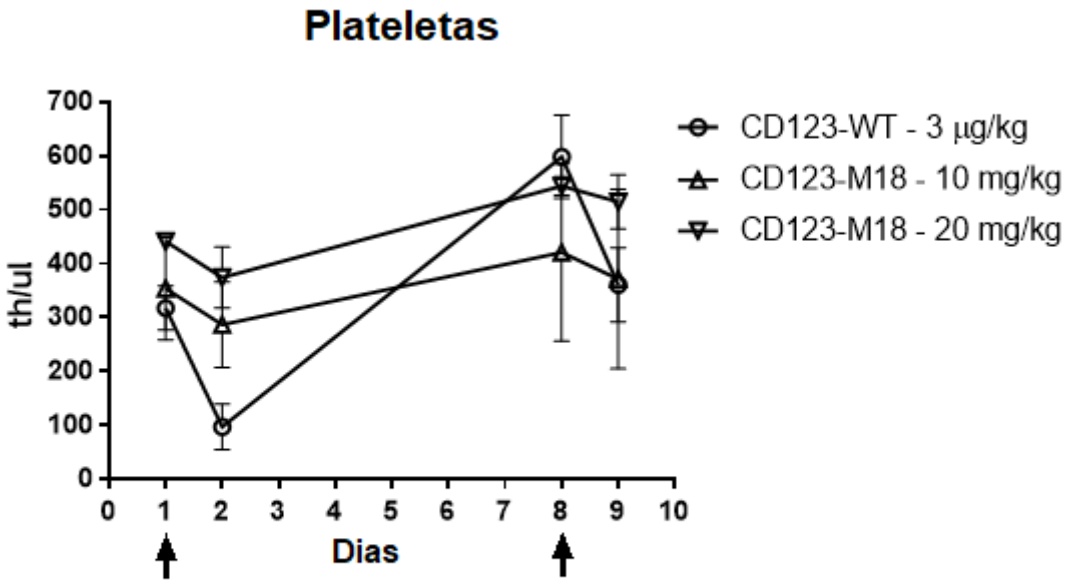


Figura 24H

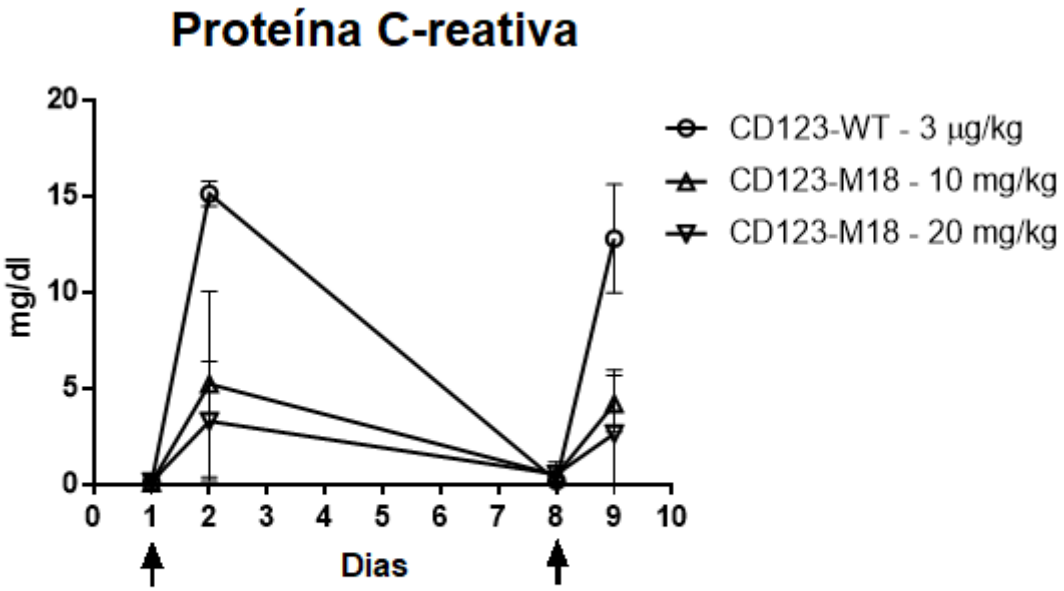


Figura 24I

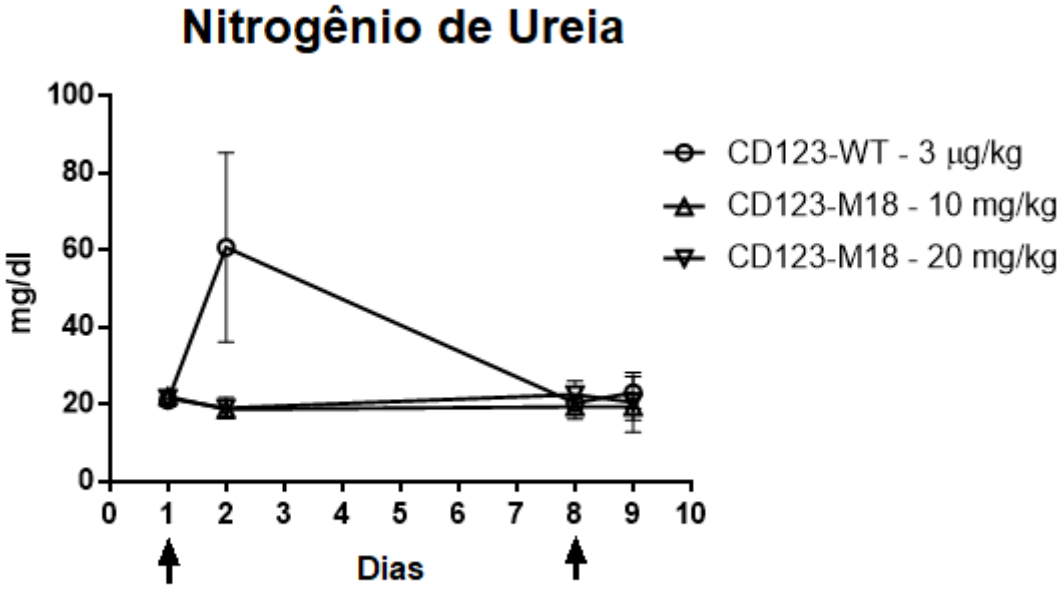


Figura 24J

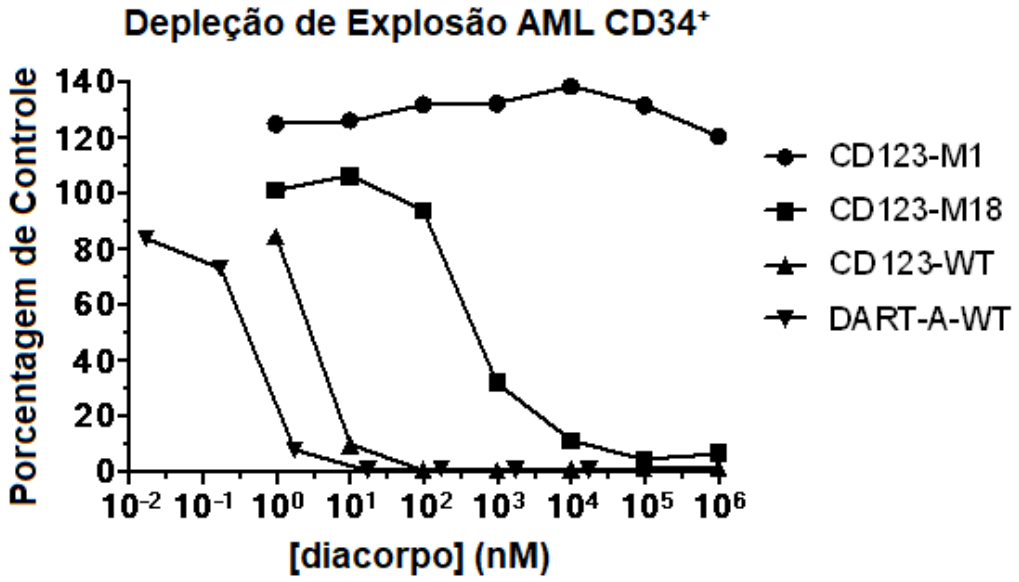


Figura 25A

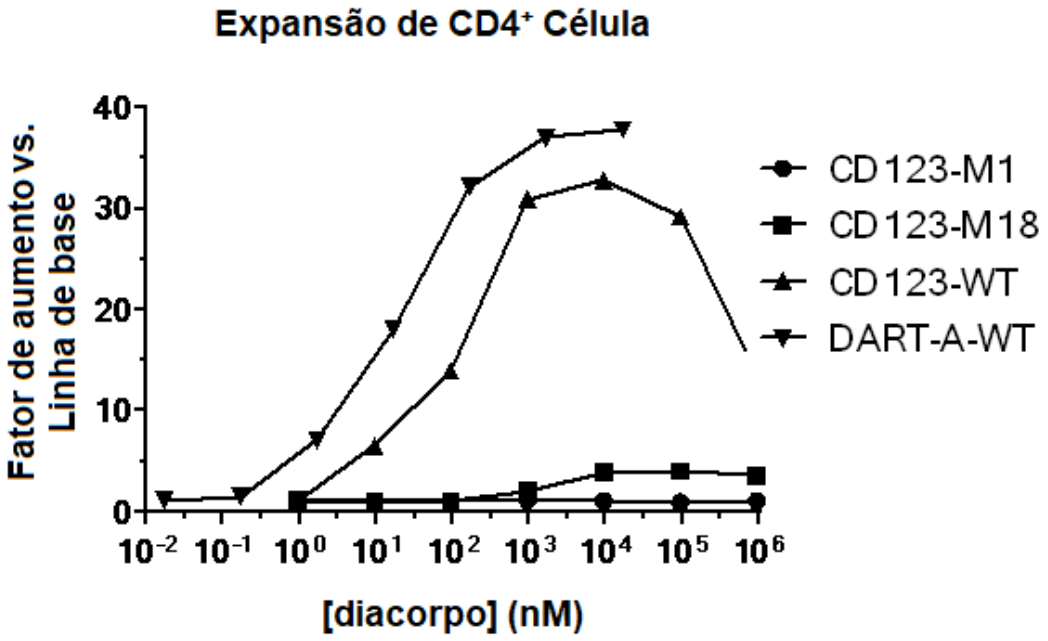


Figura 25B

