



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

(21) BR 112019028180-0 A2



\* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 8 1 8 0 A 2 \*

(22) Data do Depósito: 30/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/07/2020

(54) Título: ANTICORPOS COM DOMÍNIOS FUNCIONAIS NA REGIÃO DO COTOVELO ENTRE OS DOMÍNIOS VARIÁVEL E CONSTANTE

(51) Int. Cl.: C07K 16/24; C07K 16/16; C07K 16/00; C07K 14/705; C07K 16/10; (...).

(30) Prioridade Unionista: 31/07/2017 EP PCT/EP2017/069357.

(71) Depositante(es): INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE.

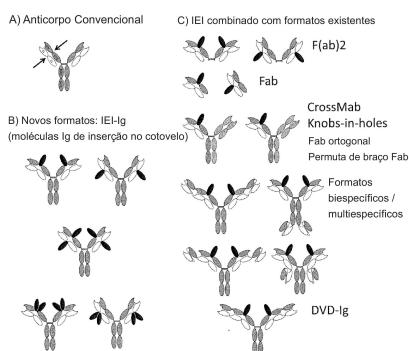
(72) Inventor(es): ANTONIO LANZAVECCHIA; LUCA PICCOLI.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018070640 de 30/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/025391 de 07/02/2019

(85) Data da Fase Nacional: 30/12/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a anticorpos modificados e fragmentos de ligação ao antígeno, nos quais um domínio funcional adicional é inserido na região do cotovelo do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico, tais como vetores, que codificam tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, células hospedeiras e composições compreendendo tais anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno ou moléculas de ácido nucleico e suas utilizações. Por exemplo, é fornecido um formato de anticorpo multiespecífico, no qual um sítio de ligação adicional (especificidade) é inserido na região do cotovelo de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"ANTICORPOS COM DOMÍNIOS FUNCIONAIS NA REGIÃO DO COTOVELO ENTRE OS DOMÍNIOS VARIÁVEL E CONSTANTE".**

[0001] A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos manipulados com um domínio funcional adicional, como formatos de anticorpos multiespecíficos. Em particular, a presente invenção refere-se a anticorpos manipulados, nos quais um domínio funcional adicional é inserido na região do cotovelo do anticorpo. Por conseguinte, por exemplo, é fornecido um formato de anticorpo multiespecífico, no qual um sítio de ligação adicional (especificidade) é inserido na região do cotovelo de um anticorpo.

[0002] Nos últimos anos, surgiu uma variedade de formatos de anticorpos multiespecíficos, com base na engenharia molecular de anticorpos de ocorrência natural clássicos, como a IgG, que se ligam especificamente a um tipo de antígeno. Ao contrário dos anticorpos clássicos de ocorrência natural, como IgG, os anticorpos multiespecíficos são capazes de se ligar a dois ou mais alvos distintos, oferecendo, assim, um amplo espectro de aplicações.

[0003] Anticorpos clássicos de ocorrência natural são moléculas em forma de Y compreendendo quatro cadeias de polipeptídeos: duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (Fig. 1A). Cada cadeia leve consiste em dois domínios, sendo o domínio de N-terminal conhecido como variável ou domínio VL e o domínio C-terminal sendo conhecido como domínio constante ou CL. Cada cadeia pesada consiste em quatro ou cinco domínios, dependendo da classe do anticorpo. O domínio de N-terminal de cadeia pesada é conhecido como domínio variável ou VH. O próximo domínio na direção do terminal N-C é conhecido como o primeiro domínio constante ou CH1. A próxima parte de cadeia pesada é conhecida como região de articulação, que é normalmente seguida pelo segundo, terceiro e, em alguns casos, quarta constante ou

domínios CH2, CH3 e CH4, respectivamente. A região constante, que compreende os domínios constantes, é idêntica em todos os anticorpos do mesmo isótipo, porém difere nos anticorpos de diferentes isótipos. As cadeias pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\delta$  têm uma região constante composta por três domínios de Ig em tandem (em uma linha) e uma região de articulação para flexibilidade realçada; cadeias pesadas  $\mu$  e  $\varepsilon$  têm uma região constante composta por quatro domínios de imunoglobulina.

[0004] Além da região de articulação, também a região do cotovelo é conhecida por fornecer flexibilidade para a ligação ao antígeno. A região do cotovelo é a junção entre os domínios variáveis e os domínios constantes nas cadeias pesada e leve do anticorpo. Tipicamente, o C-terminal do domínio variável (VH ou VL) está diretamente ligado ao N-terminal do domínio constante mais N-terminal (tipicamente CH1 ou CL) e à junção entre à terminação C do domínio variável (VH ou VL) e a N-terminal do domínio constante mais N-terminal (normalmente CH1 ou CL) é referida como "cotovelo" ou "região do cotovelo". A região do cotovelo permite dobrar e girar os domínios variáveis relativos aos domínios constantes. A região do cotovelo também é referida como "articulação molecular da rótula" com base na amplitude de movimento fornecida pela região do cotovelo (Lesk AM, Chothia C. O movimento do cotovelo nas imunoglobulinas envolve uma articulação molecular da rótula. *Nature*, 8 de setembro de 1988; 335 (6186): 188-90).

[0005] Em um anticorpo montado, os domínios VL e VH se associam para formar um sítio de ligação ao antígeno. Além disso, os domínios CL e CH1 se associam para manter uma cadeia pesada associada a uma cadeia leve. Cada região de articulação de cadeia pesada inclui pelo menos um, e frequentemente diversos, resíduos de cisteína. No anticorpo montado, os resíduos de cisteína nas cadeias pesadas são alinhados de modo que as ligações de dissulfeto possam ser formadas entre os resíduos de cisteína nas regiões de articulação,

ligando covalentemente os dois heterodímeros de cadeia pesada-leve entre si. Desse modo, os anticorpos completamente montados são monoespecíficos na medida em que se ligam a um tipo de antígeno e bivalentes na medida em que têm dois sítios de ligação ao antígeno independentes.

[0006] Com base na estrutura de tais anticorpos de ocorrência natural clássicos bivalentes monoespecíficos, uma variedade de formatos de anticorpo multiespecífico (para revisão, ver Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Formatos moleculares alternativos e aplicações terapêuticas para anticorpos biespecíficos. Mol Immunol. Outubro de 2015; 67 (2 Pt A): 95-106 e Weidle UH, Tiefenthaler G, Weiss EH, Georges G, Brinkmann U. As opções intrigantes de formatos multiespecíficos de anticorpos para o tratamento do câncer. Cancer Genomics Proteomics. 2013 Jan-Feb; 10 (1 ): 1-18). Em geral, os formatos de anticorpos multiespecíficos da técnica anterior podem ser classificados em cinco grupos estruturais distintos: (i) IgG multiespecífico, (ii) IgG anexado, (iii) fragmentos de anticorpo multiespecífico, (iv) proteínas de fusão multiespecíficas e (v) conjugados de anticorpos multiespecíficos (Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Formatos moleculares alternativos e aplicações terapêuticas para anticorpos biespecíficos. Mol Immunol. Outubro 2015; 67 (2 Pt A): 95-106).

[0007] Os formatos multiespecíficos de anticorpos IgG são tipicamente monovalentes para cada especificidade (antígeno). As tentativas iniciais de acoplar as especificidades de ligação de dois anticorpos inteiros contra抗ígenos-alvo diferentes para propósitos terapêuticos utilizaram moléculas de heteroconjugado quimicamente fundidas (Staerz *et al.* (1985), *Nature* 314: 628-631). Os anticorpos biespecíficos foram produzidos de hibridomas híbridos por técnicas de hetero-hibridoma (Milstein & Cuello (1983) *Nature* 305: 537-540). Os

formatos multiespecíficos de anticorpos IgG incluem CrossMab, DAF (dois em um), DAF (quatro em um), DutaMab, DT-IgG, LC comum em puxadores em orifícios, montagem de puxadores em orifícios, par de carga, permuta de braço-Fab, corpo SEED, Triomab, LUZ-Y, Fcab, corpo- $\kappa\gamma$  e Fab ortogonal, por exemplo, como descrito em Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Formatos moleculares alternativos e aplicações terapêuticas para anticorpos biespecíficos. Mol Immunol. Outubro de 2015; 67 (2 Pt A): 95-106.