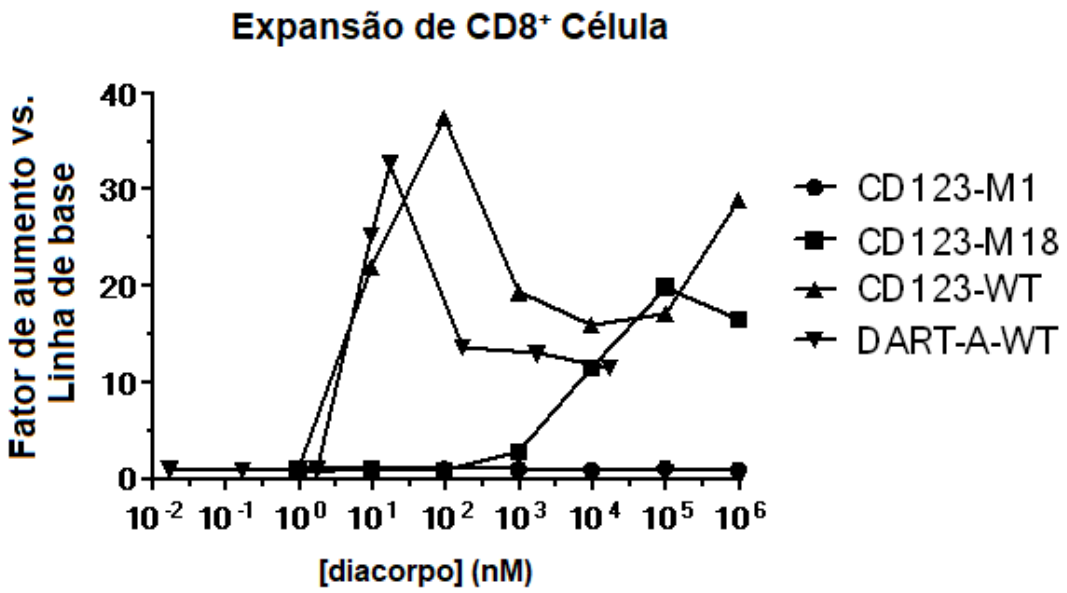


Figura 25C

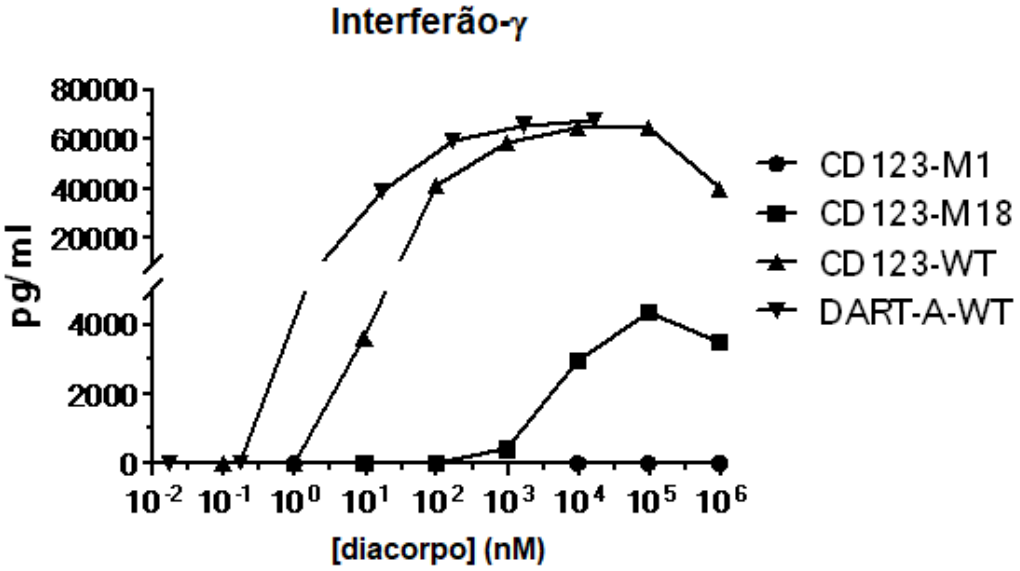


Figura 25D

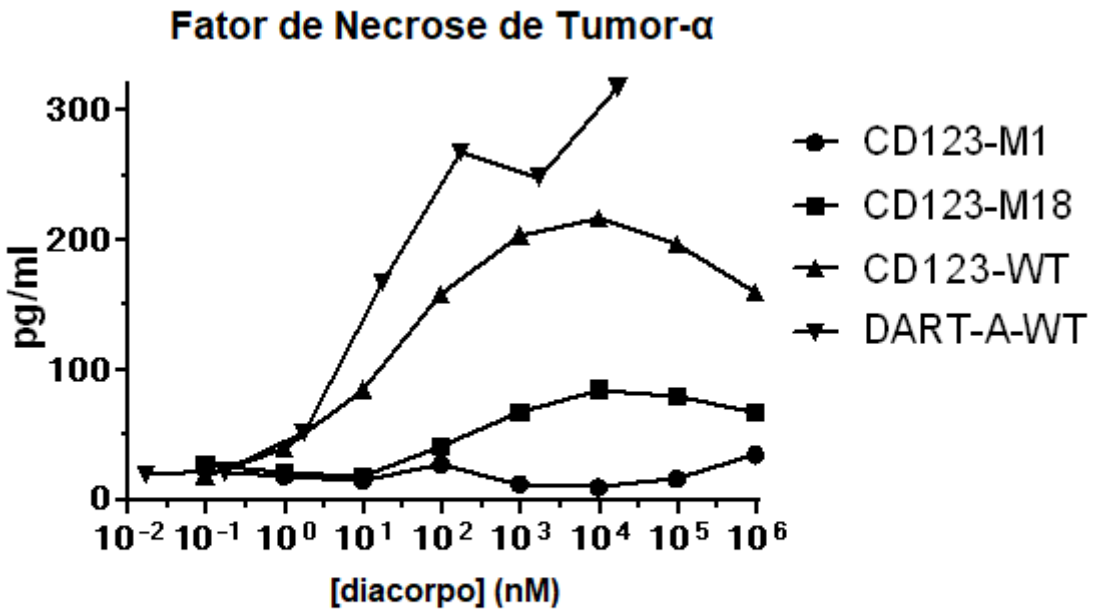


Figura 25E

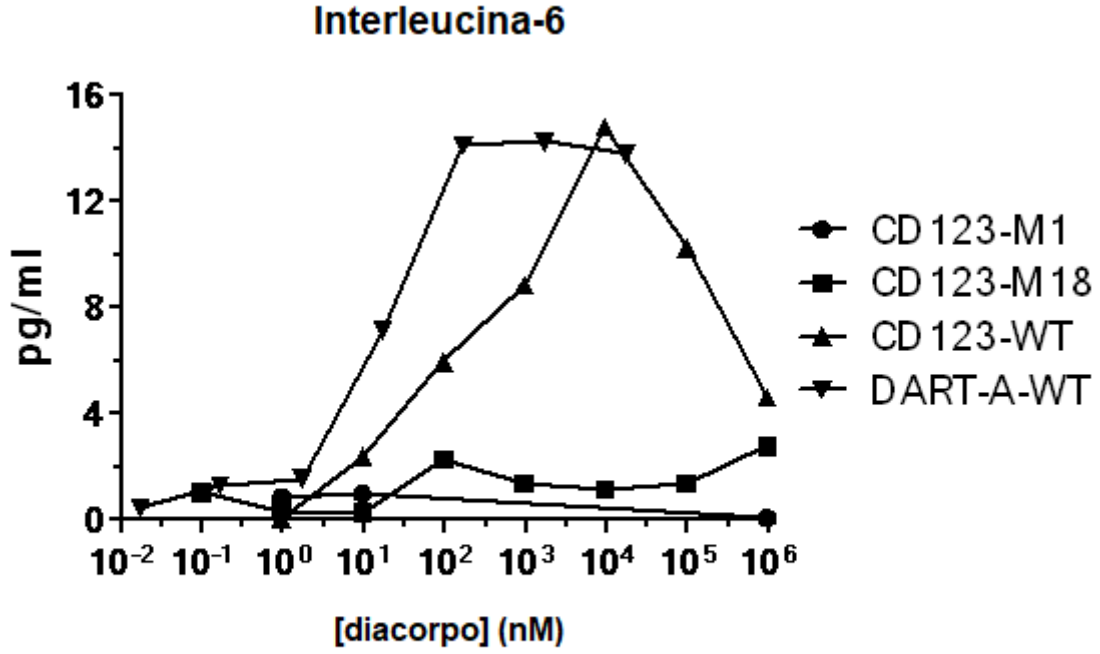


Figura 25F

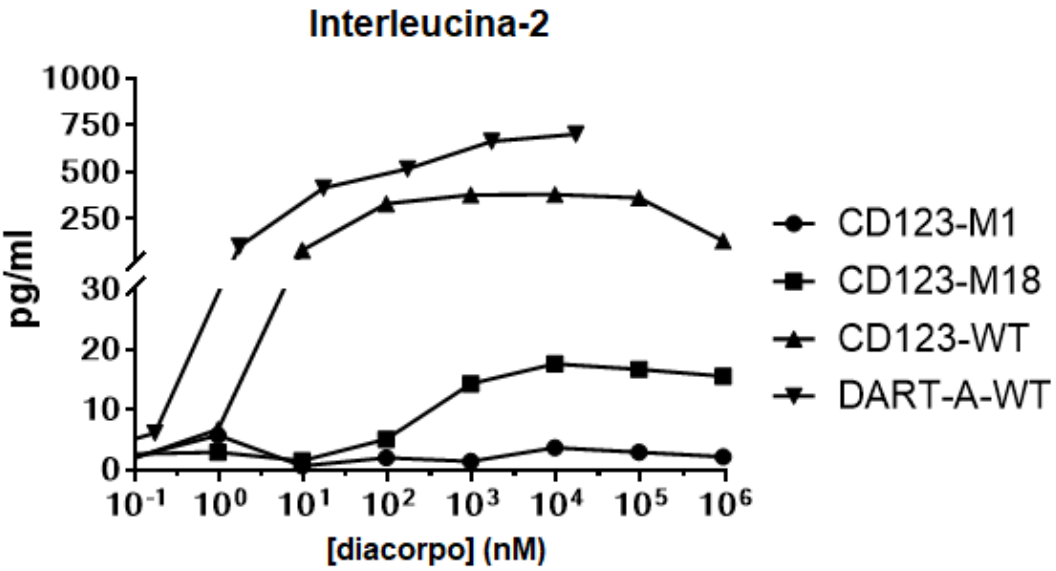


Figura 25G

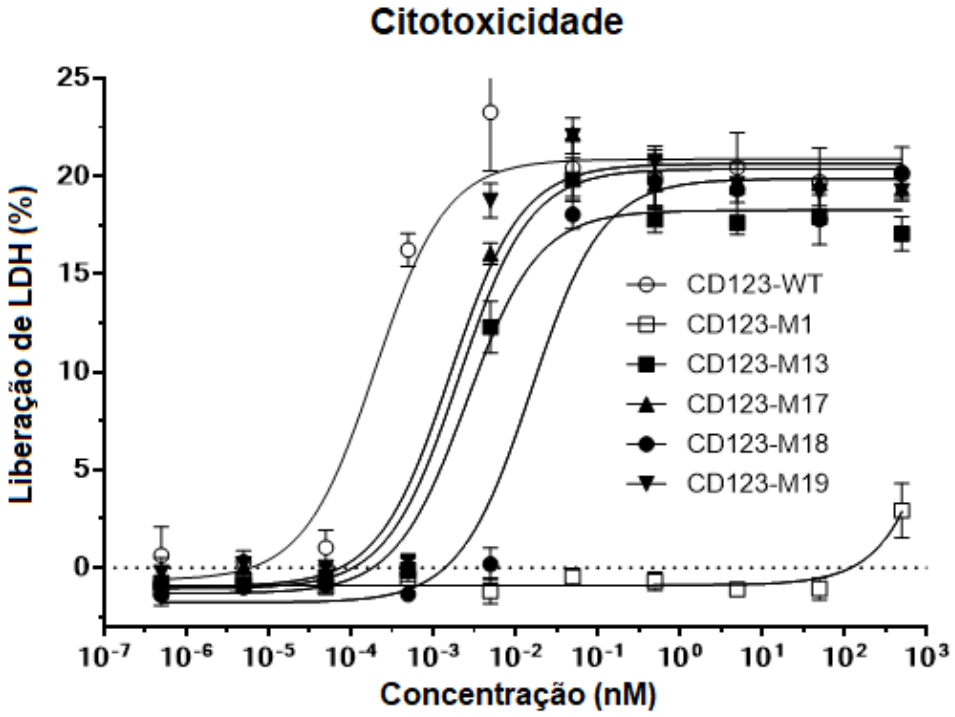