[0008] Nos formatos de anticorpos IgG anexos, a IgG monoespecífica clássica é modificada anexando porções de ligação ao antígeno adicionais à N-terminal e / ou C da cadeia pesada e / ou leve. Exemplos de tais porções de ligação ao antígeno adicionais incluem anticorpos de domínio único (VH ou VL não pareados), domínios variáveis de anticorpos pareados, como Fv ou scFv, ou estruturas de proteínas modificadas. Os formatos de anticorpo IgG anexados incluem DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig e Zybody, por exemplo, como descrito em Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Formatos moleculares alternativos e aplicações terapêuticas para anticorpos biespecíficos. Mol Immunol. Outubro de 2015; 67 (2 Pt A): 95-106. DVI-IgG (quatro em um) é um formato de anticorpo IgG anexado combinado com um formato de anticorpo IgG multiespecífico, como descrito acima. Uma vantagem potencial dos formatos IgG multiespecíficos anexados é que eles podem permitir a ligação simultânea do antígeno a todos os domínios variáveis e, portanto, fornecer uma capacidade de ligação específica mais alta.

[0009] Os fragmentos de anticorpos multiespecíficos tipicamente não possuem um ou mais domínios constantes em comparação com os anticorpos de ocorrência natural. Fragmentos de anticorpos multiespecíficos incluem nanocorpos; nanocorpo-HAS; BiTEs;

diacorpos; DART; TandAb; scDiaCORPOS; sc-Diabody-CH3; Diacorpo-CH3; Corpos Triplos; Mini-anticorpos; Minicorpos; Minicorpos TriBi; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')2; F(ab')<sub>2</sub>-scFv2; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; HCAb tetravalente; scDiacorpo-Fc; Diacorpo-Fc; ScFv-Fc em tandem; e intracorpos, como descrito, por exemplo, em Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Formatos moleculares alternativos e aplicações terapêuticas para anticorpos biespecíficos. Mol Immunol. Outubro de 2015; 67 (2 Pt A): 95-106. As proteínas de fusão multiespecíficas incluem Dock e Lock; ImmTAC; HSAbody; scDiabody-HAS; e scFv-Toxina em tandem, como descrito por exemplo em Spiess C., Zhai Q. e Carter P.J. (2015) Molecular Immunology 67: 95-106, em particular a Fig. 1 e a descrição correspondente, por exemplo, por exemplo, 95 - 101. Os conjugados multiespecíficos de anticorpos incluem IgG-IgG; Cov-X-Body; e scFv1-PEG-scFv2, como descrito, por exemplo, em Spiess C., Zhai Q. e Carter P.J. (2015) Molecular Immunology 67: 95-106, em particular a Fig. 1 e a descrição correspondente, por exemplo, p. 95 - 101.

[0010] Tipicamente, o formato do anticorpo é escolhido dependendo da aplicação prevista. Por exemplo, uma meia-vida farmacológica longa é desejável para muitas aplicações. É comumente realizado incluindo uma região Fc - enquanto para outras aplicações uma meia-vida curta (e, desse modo, nenhuma região Fc) pode ser vantajosa. Além disso, os rendimentos da produção podem desempenhar um papel, em particular porque a produção de formatos multiespecíficos de anticorpos IgG por coexpressão das duas cadeias leve e pesada distintas em uma única célula hospedeira é conhecida ser altamente desafiadora e pode resultar em anticorpos mal pareados, que podem ser difíceis de remover. Além disso, muitos formatos de anticorpo, tais como os formatos de anticorpo IgG anexados, tipicamente requerem ligantes para fornecer flexibilidade suficiente para ligação simultânea de

antígenos distintos – porém a natureza flexível dos ligantes pode torná-los mais propensos à clivagem proteolítica, potencialmente levando a uma pobre estabilidade de anticorpo, agregação e imunogenicidade aumentada. É importante notar que, para certas aplicações, a estabilidade do anticorpo pode ser mais importante que a capacidade de ligação ou vice-versa, dependendo da aplicação. Além disso, o formato do anticorpo pode ser escolhido dependendo da especificidade, ou seja, certos sítios de ligação ao antígeno atingem melhores rendimentos de produção, estabilidade e / ou valores de ligação em um determinado formato de anticorpo - enquanto outras especificidades alcançam melhores características em outros formatos de anticorpo (por exemplo, devido ao tamanho / estrutura / natureza do antígeno-alvo).

[0011] Por conseguinte, existe a necessidade de outros formatos de anticorpo que proporcionem características distintas. Em vista disso, é o objetivo da presente invenção fornecer um novo formato de anticorpo com funcionalidades adicionais, por exemplo, anticorpos multiespecíficos ou anticorpos modificados para fornecer uma funcionalidade adicional, tal como uma funcionalidade repórter, uma funcionalidade de translocação ou uma funcionalidade veículo. O novo formato de anticorpo pode opcionalmente ser combinado com formatos de anticorpos conhecidos, por exemplo, para obter anticorpos com múltiplos sítios de ligação ou anticorpos biespecíficos com funcionalidades adicionais. Esses objetivos são alcançados por meio da matéria-objeto descrita abaixo e nas reivindicações anexas.

[0012] Embora a presente invenção seja descrita em detalhes abaixo, deve ser entendido que esta invenção não está limitada às metodologias, protocolos e reagentes particulares aqui descritos, pois estes podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia aqui utilizada não se destina a limitar o escopo da presente invenção que será limitado apenas pelas reivindicações anexas. A menos que

definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm os mesmos significados que são comumente entendidos por alguém versado na técnica.

[0013] A seguir, os elementos da presente invenção serão descritos. Esses elementos são listados com modalidades específicas, no entanto, deve-se entender que eles podem ser combinados de qualquer maneira e em qualquer número para criar modalidades adicionais. Os exemplos descritos de maneira diversa e modalidades preferidas não devem ser manipulados para limitar a presente invenção apenas às modalidades explicitamente descritas. Esta descrição deve ser entendida sustentar e abranger modalidades que combinam as modalidades explicitamente descritas com qualquer número dos elementos descritos e / ou preferidos. Além disso, quaisquer permutações e combinações de todos os elementos descritos neste pedido devem ser consideradas divulgadas pela descrição do presente pedido, a menos que o contexto indique de outro modo.

[0014] Ao longo deste relatório descritivo e das reivindicações que seguem, a menos que o contexto requeira de outra forma, o termo "compreender" e variações tais como "compreende" e "compreendendo" serão entendidos como implicando a inclusão de um membro, número inteiro ou etapa, porém não a exclusão de qualquer outro membro, número inteiro ou etapa não declarado. O termo "consistir em" é uma modalidade específica do termo "compreender", em que qualquer outro membro, número inteiro ou etapa não declarado é excluído. No contexto da presente invenção, o termo "compreender" abrange o termo "consistir em". O termo "compreendendo" desse modo abrange "incluso" bem como "consistindo", por exemplo, uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

[0015] Os termos "um, uma (a)" e "um, uma (an)" e "o, a" e

referência similar usados no contexto da descrição da invenção (especialmente no contexto das reivindicações) devem ser interpretados para abranger tanto o singular quanto o plural, a menos que indicado de outra forma aqui ou claramente contradito pelo contexto. A menção de faixas de valores neste documento destina-se apenas a servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado dentro da faixa. A menos que indicado de outra forma aqui, cada valor individual é incorporado no relatório descritivo, como se fosse aqui mencionado individualmente. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado essencial para a prática da invenção.

[0016] A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Onde necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

[0017] O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x significa  $x \pm 10\%$ .

[0018] Como usado neste documento, os termos "peptídeo", "polipeptídeo", "proteína" se referem a peptídeos, oligopeptídeos ou proteínas incluindo proteínas de fusão, respectivamente, compreendendo pelo menos dois aminoácidos unidos entre si, preferivelmente por uma ligação de peptídeo normal, ou, alternativamente, por uma ligação de peptídeo modificada, tal como, por exemplo, nos casos de peptídeos isostéricos. Em particular, os termos "peptídeo", "polipeptídeo", "proteína" também incluem "peptidomiméticos", que são definidos como análogos de peptídeo contendo elementos estruturais não peptídicos, cujos peptídeos são capazes de imitar ou antagonizar a(s) ação(ões) biológica(s)(s) de um peptídeo parental natural. Um peptidomimético carece de

características peptídicas clássicas, tais como ligações peptídicas enzimaticamente cindíveis. Um peptídeo, polipeptídeo ou proteína pode ser composto de qualquer um dos 20 aminoácidos definidos pelo código genético. Além disso, um peptídeo, polipeptídeo ou proteína também pode compreender aminoácidos além dos 20 aminoácidos definidos pelo código genético, além desses aminoácidos, ou pode ser composto de aminoácidos além dos 20 aminoácidos definidos pelo código genético. Em particular, um peptídeo, polipeptídeo ou proteína no contexto da presente invenção pode igualmente ser composto de aminoácidos modificados por processos naturais, tais como processos de maturação pós-translacionais ou por processos químicos, que são bem conhecidos por uma pessoa versada na técnica. Tais modificações são totalmente detalhadas na literatura. Essas modificações podem aparecer em qualquer lugar do polipeptídeo: no esqueleto do peptídeo, na cadeia de aminoácidos ou mesmo nas extremidades carbóxi- ou amino-terminais. Em particular, um peptídeo ou polipeptídeo pode ser ramificado após uma ubiquitinação ou ser cíclico com ou sem ramificação. Este tipo de modificação pode ser o resultado de processos pós-translacionais naturais ou sintéticos que são bem conhecidos por uma pessoa versada na técnica. Os termos "peptídeo", "polipeptídeo", "proteína" no contexto da presente invenção, em particular, também incluem peptídeos, polipeptídeos e proteínas modificados. Por exemplo, modificações de peptídeo, polipeptídeo e proteína podem incluir acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, fixação covalente de um nucleotídeo ou de um derivado de nucleotídeo, fixação covalente de um lipídeo ou de um derivado lipídico, a fixação covalente de um fosfatidilinositol, reticulação covalente ou não covalente, ciclização, formação de ligação dissulfeto, desmetilação, glicosilação incluindo pegilação, hidroxilação, iodização, metilação, miristoilação, oxidação, processos proteolíticos, fosforilação, prenilação, racemização,

seneloilação, sulfatação, adição de aminoácidos, como arginilação ou ubiquitinação. Tais modificações são totalmente detalhadas na literatura (*Proteins Structure and Molecular Properties* (1993) 2<sup>a</sup> Ed., T. E. Creighton, Nova York; *Post-translational Covalent Modifications of Proteins* (1983) BC Johnson, Ed., Academic Press, Nova York; Seifter *et al.* (1990) *Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors*, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646 e Rattan *et al.*, (1992) *Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging*, *Ann NY Acad Sci*, 663: 48-62). Por conseguinte, os termos "peptídeo", "polipeptídeo", "proteína" incluem preferivelmente, por exemplo, lipopeptídeos, lipoproteínas, glicopeptídeos, glicoproteínas e similares.

[0019] De preferência, no entanto, uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo é um peptídeo, polipeptídeo ou proteína "clássico", pelo qual um peptídeo, polipeptídeo ou proteína "clássico" é tipicamente composto de aminoácidos selecionados dentre os 20 aminoácidos definidos pelo código genético, ligados entre si por uma ligação de peptídeo normal.

[0020] O termo "primeira cadeia de polipeptídeo", conforme utilizado neste documento, refere-se a um polipeptídeo que deve ser associado a um segundo polipeptídeo (a "segunda cadeia de polipeptídeo"). Em particular, a primeira e a segunda cadeias de polipeptídeo estão associadas através de uma ligação dissulfeto. A primeira cadeia de polipeptídeo pode compreender um, dois, três domínios constantes pesados de anticorpos. Em uma modalidade preferida, compreende três domínios constantes pesados de anticorpo: CH1, CH2 e CH3 e uma região de articulação entre CH1 e CH2. Os referidos domínios constantes de cadeia pesada podem ser derivados de um anticorpo murino, quimérico, sintético, humanizado ou humano e monoclonal ou policlonal. A primeira cadeia de polipeptídeo pode compreender um ou mais domínios variáveis, preferivelmente domínios

variáveis de uma cadeia pesada de anticorpo.

[0021] O termo "segunda cadeia de polipeptídeo", conforme utilizado neste documento, refere-se a um polipeptídeo que deve ser associado ao primeiro polipeptídeo (a "primeira cadeia de polipeptídeo"). Em particular, a primeira e a segunda cadeias de polipeptídeo estão associadas por meio de uma ligação dissulfeto. A segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender uma região constante da cadeia leve de anticorpo CL. A referida região constante da cadeia leve pode ser derivada de um anticorpo que é murino, quimérico, sintético, humanizado ou humano e monoclonal ou policlonal. A segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender um ou mais domínios variáveis, preferivelmente domínios variáveis de uma cadeia leve de anticorpo.

[0022] Em geral, um "anticorpo" é uma proteína que se liga especificamente a um antígeno. Tipicamente, um anticorpo compreende uma estrutura única que possibilita que se ligue especificamente a seu antígeno correspondente, porém - em geral - os anticorpos têm uma estrutura similar e são, em particular, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig). Como usado aqui, o termo "anticorpo" abrange várias formas de anticorpos, incluindo, sem se limitar a, anticorpos inteiros, fragmentos de anticorpo, em particular, fragmentos de ligação a antígeno, anticorpos humanos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos recombinantes e anticorpos geneticamente modificados (variante ou anticorpos mutantes) desde que as propriedades características de acordo com a invenção sejam mantidas. Embora o relatório descritivo, incluindo as reivindicações, possa, em alguns lugares, se referir explicitamente a fragmento(s) de ligação a antígeno, fragmento(s) de anticorpo, variante(s) e / ou derivado(s) de anticorpos, entende-se que o termo "anticorpo" inclui todas as categorias de anticorpos, a saber, fragmento(s) de ligação ao antígeno,

fragmento(s) do anticorpo, variante(s) e derivado(s) dos anticorpos.

[0023] Como usado neste documento, os termos "fragmento de ligação a antígeno", "fragmento" e "fragmento de anticorpo" são usados alternadamente para se referir a qualquer fragmento de um anticorpo da invenção que retenha (i) a atividade de ligação ao antígeno do anticorpo bem como (ii) a funcionalidade adicional fornecida pelo domínio funcional (adicional), por exemplo, uma atividade de ligação fornecida por um sítio de ligação (independente). Nos fragmentos de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção, as propriedades características de acordo com a invenção são mantidas. Em geral, exemplos de fragmentos de anticorpos incluem, porém não estão limitados a um anticorpo de cadeia única, Fab, Fab' ou F(ab')<sub>2</sub>. Fragmentos dos anticorpos podem ser obtidos de anticorpos por métodos que incluem digestão com enzimas, tal como pepsina ou papaína, e / ou por clivagem de ligações de dissulfeto por redução química. Alternativamente, os fragmentos dos anticorpos podem ser obtidos por clonagem e expressão de parte das sequências das cadeias pesada ou leve. Além disso, o termo "anticorpo", conforme usado neste documento, inclui tanto anticorpos, quanto fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos.