Figura 26A

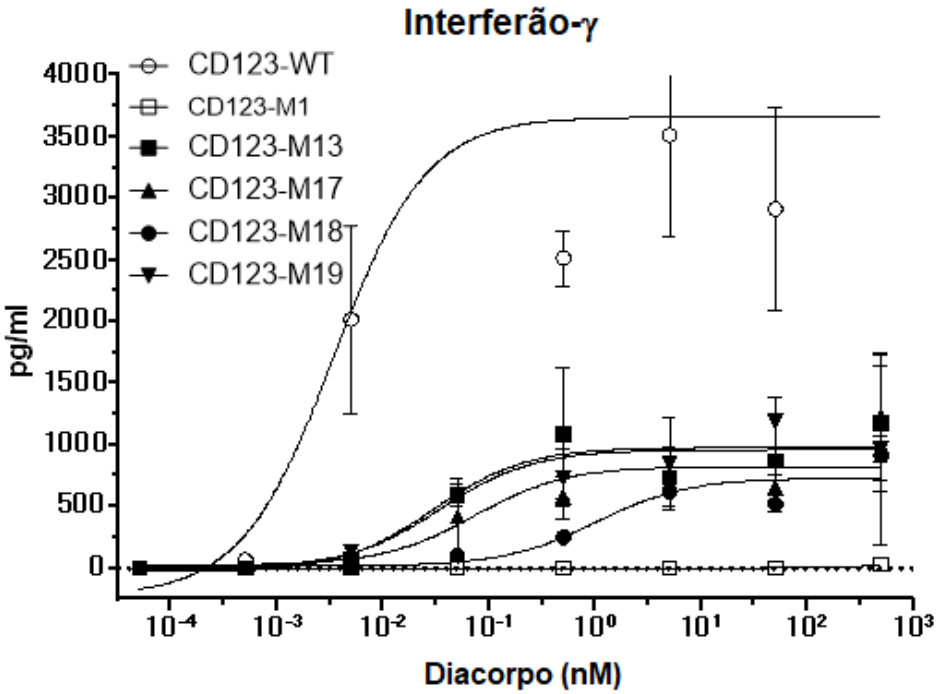


Figura 26B

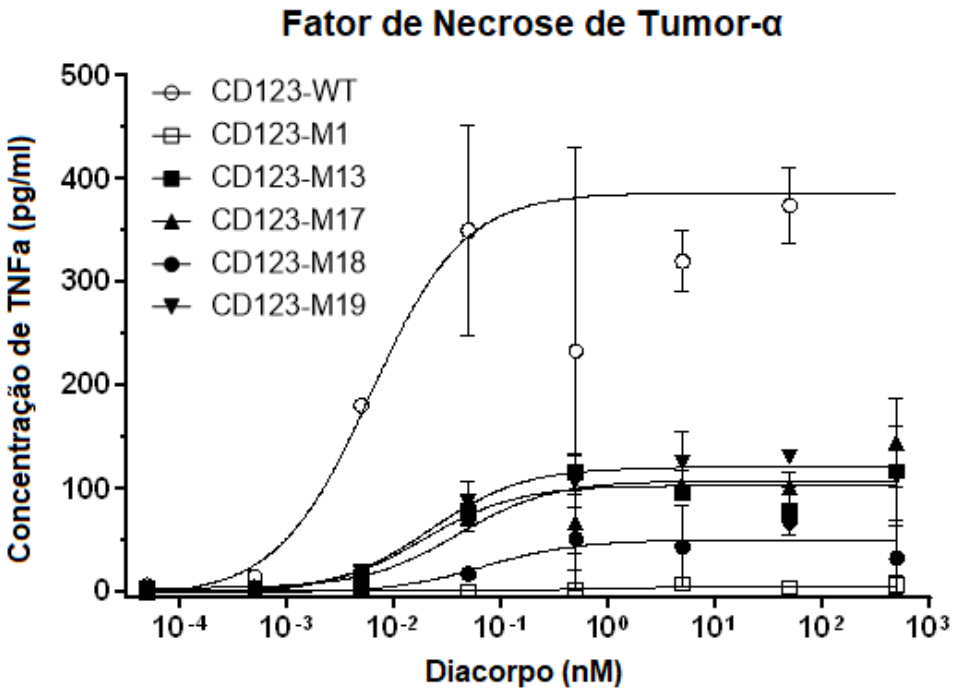


Figura 26C

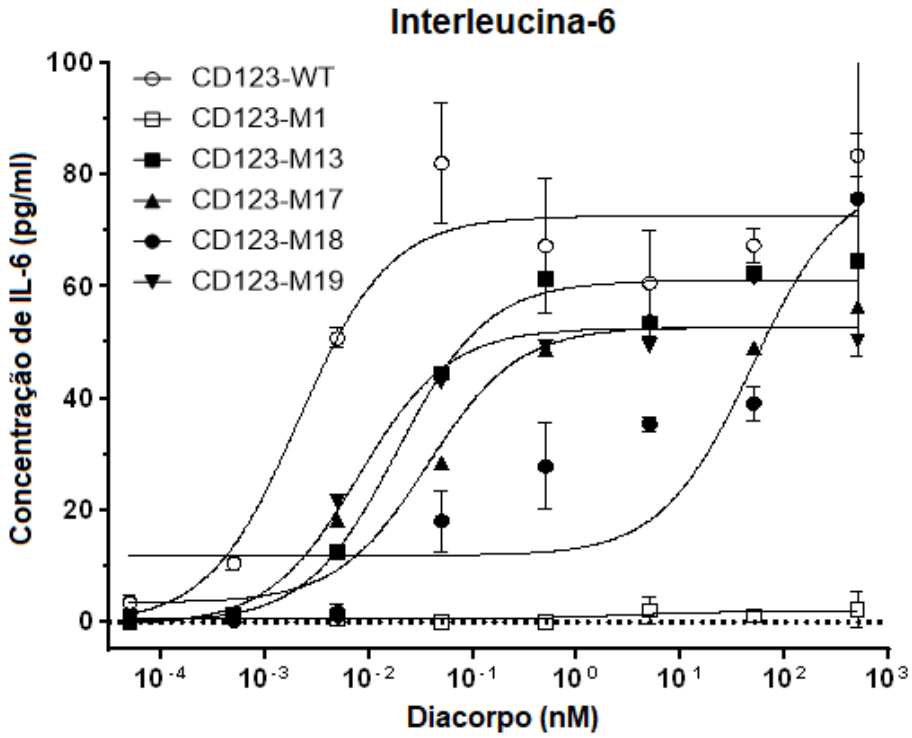


Figura 26D

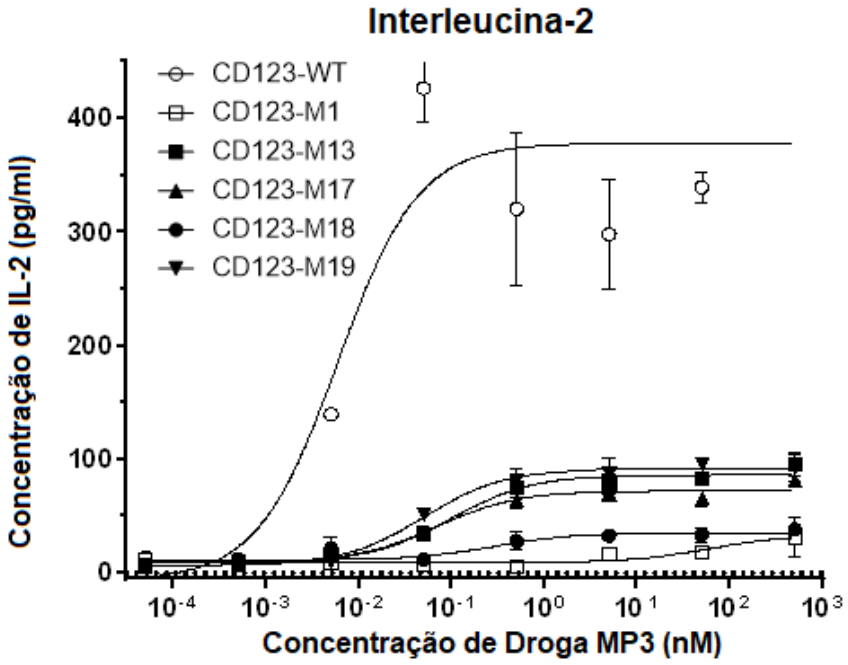


Figura 26E

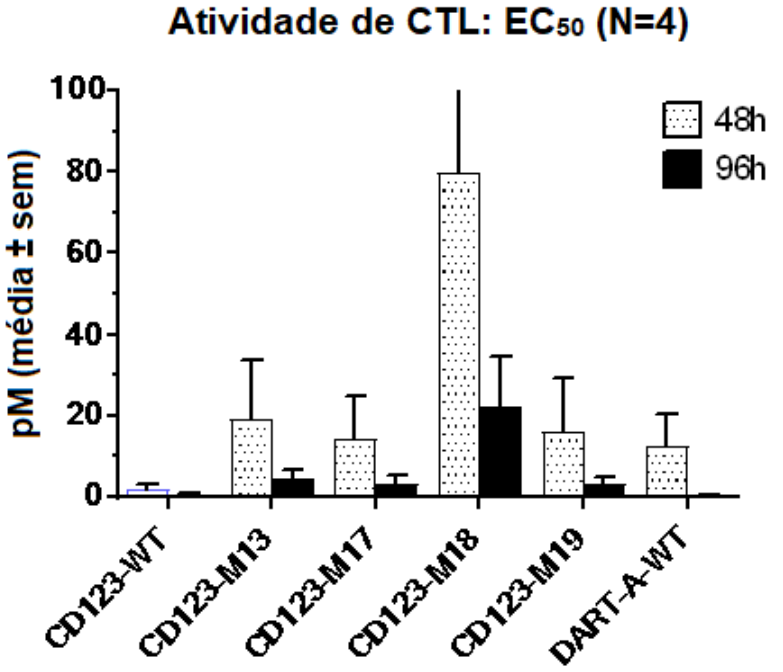


Figura 27A

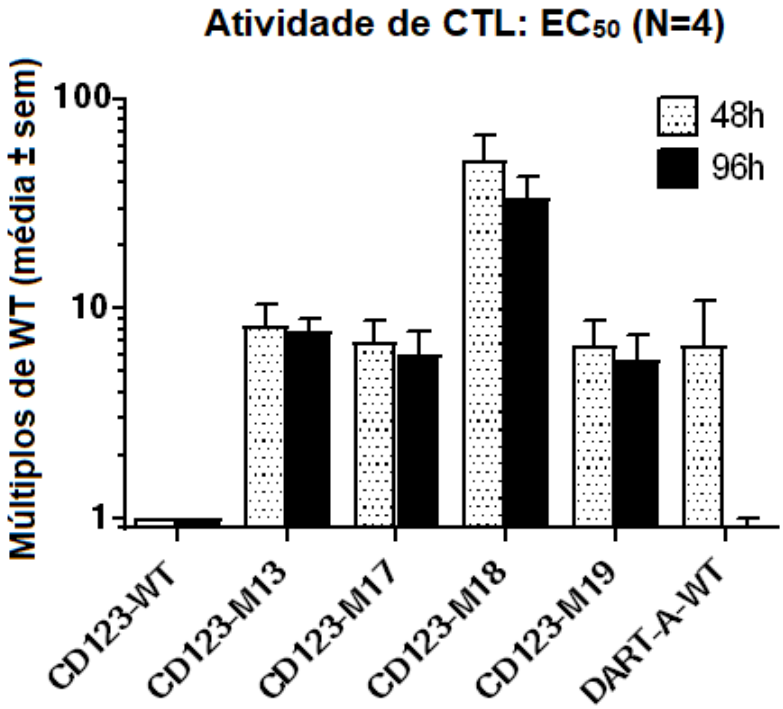


Figura 27B

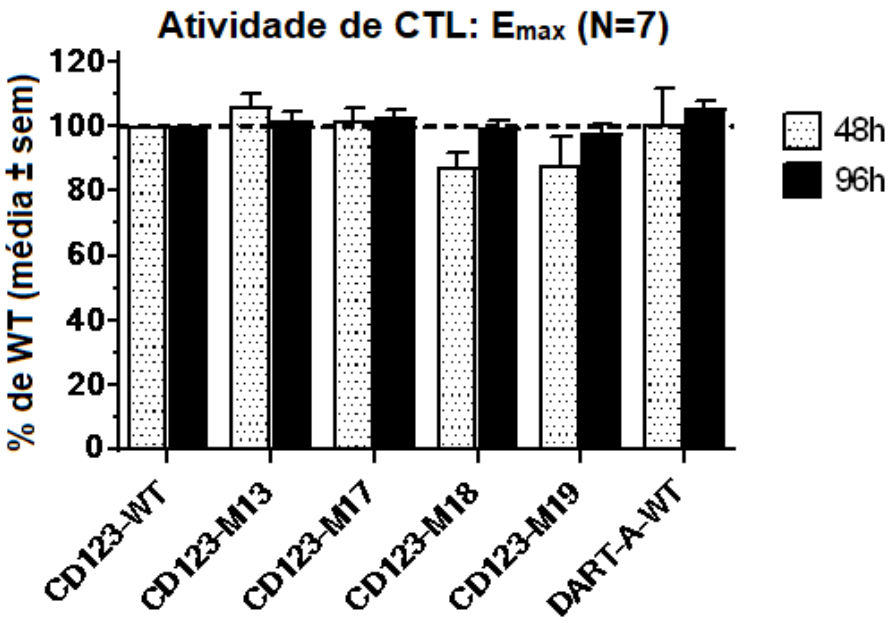


Figura 27C

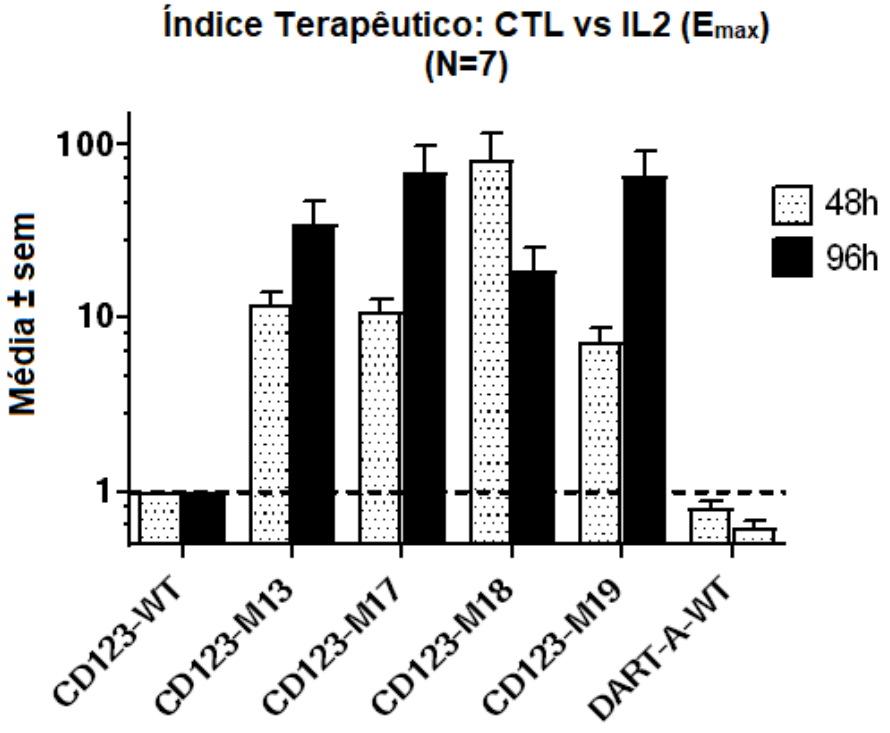


Figura 27D

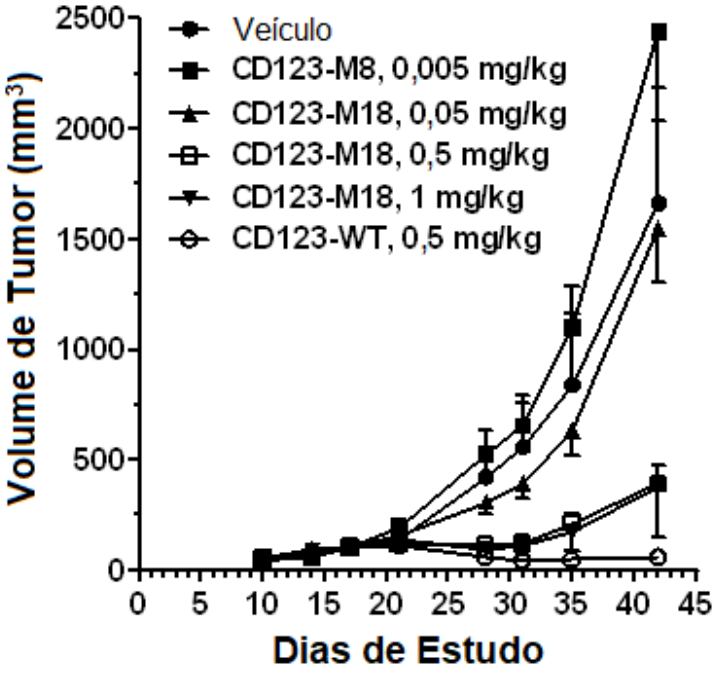


Figura 28A

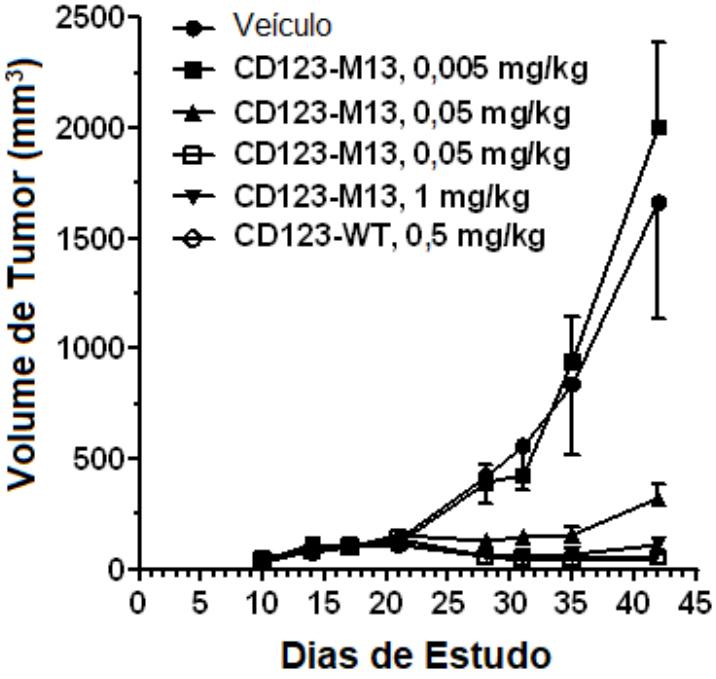


Figura 28B