[0024] O termo "anticorpo humano", como utilizado neste documento, destina-se a incluir anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina humana. Os anticorpos humanos são bem conhecidos no estado da técnica (van Dijk, M. A. e van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Os anticorpos humanos podem também ser produzidos em animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, após a imunização, de produzir um repertório completo ou uma seleção de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. A transferência da matriz de gene de imunoglobulina da linha

germinativa humana em tais camundongos mutantes da linha germinativa resultará na produção de anticorpos humanos após desafio de antígeno (ver, por exemplo, Jakobovits, A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., *et al.*, *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., *et al.*, *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Anticorpos humanos podem também ser produzidos em bibliotecas de exibição de fago (Hoogenboom, HR e Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, JD, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). As técnicas de Cole *et al.* e Boerner *et al.* também estão disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, por exemplo, 77 (1985); e Boerner, P., *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). De preferência, anticorpos monoclonais humanos são preparados usando a imortalização de célula EBV-B melhorada, como descrito em Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): Um método eficiente para produzir anticorpos monoclonais humanos de células B de memória: neutralização potente de coronavírus SARS. *Nat Med.* 10(8):871-5. O termo "anticorpo humano", conforme usado neste documento, também compreende tais anticorpos que são modificados para gerar as propriedades de acordo com a invenção, como descrito neste documento.

[0025] Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser fornecidos em forma purificada. Por conseguinte, o anticorpo de acordo com a presente invenção, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, pode ser um anticorpo purificado ou fragmento de ligação a antígeno. Tipicamente, o anticorpo estará presente em uma composição que é substancialmente livre de outros polipeptídeos, por exemplo, onde menos de 90% (em peso), geralmente menor que 60% e mais geralmente menor que 50% da composição é composta de outros

polipeptídeos.

[0026] Como usado neste documento, o termo "domínio variável" (também referido como "região variável"; domínio variável de uma cadeia leve (VL), domínio variável de uma cadeia pesada (VH)) refere-se ao domínio de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que é o domínio de N-terminal nos anticorpos clássicos de ocorrência natural, tipicamente o domínio que fornece a maior variabilidade nos anticorpos clássicos de ocorrência natural e que está envolvido diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Tipicamente, os domínios de cadeias leves e pesadas humanas variáveis têm a mesma estrutura geral e cada domínio compreende regiões de estrutura (FR) cujas sequências são amplamente conservadas (em particular quatro regiões de estrutura (FR)) e três "regiões hipervariáveis" ou regiões determinantes de complementaridade, CDRs (em particular três "regiões hipervariáveis" / CDRs). As regiões de estrutura adotam tipicamente uma conformação de folha  $\beta$  e as CDRs podem formar alças que conectam a estrutura da folha  $\beta$ . As CDRs em cada cadeia geralmente são mantidas em sua estrutura tridimensional pelas regiões estruturais e formam junto com as CDRs da outra cadeia o sítio de ligação ao antígeno.

[0027] Como usado neste documento, o termo "região hipervariável" refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende as "regiões determinantes da complementaridade" ou "CDRs". As regiões de "Estrutura" ou "FR" são aquelas regiões de domínio variável que não sejam os resíduos da região hipervariável, como aqui definido. As regiões CDR e FR podem ser determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> ed., Serviço de Saúde Pública, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991). Tipicamente, em

particular em anticorpos IgG monoespecíficos nativos, as três CDRs (CDR1, CDR2 e CDR3) são dispostas não consecutivamente no domínio variável. Em outras palavras, as CDRs na cadeia pesada e / ou leve podem ser separadas, por exemplo, por regiões estruturais, em que uma região estrutural (FR) é uma região no domínio variável que é menos "variável" do que a CDR. Por exemplo, em um anticorpo, um domínio variável (ou cada domínio variável, respectivamente) pode preferivelmente compreender quatro regiões estruturais, separadas por três CDRs. Em particular, um domínio variável de um anticorpo (domínio variável de cadeia leve ou pesada VH ou VL) compreende do terminal N ao C os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As CDRs em cada cadeia são separadas por tais aminoácidos estruturais. Geralmente, as três CDRs de uma cadeia pesada e as três CDRs da cadeia leve conectada formam juntas o sítio de ligação ao antígeno (parátopo). Em outras palavras, uma vez que, em particular, em anticorpos IgG monoespecíficos nativos sítios de ligação a抗ígenos são tipicamente compostos por dois domínios variáveis, existem seis CDRs para cada sítio de ligação a抗ígeno (cadeia pesada: CDRH1, CDRH2 e CDRH3; cadeia leve: CDRL1, CDRL2, e CDRL3). Um único anticorpo, em particular, um único anticorpo IgG monoespecífico nativo, geralmente possui dois sítios de ligação ao antígeno (idênticos) e, portanto, contém doze CDRs (isto é, 2 x seis CDRs).

[0028] Devido à sua "multiespecificidade", ou seja, os diferentes sítios de ligação ao antígeno, a cadeia pesada e / ou a cadeia leve de anticorpos multiespecíficos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem (cada) compreender mais de três CDRs, em particular mais de três CDRs diferentes. Por exemplo, um anticorpo multiespecífico, ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo, pode compreender pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada um dos referidos pelo menos dois domínios variáveis diferentes é

derivado de um anticorpo monoespecífico diferente, por exemplo, do tipo IgG. Uma vez que tal anticorpo monoespecífico compreende tipicamente três CDRs na cadeia pesada e três CDRs na cadeia leve que formam o sítio de ligação ao antígeno, um anticorpo multiespecífico de acordo com a presente invenção pode, em particular, compreender três CDRs de uma cadeia pesada de um primeiro anticorpo e três CDRs de uma cadeia leve de um primeiro anticorpo, três CDRs de uma cadeia pesada de um segundo anticorpo e três CDRs de uma cadeia leve de um segundo anticorpo, opcionalmente três CDRs de uma cadeia pesada de um terceiro anticorpo e três CDRs de uma cadeia leve de um terceiro anticorpo etc. Desse modo, o número de CDRs compreendidas por uma cadeia pesada e / ou uma cadeia leve de um anticorpo multiespecífico é preferivelmente um múltiplo de três, por exemplo, três, seis, nove, doze, etc. É desse modo também preferido que a soma das CDRs compreendidas por ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo multiespecífico seja um múltiplo de seis, por exemplo, seis, doze, dezoito, etc. Uma vez que um "sítio de ligação ao antígeno" é tipicamente caracterizado pelas CDRs, isto é, CDRH1, CDRH2 e CDRH3, bem como CDRL1, CDRL2 e CDRL3, é preferido nos anticorpos multiespecíficos de acordo com a presente invenção que as CDRs estejam dispostas de modo que a ordem (por exemplo, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e / ou CDRL1, CDRL2 e CDRL3 derivados do mesmo anticorpo monoespecífico) seja mantida para preservar o sítio de ligação ao antígeno, isto é, preservar a capacidade de se ligar especificamente a um determinado sítio no antígeno. Isto significa que, por exemplo, a ordem de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 derivada de um primeiro anticorpo monoespecífico em um estiramento de aminoácido preferivelmente não interrompido por qualquer CDR derivada de um segundo anticorpo monoespecífico. Importantemente, se o anticorpo multipecífico compreender sítios de ligação ao antígeno derivados de pelo menos

dois anticorpos monoespécíficos diferentes, as CDRs ou domínios variáveis desses anticorpos monoespécíficos serão dispostos no anticorpo multipecífico de acordo com a presente invenção, de modo que o "receptor de antígeno" de cada anticorpo monoespécífico do qual as CDRs (ou regiões variáveis) são derivadas, seja preservado, isto é, sua capacidade de se ligar especificamente a um determinado sítio no antígeno seja preservada.

[0029] No contexto da presente invenção, um domínio variável pode ser qualquer domínio variável (em particular, VH e / ou VL) de um anticorpo de ocorrência natural ou um domínio variável pode ser um domínio variável modificado / manipulado. Os domínios variáveis modificados / manipulados são conhecidos na técnica. Tipicamente, os domínios variáveis são modificados / manipulados para excluir ou adicionar uma ou mais funções, por exemplo, mutações somáticas de "linha germinativa" ("removendo" mutações somáticas) ou por humanização.

[0030] Como usado neste documento, o termo "domínios constantes" refere-se a domínios de um anticorpo que não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, porém exibem várias funções efetoras. Tipicamente, uma cadeia pesada compreende três ou quatro domínios constantes, dependendo da classe de imunoglobulina: CH1, CH2, CH3 e, opcionalmente, CH4 (na direção N-C-terminal). Por conseguinte, a região constante de uma cadeia pesada é tipicamente formada (na direção N-C-terminal) por: CH1 - articulação (polipeptídeo flexível que compreende os aminoácidos entre o primeiro e o segundo domínios constantes da cadeia pesada) - CH2 - CH3 (- CH4). Uma cadeia leve tipicamente compreende apenas um único domínio constante, referido como CL, que tipicamente também forma a região constante da cadeia leve. No contexto da presente invenção, um domínio constante pode ser

qualquer domínio constante (em particular, CL, CH1, CH2, CH3 e / ou CH4) de um anticorpo de ocorrência natural ou um domínio constante pode ser um domínio constante modificado / manipulado. Os domínios constantes modificados / manipulados são conhecidos na técnica. Tipicamente, os domínios constantes são modificados / manipulados para deletar ou adicionar uma ou mais funções, por exemplo, no contexto da funcionalidade da região Fc. Dependendo da sequência de aminoácido da região constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos ou imunoglobulinas são divididos nas classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e vários destes podem ser ainda divididos em subclasses, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. As regiões constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamadas  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respectivamente. Os anticorpos de acordo com a invenção são preferivelmente do tipo IgG.

[0031] Em geral, os anticorpos podem ser de qualquer isótipo (por exemplo, IgA, IgG, IgM, isto é, uma cadeia pesada  $\alpha$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$ ), porém serão preferivelmente IgG. Dentro do isótipo IgG, os anticorpos podem ser das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, sendo a IgG1 preferida. Os anticorpos podem ter uma cadeia leve  $\kappa$  ou  $\lambda$ .

[0032] Como usado neste documento, o termo "anticorpo recombinante" deve incluir todos os anticorpos, de ocorrência não natural, por exemplo, anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante (por exemplo, fornecendo um ou mais domínios constantes) transfetados em uma célula hospedeira.

[0033] Como usado neste documento, o termo "multiespecífico" no contexto de um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antígeno, refere-se à capacidade do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno se ligar a pelo menos dois epítopos diferentes, por exemplo, em抗ígenos diferentes ou no mesmo antígeno. Desse modo, termos como "biespecífico", "triespecífico", "tetraespecífico" etc. se referem ao

número de epítópos diferentes aos quais o anticorpo pode se ligar. Por exemplo, os anticorpos monoespecíficos convencionais do tipo IgG têm dois sítios de ligação ao antígeno idênticos (parátopos) e, desse modo, podem se ligar apenas a epítópos idênticos (mas não a epítópos diferentes). Um anticorpo multiespecífico, em contraste, tem pelo menos dois tipos diferentes de parátopos / sítios de ligação e podem, desse modo, se ligar a pelo menos dois epítópos diferentes. Como usado neste documento, "parátopo" refere-se a um sítio de ligação ao antígeno do anticorpo. Além disso, uma única "especificidade" pode se referir a um, dois, três ou mais parátopos idênticos em um único anticorpo (o número real de parátopos / sítios de ligação em uma única molécula de anticorpo é referido como "valência"). Por exemplo, um único anticorpo IgG nativo é monoespecífico e bivalente, uma vez que possui dois parátopos idênticos. Por conseguinte, um anticorpo multiespecífico compreende pelo menos dois (distintos) parátopos / sítios de ligação. Desse modo, o termo "anticorpos multiespecíficos" refere-se a anticorpos com mais de um parátopo e a capacidade de se ligar a dois ou mais diferentes epítópos. O termo "anticorpos multiespecíficos" compreende, em particular, anticorpos biespecíficos como definido acima, porém tipicamente também proteína, por exemplo, anticorpo, estruturas, que se ligam em particular a três ou mais epítópos distintos, isto é, anticorpos com três ou mais parátopos / sítios de ligação.

[0034] Em particular, o anticorpo multiespecífico, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, pode compreender dois ou mais parátopos / sítios de ligação, em que alguns parátopos / sítios de ligação podem ser idênticos, de modo que todos os parátopos / sítios de ligação do anticorpo pertençam a pelo menos dois diferentes tipos de parátopos / sítios de ligação e, portanto, o anticorpo tenha pelo menos duas especificidades. Por exemplo, o anticorpo multiespecífico ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo pode compreender quatro parátopos /

sítios de ligação, em que cada dois parátopos / sítios de ligação são idênticos (ou seja, têm a mesma especificidade) e, desse modo, o anticorpo ou fragmento do mesmo é biespecífico e tetravalente (dois parátopos / sítios de ligação idênticos para cada uma das duas especificidades). Desse modo, "uma especificidade" refere-se em particular a um ou mais parátopos / sítios de ligação que exibem a mesma especificidade (o que normalmente significa que um ou mais parátopos / sítios de ligação são idênticos) e, desse modo, "duas especificidades" podem ser realizadas por dois, três, quatro, cinco, seis ou mais parátopos / sítios de ligação, desde que se refiram a apenas duas especificidades. Alternativamente, um anticorpo multiespecífico pode compreender um único parátopo / sítio de ligação para cada (das pelo menos duas) especificidade, isto é, o anticorpo multiespecífico comprehende no total pelo menos dois parátopos / sítios de ligação. Por exemplo, um anticorpo biespecífico comprehende um único parátopo / sítio de ligação para cada uma das duas especificidades, isto é, o anticorpo comprehende no total dois parátopos / sítios de ligação. É também preferido que o anticorpo comprehenda dois parátopos / sítios de ligação (idênticos) para cada uma das duas especificidades, isto é, o anticorpo comprehenda no total quatro parátopos / sítios de ligação. Preferivelmente, o anticorpo comprehende três parátopos / sítios de ligação (idênticos) para cada uma das duas especificidades, isto é, o anticorpo comprehende no total seis parátopos / sítios de ligação.