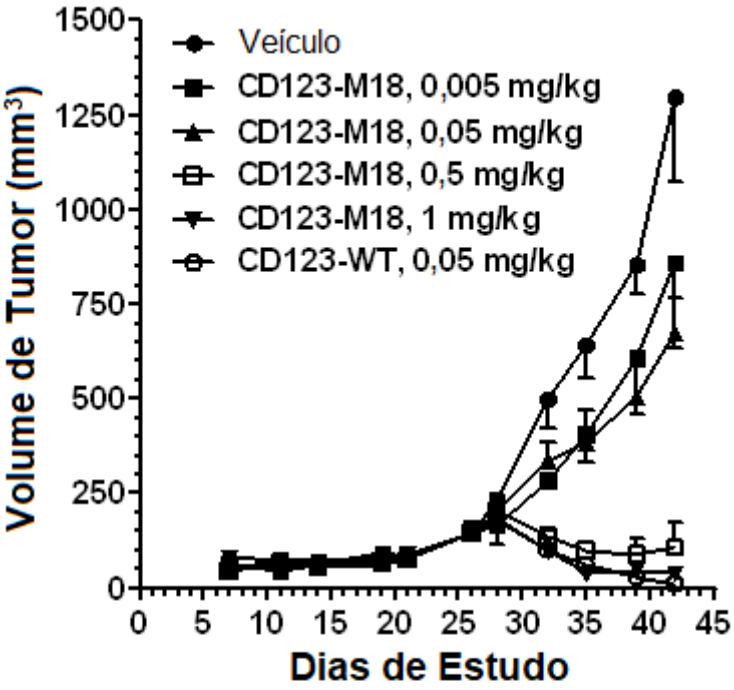


Figura 29A

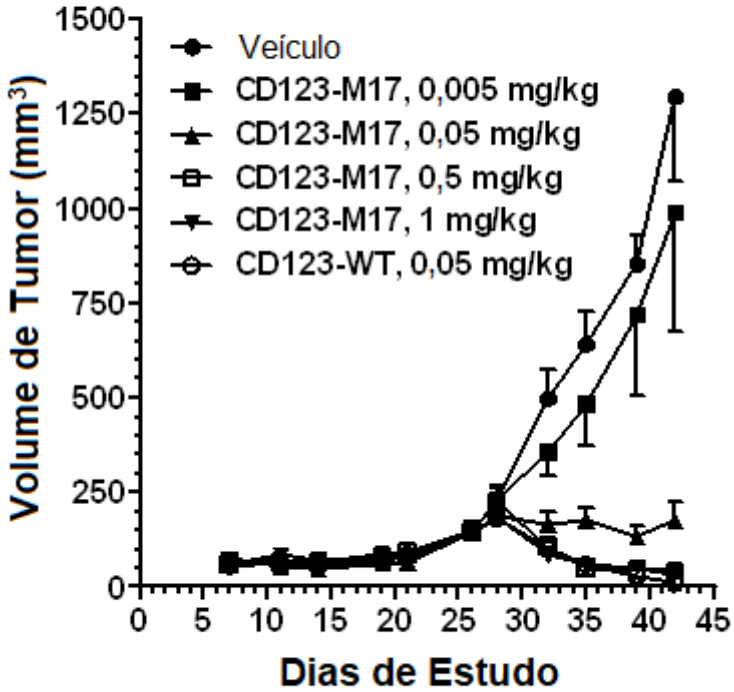


Figura 29B

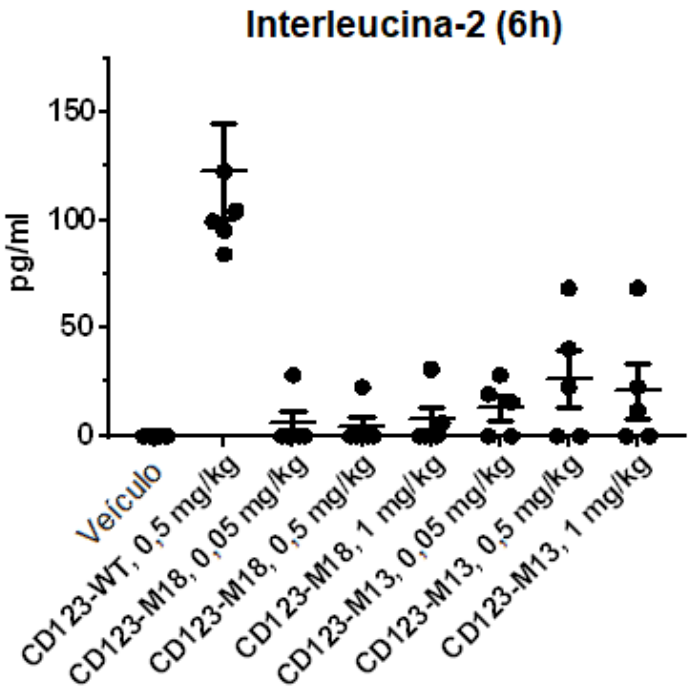


Figura 30A

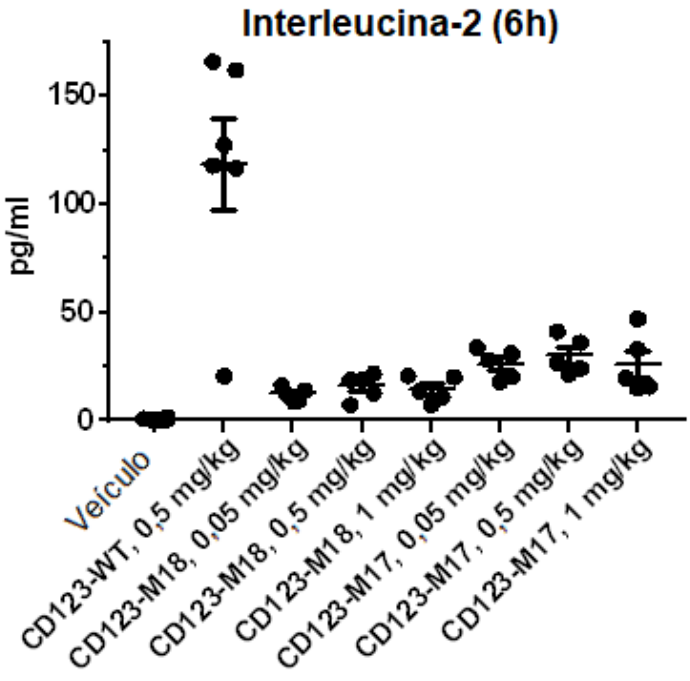


Figura 30B

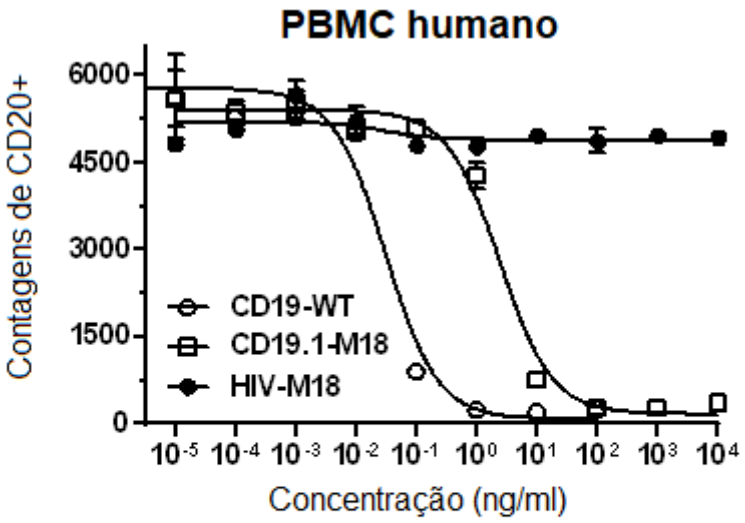


Figura 31A

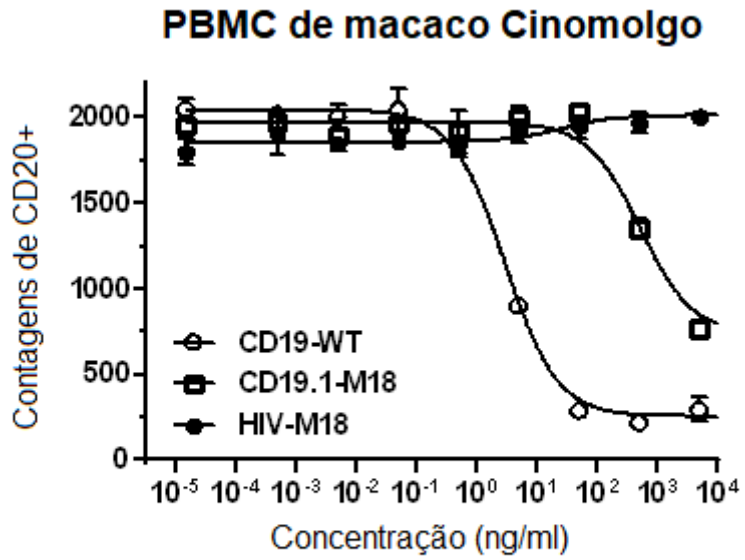