[0035] Como usado neste documento, o termo "antígeno" refere-se a qualquer substância estrutural que serve como um alvo para os receptores de uma resposta imune adaptiva, em particular como um alvo para anticorpos, receptores de células T e / ou receptores de células B. Um "epítopo", também conhecido como "determinante抗原", é a parte (ou fragmento) de um antígeno que é reconhecido pelo sistema imunológico, em particular por anticorpos, receptores de

células T e / ou receptores de células B. Desse modo, um antígeno tem pelo menos um epítopo, isto é, um único antígeno tem um ou mais epítopos. Um antígeno pode ser (i) um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína, (ii) um polissacarídeo, (iii) um lipídeo, (iv) uma lipoproteína ou um lipopeptídeo, (v) um glicolipídeo, (vi) um ácido nucleico ou (vii) um fármaco de molécula pequena ou uma toxina. Desse modo, um antígeno pode ser um peptídeo, uma proteína, um polissacarídeo, um lipídeo, uma combinação dos mesmos incluindo lipoproteínas e glicolipídios, um ácido nucleico (por exemplo, DNA, siRNA, shRNA, oligonucleotídeos antissenso, DNA isca, plasmídeo) ou um fármaco de molécula pequena (por exemplo, ciclosporina A, paclitaxel, doxorrubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico) ou qualquer combinação dos mesmos. De preferência, o antígeno é selecionado dentre (i) um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína, (ii) um polissacarídeo, (iii) um lipídeo, (iv) uma lipoproteína ou um lipopeptídeo e (v) um glicolipídeo; mais preferivelmente, o antígeno é um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína.

[0036] O termo "sítio de ligação ao antígeno", conforme utilizado neste documento, refere-se à parte do anticorpo que compreende a área que se liga especificamente a, e é complementar à parte ou a totalidade de um antígeno. Nos casos em que um antígeno é grande, um anticorpo pode se ligar apenas a uma parte particular do antígeno, cuja parte é denominada "epítopo". Tipicamente, dois domínios variáveis, em particular um domínio variável de cadeia pesada VH e um domínio variável de cadeia leve VL, associam-se para formar um sítio de ligação a antígeno. Em particular, o sítio de ligação ao antígeno é formado pelas três CDRs do domínio variável de cadeia pesada e pelas três CDRs do domínio variável da cadeia leve juntas, isto é, por seis CDRs, como descrito acima.

[0037] O termo “ligação específica” e referência similar não

abrangem aderência não específica.

[0038] O termo "ligante" (também referido como "espaçador"), como usado neste documento, refere-se a um peptídeo adaptado para conectar domínios distintos de um polipeptídeo ou proteína, tal como um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Os ligantes são conhecidos na técnica e descritos em detalhes, por exemplo, em Reddy Chichili VP, Kumar V, Sivaraman J. Linkers na biologia estrutural das interações proteína-proteína. Protein Science: A Publication of the Protein Society. 2013; 22(2): 153-167). Tipicamente, os ligantes são designados de modo que eles não afetem a funcionalidade. Em particular, um ligante não se liga especificamente a um alvo. Um ligante pode conter quaisquer aminoácidos, os aminoácidos glicina (G) e serina(s) podem ser preferidos. De preferência, o ligante é composto pelos aminoácidos glicina (G) e serina (S) ("ligante-GS"). Se dois ou mais ligantes ocorrerem em um polipeptídeo ou proteína, os ligantes podem ser iguais ou diferir um do outro. Além disso, o ligante pode ter um comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos.

[0039] Como usado neste documento, o termo "ácido nucleico ou molécula de ácido nucleico" destina-se a incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de única fita ou fita dupla.

[0040] Como usado neste documento, os termos "célula", "linhagem celular" e "cultura de células" são usados de alternadamente e todas as tais designações incluem progênie. Desse modo, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula objeto primária e as culturas dela derivadas, sem levar em consideração o número de transferências. Entende-se também que toda progênie pode não ser precisamente idêntica em teor de DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. A progênie variante que tem a mesma

função ou atividade biológica como analisado na célula originalmente transformada está incluída. Onde designações distintas são pretendidas, ficará claro a partir do contexto.

Como usado neste documento, "variante de sequência" (também referida como "variante") refere-se a qualquer alteração em uma sequência de referência, pela qual uma sequência de referência é qualquer uma das sequências listadas nas "Tabelas de sequências e números de SEQ ID" (listagem de sequências), ou seja, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 133. Desse modo, o termo "variante de sequência" inclui variantes de sequência de nucleotídeos e variantes de sequência de aminoácido. De nota, as variantes de sequência aqui referidas são, em particular, variantes de sequência funcionais, isto é, variantes de sequência que mantêm a função biológica, por exemplo, do anticorpo. As funções biológicas mantidas preferidas no contexto da presente invenção incluem (i) a ligação do anticorpo a seus抗ígenos e (ii) a função fornecida pelo domínio funcional (adicional), por exemplo, a ligação de um sítio de ligação (independente) a seu alvo. As variantes de sequência preferidas são, desse modo, variantes de sequência funcionais tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 88%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de referência. A frase "variante de sequência funcional da mesma, com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 88%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência", como usado aqui, significa (i) que a variante de sequência é funcional como descrito aqui e (ii) quanto maior o % de identidade de sequência, mais preferida a variante de sequência. Em outras palavras, a frase "variante de

sequência funcional da mesma, com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 88%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência”, significa em particular que a variante de sequência funcional tem pelo menos 70% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 75% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 80% de identidade de sequência, mais preferivelmente pelo menos 85% de identidade de sequência, mais preferivelmente pelo menos 88% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 92% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 96% de identidade de sequência, particularmente preferível pelo menos 97% de identidade de sequência, particularmente preferível pelo menos 98% de identidade de sequência e mais preferivelmente pelo menos 99% de identidade de sequência para a respectiva sequência de referência.

[0041] O termo “variante de sequência” inclui em particular tais variantes que compreendem mutações e / ou substituições, em comparação com a sequência de referência. Exemplos de variantes de uma sequência da porção Fc incluem, porém não estão limitados a, aqueles que têm uma substituição de L a A na posição CH2 4, CH2 5 ou ambos.

[0042] A identidade de sequência é geralmente calculada em relação ao comprimento total da sequência de referência (isto é, a sequência referida no pedido). A identidade percentual, como aqui referida, pode ser determinada, por exemplo, usando BLAST usando os parâmetros padrão especificados pelo NCBI (o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum

Matriz 62; penalidade de abertura de espaço = 11 e penalidade de extensão de espaço = 1].

[0043] Como utilizado neste documento, uma "variante de sequência nucleotídica" tem uma sequência alterada na qual um ou mais dos nucleotídeos na sequência de referência são deletados, ou substituídos, ou um ou mais nucleotídeos são inseridos na sequência da sequência de nucleotídeo de referência. Os nucleotídeos são aqui referidos pela designação padrão de uma letra (A, C, G ou T). Devido à degeneração do código genético, uma "variante da sequência de nucleotídeo" pode resultar em uma alteração na respectiva sequência de aminoácido de referência, isto é, em uma "variante da sequência de aminoácido" ou não. Variantes de sequência preferidas são tais variantes de sequência de nucleotídeo, que não resultam em variantes de sequência de aminoácido (mutações silenciosas), porém outras mutações não silenciosas também se incluem no escopo, em particular sequências de nucleotídeos mutantes, que resultam em uma sequência de aminoácido, que é pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% de sequência idêntica à sequência de referência.

[0044] Uma "variante da sequência de aminoácido" tem uma sequência alterada na qual um ou mais dos aminoácidos na sequência de referência são deletados ou substituídos, ou um ou mais aminoácidos são inseridos na sequência da sequência de aminoácido de referência. Como resultado das alterações, a variante da sequência de aminoácido tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à sequência de referência, preferivelmente, pelo menos 90% idêntica, mais preferivelmente pelo menos 95% idêntica, mais preferivelmente pelo menos 99% idêntico à sequência de referência. As sequências variantes que são pelo menos 90% idênticas não têm mais do que 10 alterações, isto é, qualquer combinação de deleções,

inserções ou substituições por 100 aminoácidos da sequência de referência.