Figura 31B

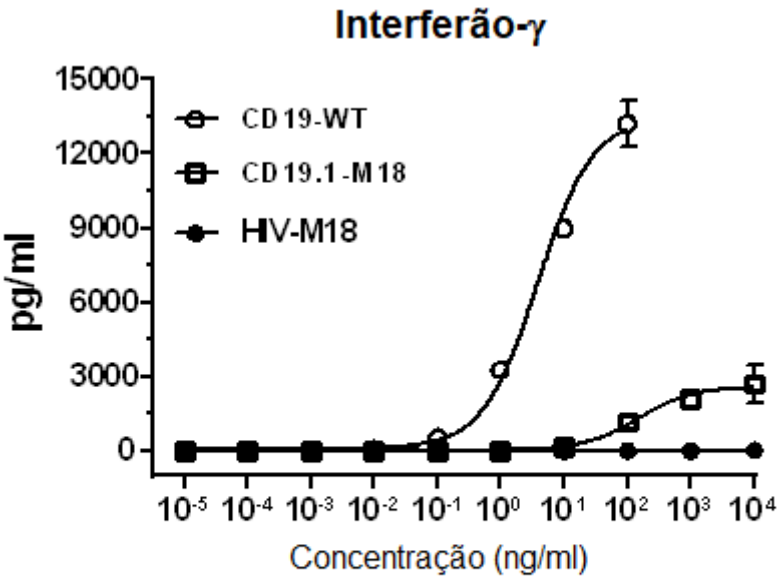


Figura 31C

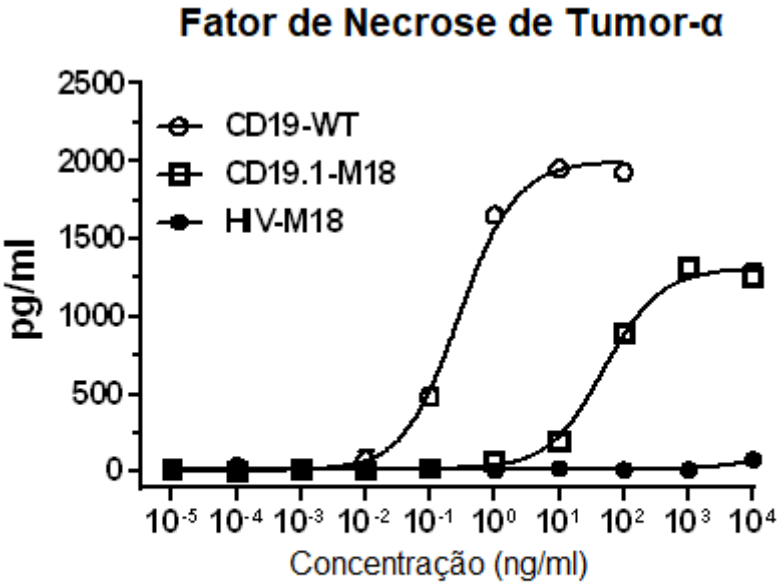


Figura 31D

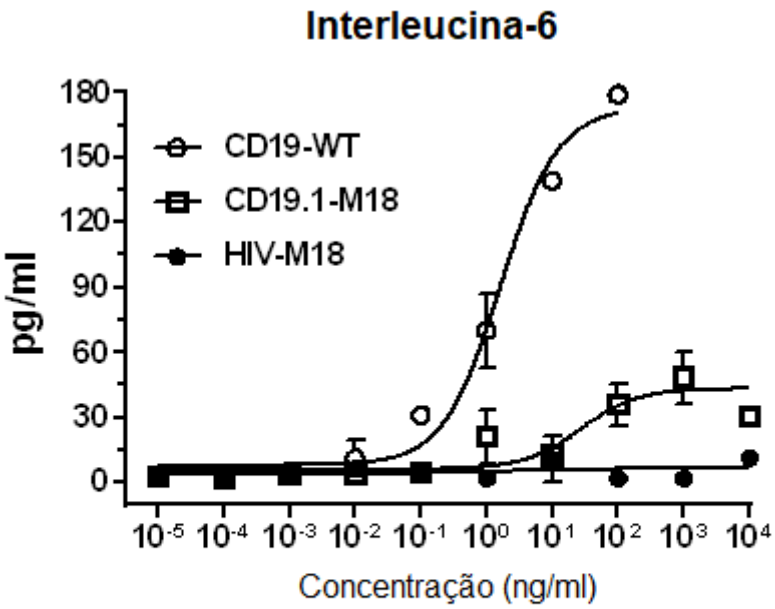


Figura 31E

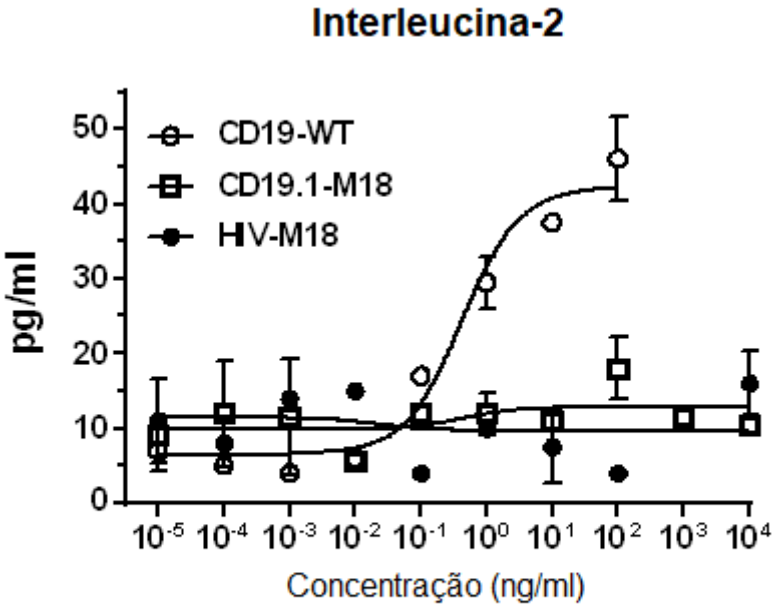


Figura 31F

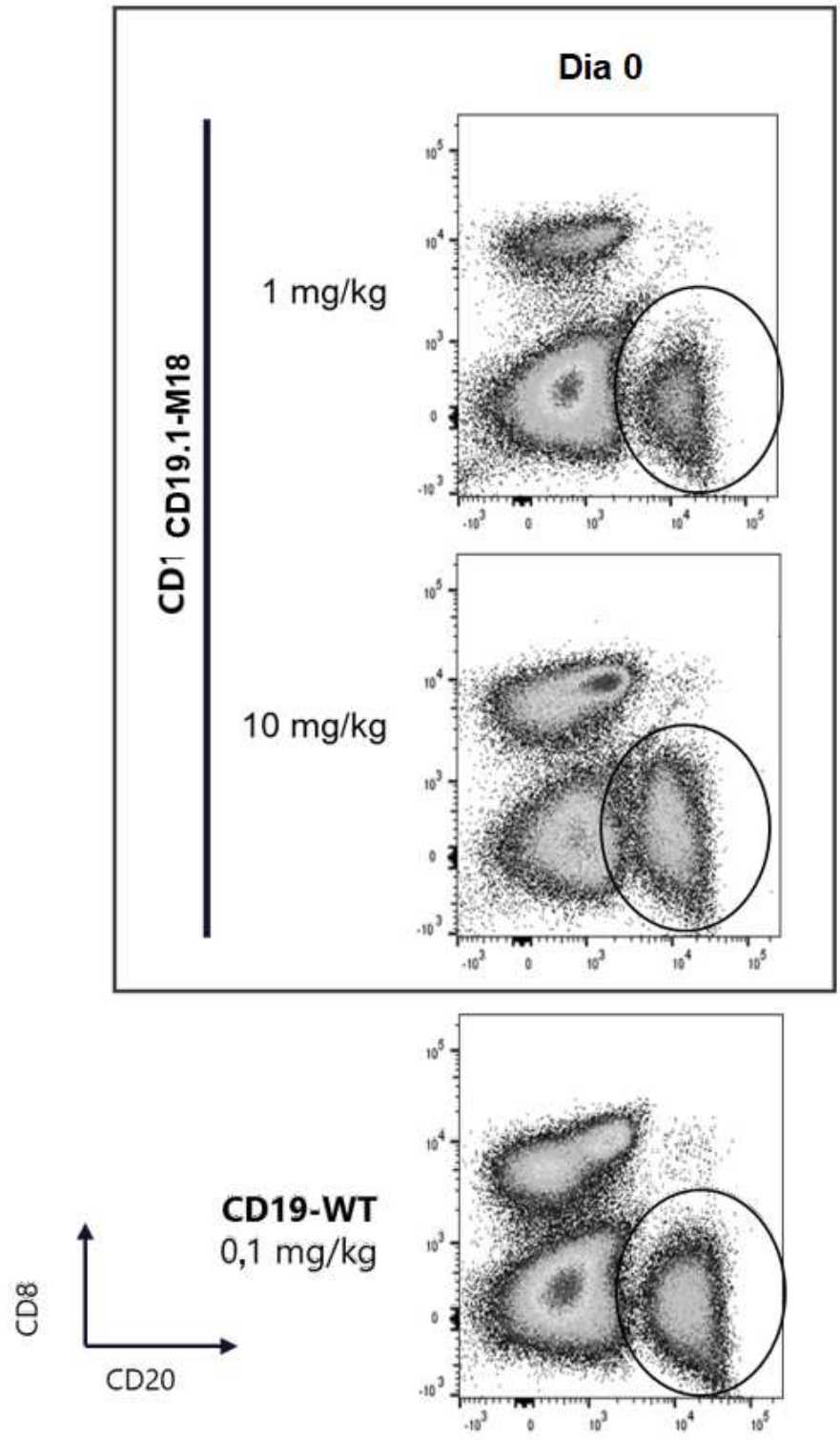


Figura 32A