[0045] Embora seja possível ter substituições de aminoácidos não conservativas, é preferido que as substituições sejam substituições de aminoácidos conservativas, nas quais o aminoácido substituído tem propriedades estruturais ou químicas similares com o aminoácido correspondente na sequência de referência. A título de exemplo, as substituições de aminoácido conservativa envolvem a substituição de um aminoácido alifático ou hidrofóbico, por exemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina, com outro; substituição de um aminoácido contendo hidroxila, por exemplo, serina e treonina, com outro; substituição de um resíduo acídico, por exemplo, ácido glutâmico ou ácido aspártico, com outro; substituição de um resíduo contendo amida, por exemplo, asparagina e glutamina, com outro; substituição de um resíduo aromático, por exemplo, fenilalanina e tirosina, com outro; substituição de um resíduo básico, por exemplo, lisina, arginina e histidina, com outro; e substituição de um pequeno aminoácido, por exemplo, alanina, serina, treonina, metionina e glicina, com outro.

[0046] As inserções de sequência de aminoácido incluem fusões amino- e / ou carboxil-terminais com comprimento variando de um resíduo a polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequenciais de resíduos de aminoácido único ou múltiplo. Exemplos de inserções terminais incluem a fusão ao terminal N ou C de uma sequência de aminoácido a uma molécula-repórter ou uma enzima.

[0047] É importante ressaltar que as alterações nas variantes de sequência não abolem a funcionalidade da respectiva sequência de referência, no presente caso, por exemplo, a funcionalidade de uma sequência de um anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, para se ligar a seus抗ígenos e / ou a funcionalidade adicional

fornecida pelo domínio funcional, por exemplo, para se ligar a um alvo de um site de ligação (independente). As orientações para determinar quais nucleotídeos e resíduos de aminoácidos, respectivamente, podem ser substituídos, inseridos ou deletados sem abolir tal funcionalidade são encontradas usando programas de computador bem conhecidos na técnica.

[0048] Como usado neste documento, uma sequência de ácido nucleico ou uma sequência de aminoácido "derivada de" um ácido nucleico designado, peptídeo, polipeptídeo ou proteína refere-se à origem do ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína. De preferência, a sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácido que é derivada de uma sequência particular, tem uma sequência de aminoácido que é essencialmente idêntica àquela sequência ou uma sua parte da mesma, da qual é derivada, em que "essencialmente idêntica" inclui variantes de sequência como definido acima. Preferivelmente, a sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácido que é derivada de um peptídeo ou proteína particular, é derivada do domínio correspondente no peptídeo ou proteína particular. Desse modo, "correspondente" refere-se em particular à mesma funcionalidade. Por exemplo, um "domínio extracelular" corresponde a outro "domínio extracelular" (de outra proteína) ou um "domínio de transmembrana" corresponde a outro "domínio de transmembrana" (de outra proteína). Partes "correspondentes" de peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos são, desse modo, facilmente identificáveis por alguém versado na técnica. Da mesma forma, as sequências "derivadas de" outra sequência são geralmente facilmente identificáveis por alguém versado na técnica como tendo sua origem na sequência.

[0049] De preferência, uma sequência de ácido nucleico ou uma sequência de aminoácido derivada de outro ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína pode ser idêntica ao ácido nucleico de partida,

peptídeo, polipeptídeo ou proteína (dos quais é derivado). No entanto, uma sequência de ácido nucleico ou uma sequência de aminoácido derivada de outro ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína pode também ter uma ou mais mutações relativas ao ácido nucleico de partida, peptídeo, polipeptídeo ou proteína (da qual é derivado), em particular, uma sequência de ácido nucleico ou uma sequência de aminoácido derivada de outro ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína pode ser uma variante de sequência funcional como descrito acima, do ácido nucleico de partida, peptídeo, polipeptídeo ou proteína (do qual é derivado). Por exemplo, em um peptídeo / proteína, um ou mais resíduos de aminoácido podem ser substituídos por outros resíduos de aminoácido ou um ou mais resíduos de aminoácido podem ser inseridos ou deletados.

[0050] Como usado neste documento, o termo "mutação" refere-se a uma alteração na sequência de ácido nucleico e / ou na sequência de aminoácido em comparação com uma sequência de referência, por exemplo, uma sequência genômica correspondente. Uma mutação, por exemplo, em comparação com uma sequência genômica, pode ser, por exemplo, uma mutação somática (de ocorrência natural), uma mutação espontânea, uma mutação induzida, por exemplo, induzida por enzimas, produtos químicos ou radiação ou uma mutação obtida por mutagênese direcionada ao sítio (métodos de biologia molecular para fazer alterações específicas e intencionais na sequência de ácidos nucleicos e / ou na sequência de aminoácido). Desse modo, os termos "mutação" ou "mutantes" devem ser entendidos também incluírem fazer fisicamente uma mutação, por exemplo, em uma sequência de ácido nucleico ou em uma sequência de aminoácido. Uma mutação inclui substituição, deleção e inserção de um ou mais nucleotídeos ou aminoácidos, bem como inversão de diversos (dois ou mais) nucleotídeos ou aminoácidos sucessivos. Para conseguir uma mutação

em uma sequência de aminoácido, de preferência uma mutação pode ser introduzida na sequência de nucleotídeo que codifica a referida sequência de aminoácido para expressar um polipeptídeo mutado (recombinante). Uma mutação pode ser conseguida, por exemplo, alterando, por exemplo, por mutagênese direcionada ao sítio, um códon de uma molécula de ácido nucleico que codifica um aminoácido para resultar em um códon que codifica um aminoácido diferente ou sintetizando uma variante de sequência, por exemplo, conhecendo a sequência de nucleotídeo de uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo e designando a síntese de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma variante do polipeptídeo sem a necessidade de mutação de um ou mais nucleotídeos de uma molécula de ácido nucleico.

[0051] O termo "doença", como usado no contexto da presente invenção, destina-se a ser geralmente sinônimo e é usado de alternadamente com os termos "distúrbio" e "condição" (como na condição médica), na medida em que todos refletem uma condição anormal do corpo humano ou animal ou de uma de suas partes que prejudica o funcionamento normal, é tipicamente manifestada distinguindo sinais e sintomas distintos e faz com que o ser humano ou animal tenham uma duração ou qualidade de vida reduzida.

[0052] Vários documentos são citados ao longo do texto deste relatório descritivo. Cada um dos documentos citados aqui (incluindo todas as patentes, pedidos de patentes, publicações científicas, especificações do fabricante, instruções, etc.), seja supra ou infra, é pelo presente incorporado por referência em sua íntegra. Nada neste documento deve ser construído como uma admissão de que a invenção não é intitulada para anteceder tal invenção, em virtude de invenção anterior.

[0053] Deve ser entendido que esta invenção não está limitada à

metodologia particular, a protocolos e reagentes particulares descritos neste documento, pois estes podem variar. Deve também ser entendido que a terminologia usada neste aqui tem o propósito de descrever apenas modalidades particulares, e não se destina a limitar o escopo da presente invenção que será limitado apenas pelas reivindicações anexas. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm os mesmos significados que são comumente entendidos por alguém versado na técnica.

### **Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno com domínios funcionais no cotovelo**

[0054] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreendendo uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo, em que a referida primeira cadeia de polipeptídeo comprehende na direção N- a C-terminal:

- (i) um ou mais domínios variáveis;
- (ii) um domínio funcional (adicional); e
- (iii) um ou mais domínios constantes; e

em que a referida segunda cadeia de polipeptídeo comprehende na direção N- a C-terminal;

(iv) um ou mais domínios variáveis formando sítios de ligação a antígeno com o um ou mais domínios variáveis (i) da primeira cadeia de polipeptídeo;

- (v) opcionalmente, um domínio funcional (adicional); e
- (vi) um ou mais domínios constantes,

caracterizado pelo fato de que o referido domínio funcional (adicional) (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo não comprehende um fragmento da segunda cadeia de polipeptídeo e o referido domínio funcional opcional (adicional) (v) da segunda cadeia de polipeptídeo não comprehende um fragmento da primeira cadeia de polipeptídeo.