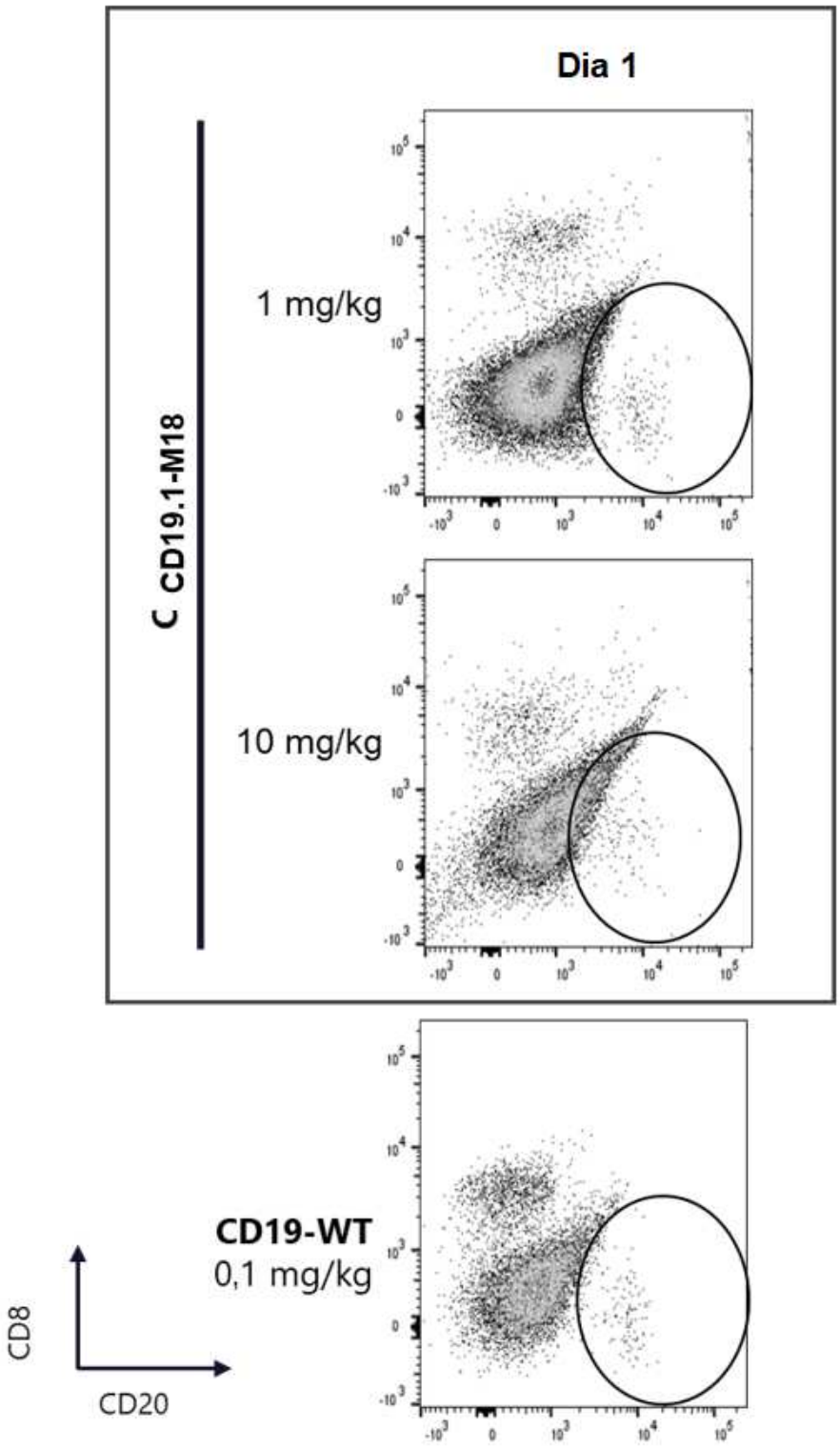


Figura 32B

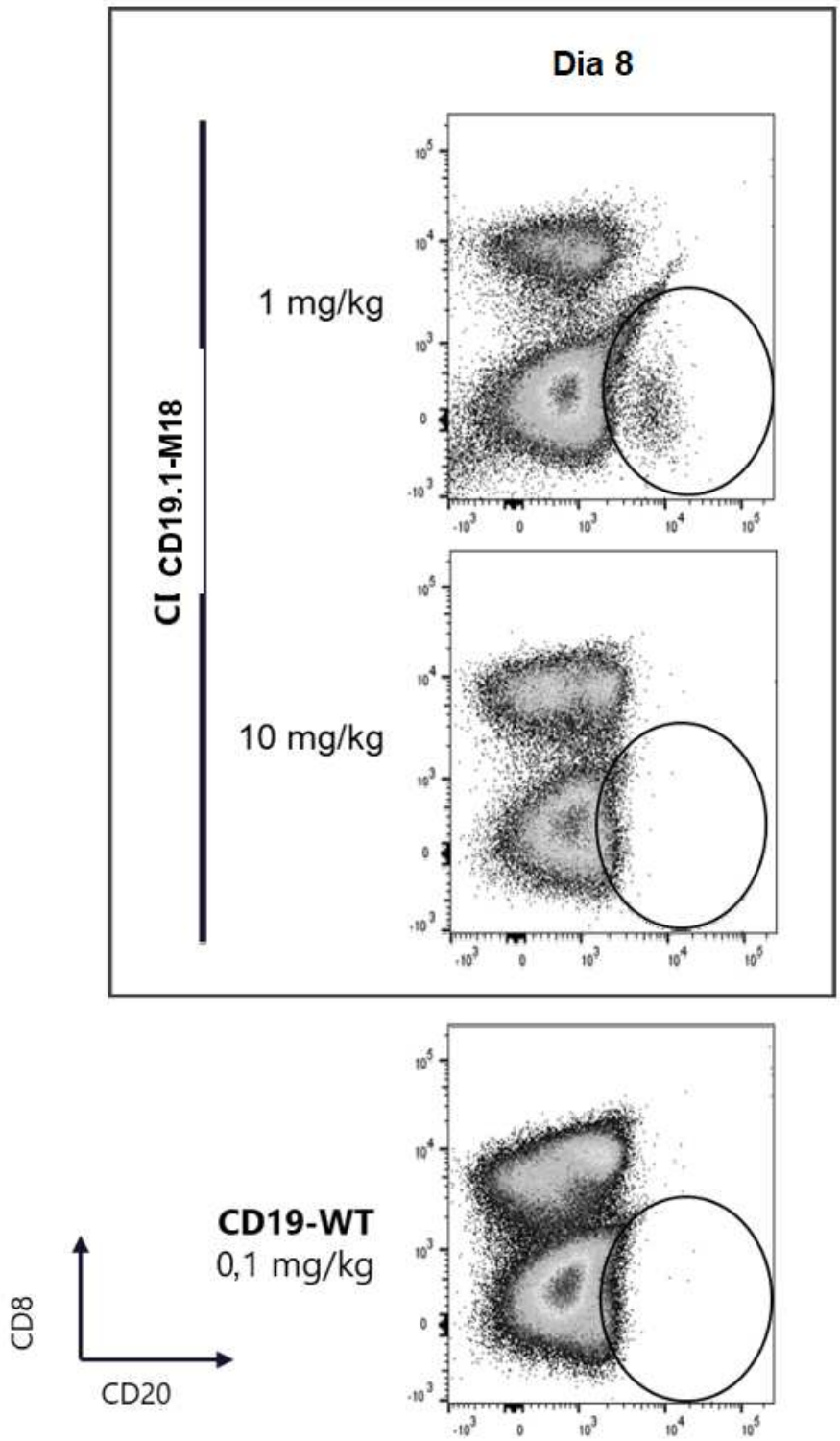


Figura 32C

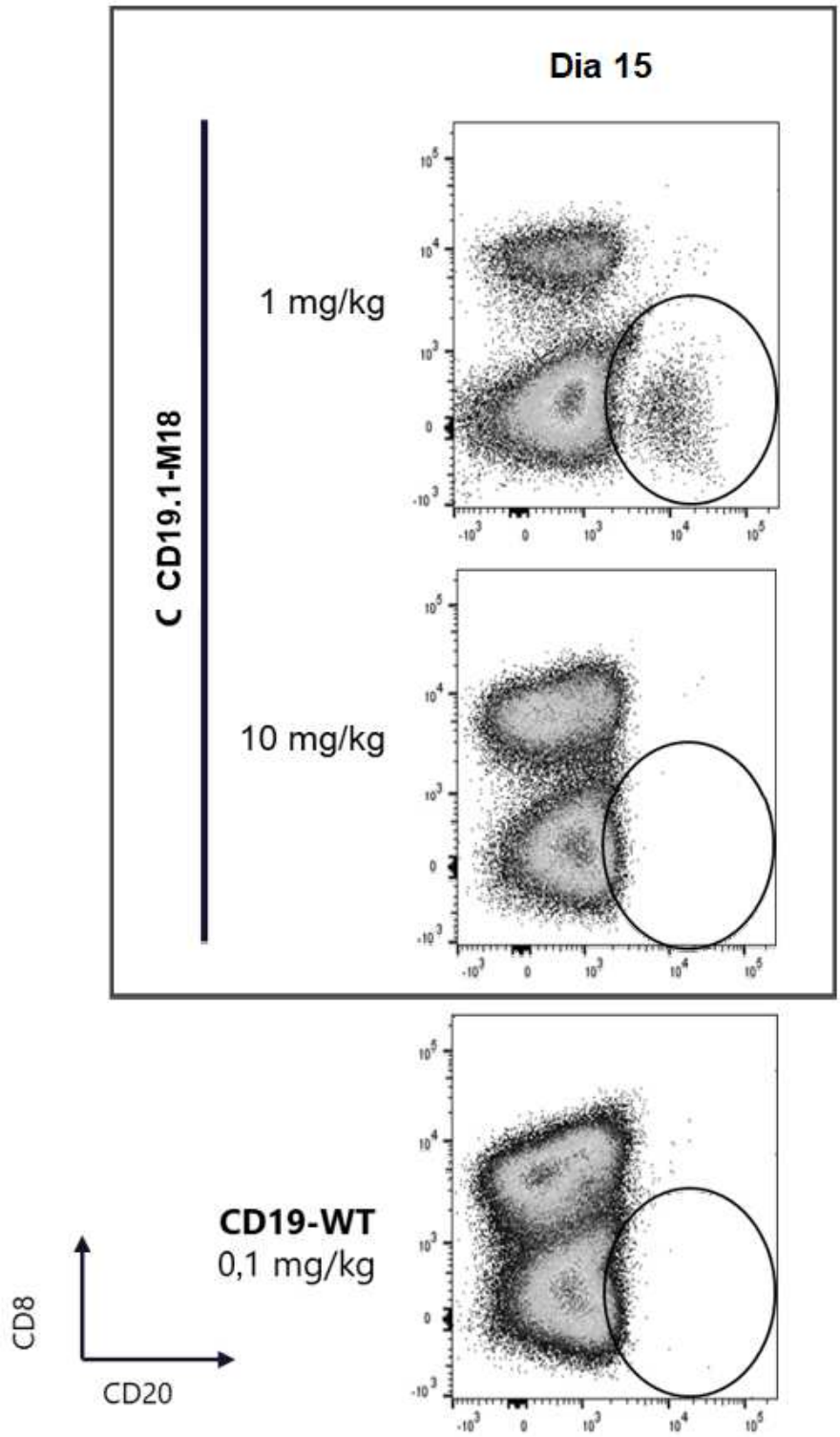
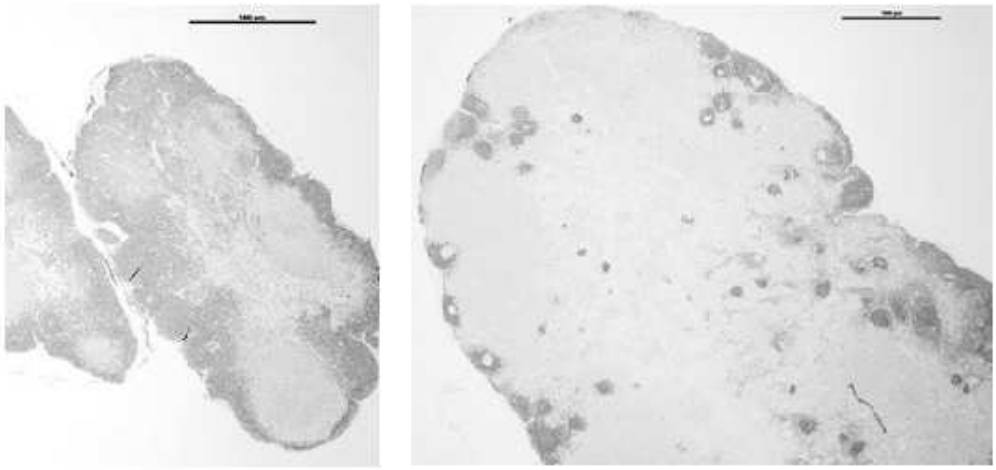


Figura 32D

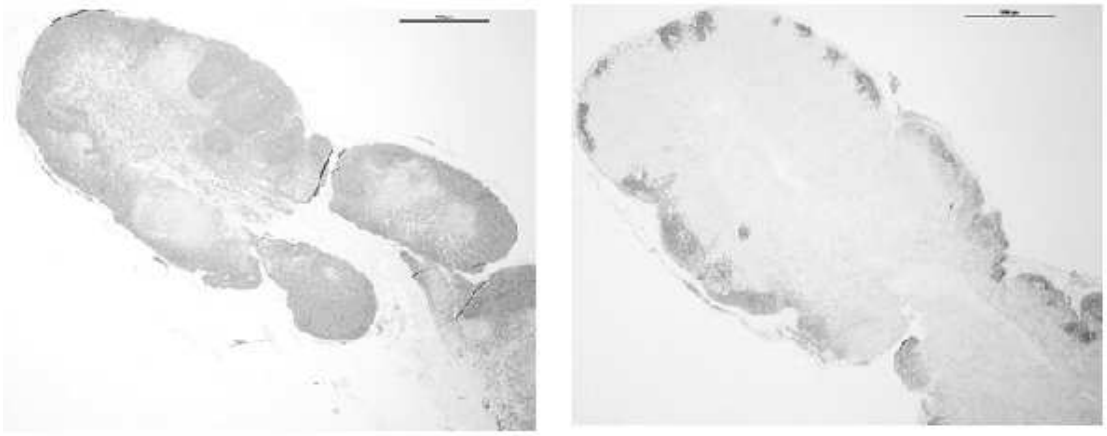
CD19-WT, 0,1 mg/kg
(Controle Positivo)



Pré-dose Dia 7

Figura 33A

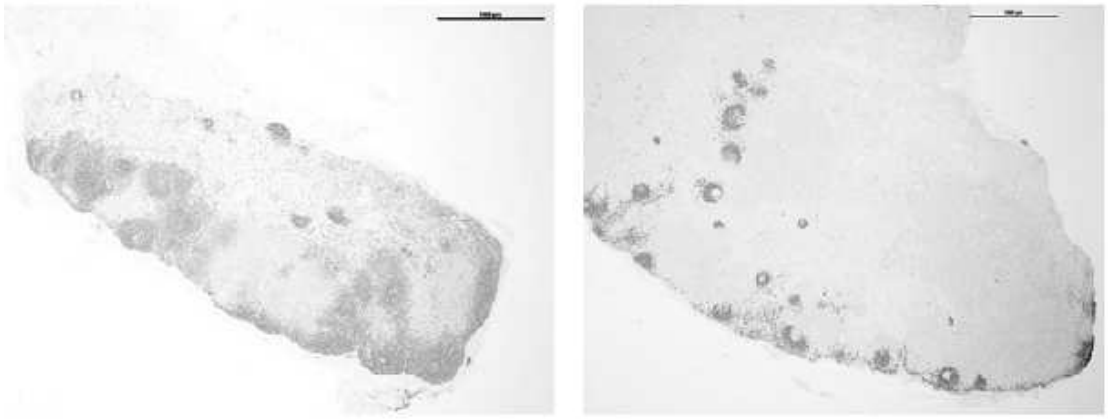
CD19.1-M18, 10 mg/kg



Pré-dose Dia 7

Figura 33B

CD19-M18, 30 mg/kg



Pré-dose Dia 7

Figura 33C

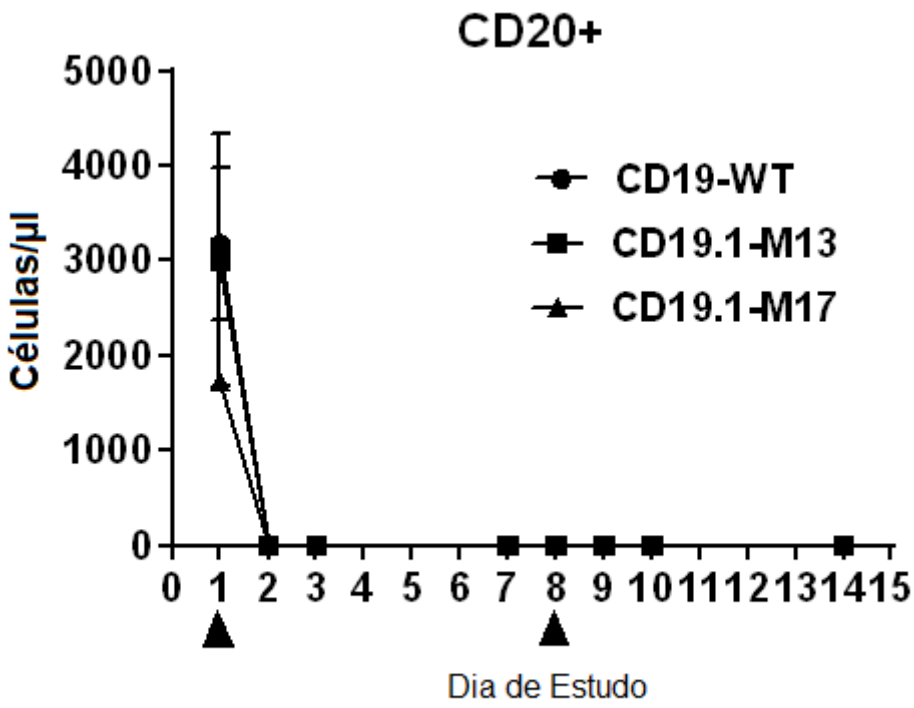


Figura 34

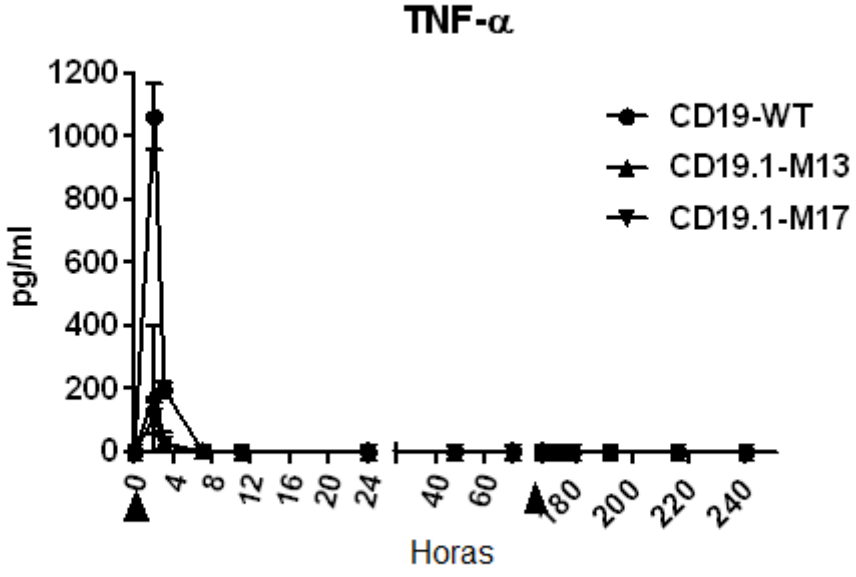


Figura 35A

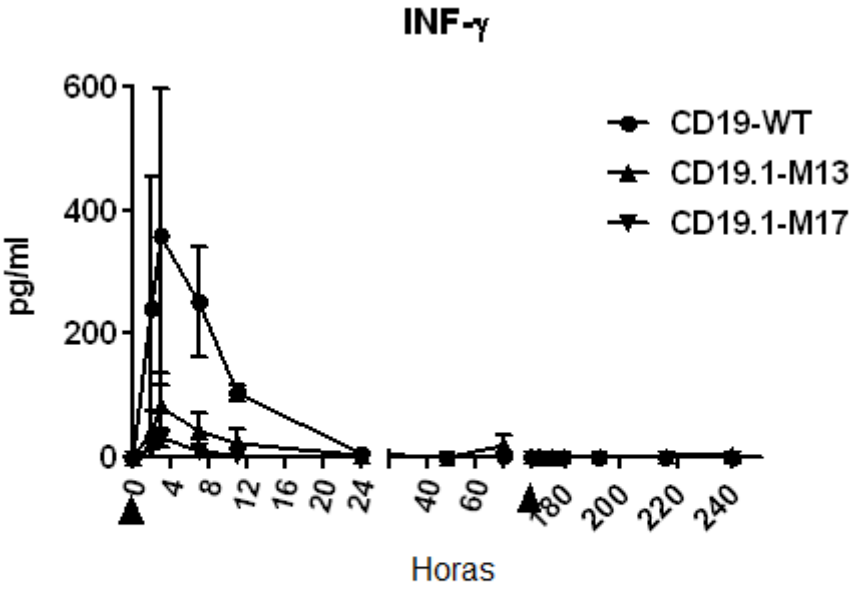


Figura 35B

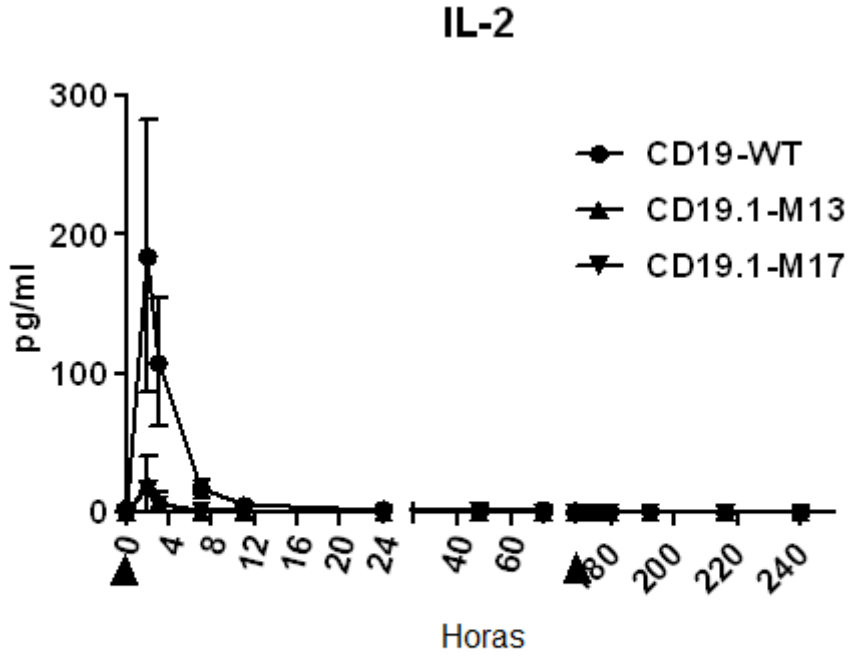


Figura 35C

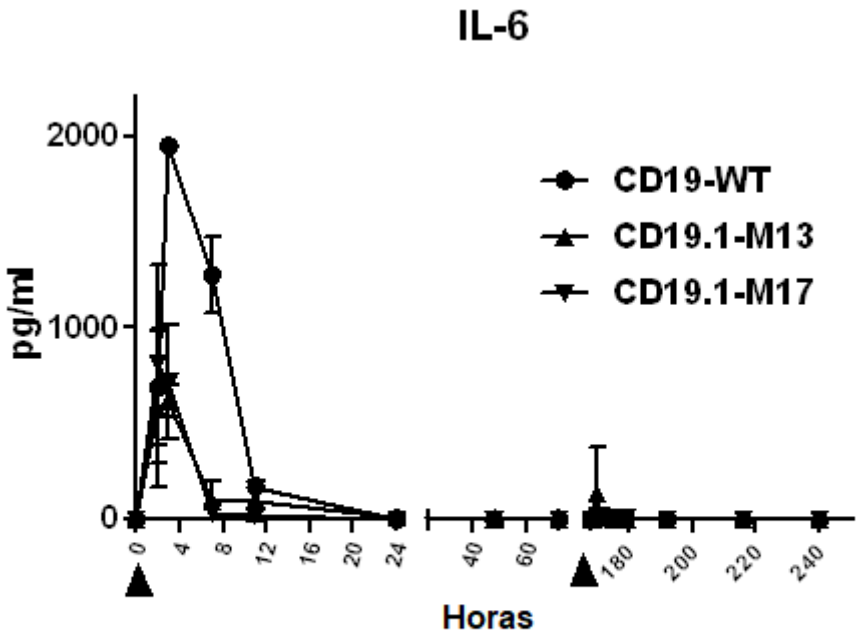


Figura 35D

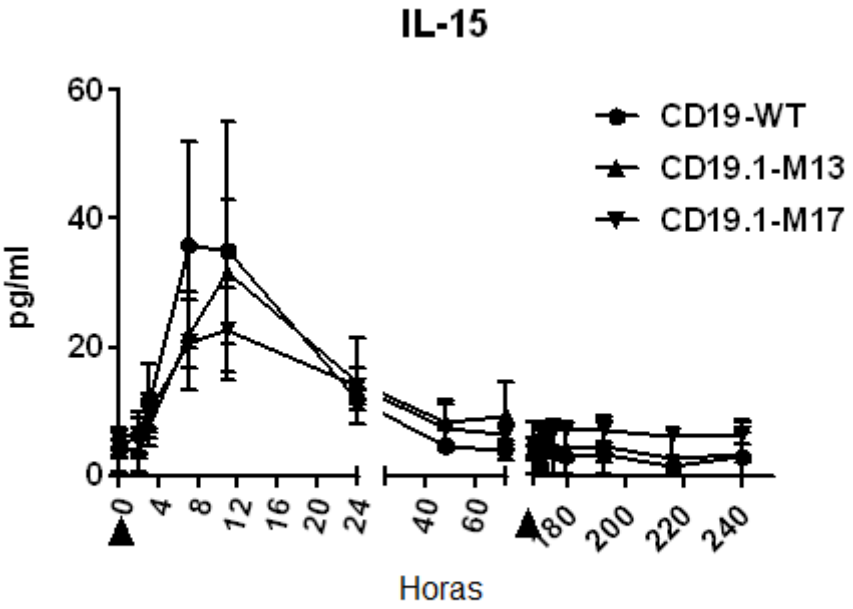


Figura 35E

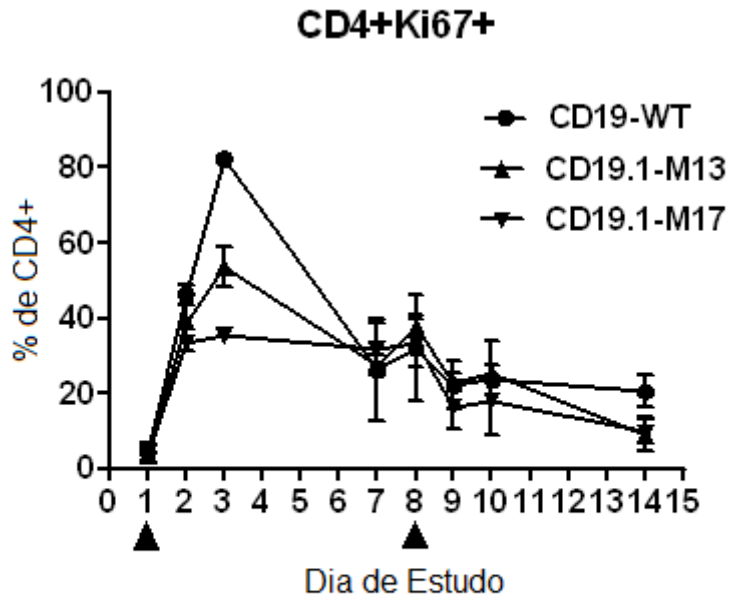


Figura 36A

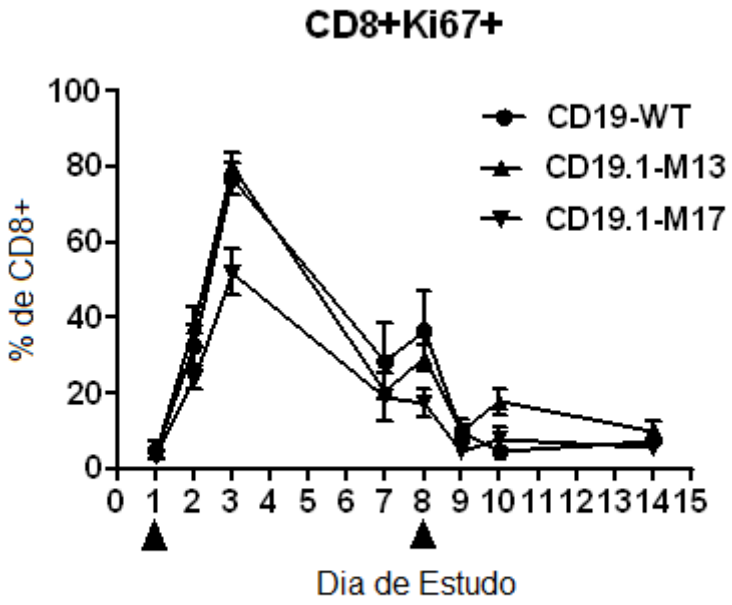


Figura 36B

RESUMO

MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA

A presente invenção é direcionada a moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3, que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2, um domínio CDR_H3, um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3, pelo menos um dentre os quais difere em sequência de aminoácidos a partir da sequência de aminoácidos do CDR correspondente de um domínio de ligação rCD3, em que a molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação vCD3 exibe uma afinidade alterada para CD3, em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende tal domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente a tais moléculas de ligação DA x CD3 que compreendem um domínio de ligação vCD3 que exibe afinidade reduzida para CD3 e são capazes de mediar morte redirecionada de células alvo que expressa uma DA e exibe baixos níveis de liberação de citoquina em relação a uma molécula de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação rCD3. A invenção se refere particularmente ao uso de moléculas de ligação DA x CD3 que compreende um domínio de ligação vCD3 no tratamento de câncer e doenças associadas a patógenos. A presente invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que compreende tal molécula (ou moléculas).

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: IPI7045_Listagem de Sequências_(GSG).txt
- Data de Geração do Código: 13/08/2020
- Hora de Geração do Código: 11:50:49
- Código de Controle:
    - Campo 1: 370EADBD5A31B6B0
    - Campo 2: 208F6A93E3F3AA3D