[0055] A presente invenção é baseada na descoberta surpreendente de que um domínio funcional (adicional) pode ser inserido na região do cotovelo de um anticorpo, isto é, entre o domínio variável e o domínio constante mais N-terminal, em particular CH1 ou CL. A Fig. 1A mostra um anticorpo clássico de ocorrência natural com a região do cotovelo indicada por setas. Os presentes inventores descobriram surpreendentemente que os anticorpos modificados na região do cotovelo para conter um domínio funcional adicional podem, por exemplo, se ligar simultaneamente (1) ao antígeno direcionado por seus domínios variáveis e (2) a um alvo adicional direcionado por um sítio de ligação introduzido na região do cotovelo do anticorpo - como mostrado pelos Exemplos aqui descritos. Ao contrário, formatos de anticorpos multiespecíficos da técnica anterior, nos quais os sítios de ligação adicionais são obtidos substituindo um par de cadeia pesada / leve com outro par de cadeia pesada / leve com especificidade distinta (como nos formatos de anticorpo multiespecífico de IgG descritos acima, que são frequentemente monovalentes para cada especificidade) ou anexando sítios de ligação adicionais aos N- ou C-terminais das cadeias pesada ou leve (como nos formatos anexados de anticorpos IgG descritos acima), nos anticorpos da presente invenção o domínio funcional adicional, por exemplo, o sítio de ligação adicional (especificidade) é inserido na cadeia pesada e / ou leve, a saber, na região do cotovelo. Surpreendentemente, a N-terminal do domínio variável (por exemplo, VH) do domínio funcional inserido, tal como um sítio de ligação, ainda forma um sítio de ligação a antígeno totalmente funcional com o domínio variável correspondente da outra cadeia de polipeptídeo (por exemplo, VL) - mesmo se a outra cadeia de polipeptídeo for não modificada no cotovelo. O mesmo se aplica aos anticorpos multiespecíficos: a despeito do domínio funcional inserido, a N-terminal do(s) domínio(s) variável(s) do domínio funcional inserido

ainda se associa aos domínios variáveis correspondentes na outra cadeia de polipeptídeo para formar sítios funcionais de ligação a antígeno (por exemplo, VH1 - VH2 em uma cadeia de polipeptídeo com VL1 - VL2 na outra cadeia de polipeptídeo, etc.).

[0056] Por conseguinte, os anticorpos e seus fragmentos de ligação a antígeno, de acordo com a presente invenção, são referidos como moléculas de Ig "Inserção no cotovelo" ("IEI-Ig"). O significado das descobertas dos presentes inventores é refletido pelo fato de que dá origem a uma variedade de novos formatos de anticorpos, como exemplificado na Figura 1. Anticorpos IEI-Ig e seus fragmentos de ligação a antígeno, de acordo com a presente invenção, podem ser com base em anticorpos clássicos de ocorrência natural, como exemplificado na Figura 1B, ou eles podem ser combinados com outros formatos de anticorpo (multiespecíficos) para obter novos formatos de anticorpos com ainda mais especificidades, como exemplificado na Figura 1C.

[0057] Por exemplo, para obter um anticorpo de acordo com a presente invenção, um anticorpo monoespecífico clássico, preferivelmente um anticorpo monoclonal humano, pode servir como anticorpo "estrutura" e um domínio funcional adicional, como um sítio de ligação, é inserido na região do cotovelo (ou seja, entre o domínio variável e o constante mais N-terminal, em particular o C-terminal do domínio variável e o N-terminal de CH1 e / ou CL, respectivamente) de cadeia pesada e / ou da cadeia leve do anticorpo estrutura. Em outros exemplos, fragmentos de um anticorpo monoespecífico clássico, preferivelmente fragmentos de um anticorpo monoclonal humano, que compreende (i) pelo menos duas cadeias de polipeptídeos, como uma cadeia pesada e uma leve, e (ii) em cada cadeia de polipeptídeo pelo menos uma domínio variável e um domínio constante, pode servir como "anticorpo estrutura" e um domínio funcional, como um sítio de ligação, é inserido na região do cotovelo da primeira e / ou da segunda cadeia

de polipeptídeo do fragmento do anticorpo estrutura. Exemplos preferidos de tais fragmentos de anticorpo, que podem ser usados como estrutura para obter um anticorpo de acordo com a presente invenção, pela inserção de um domínio funcional, tal como um sítio de ligação, na região do cotovelo, incluem Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub>. Além disso, qualquer anticorpo recombinante ou fragmento do mesmo, como um anticorpo multiespecífico, em particular, um biespecífico, ou um fragmento do mesmo, que compreende (i) pelo menos duas cadeias de polipeptídeos, tal como uma cadeia pesada e uma leve, e (ii) em cada cadeia de polipeptídeo, pelo menos, um domínio variável e um domínio constante, podem também servir como anticorpo “estrutura” e um domínio funcional, tal como um sítio de ligação, é inserido na região do cotovelo da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo estrutura recombinante (fragmento).

[0058] Exemplos preferidos de anticorpos, que podem servir como anticorpos estrutura incluem anticorpos GCE536 (VH: SEQ ID NO: 1, VL: SEQ ID NO: 2, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO : 4; Piccoli, L., *et al.*, Neutralização e depuração de GM-CSF por autoanticorpos na proteinose alveolar pulmonar. *Nature Communications* 6, 7375 (2015); "C1" (ver Exemplo 1; VH: SEQ ID NO: 5, VL: SEQ ID NO: 6, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 7); "C1b" (VH: SEQ ID NO: 8, VL: SEQ ID NO: 9, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 4) e FI174 (VH: SEQ ID NO : 10, VL: SEQ ID NO: 11, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 4; Pappas, L., *et al.* Desenvolvimento rápido de anticorpos neutralizantes da influenza amplamente por meio de mutações redundantes. *Nature* 516, 418-422 (2014)).

[0059] O anticorpo de acordo com a presente invenção ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo pode também ser obtido por técnicas de clonagem, por exemplo, por vetores IgG comercialmente disponíveis ou conjuntos de vetores, que compreendem domínios / regiões constantes, por exemplo, de cadeia pesada e / ou leve. Por exemplo, os domínios variáveis correspondentes, tal como um domínio variável VH e VL de cadeia pesada e leve, de um primeiro anticorpo podem ser clonados nas respectivas cadeias de polipeptídeo, como fornecido pelo vetor; e, adicionalmente, o domínio funcional adicional pode ser clonado na primeira e / ou na segunda cadeia de polipeptídeo, de modo que esteja localizado entre o domínio variável (mais C-terminal) e o domínio constante (mais N-terminal), isto é, na região do cotovelo.

[0060] A primeira e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo de anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreendem um domínio funcional (adicional). Em particular, o "domínio funcional" é um peptídeo ou polipeptídeo, que está ligado aos domínios adjacentes da cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno por uma ligação a peptídeo (usual). Em particular, o N-terminal do domínio funcional (adicional) está ligado ao C-terminal do domínio variável (mais C-terminal) e o C-terminal do domínio funcional (adicional) está ligado ao N-terminal do domínio constante (mais N-terminal) por uma ligação a peptídeo.

[0061] Em geral, o termo "domínio funcional" refere-se a uma unidade funcional, por exemplo, do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno. Tipicamente, um domínio funcional fornece a proteína, por exemplo, o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno, com uma funcionalidade (adicional). Por conseguinte, o domínio funcional (adicional) geralmente contém todos os aminoácidos /

sequências necessários para fornecer a função (adicional). Em particular, o domínio funcional (adicional) (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo não compreende um fragmento da segunda cadeia de polipeptídeo e o domínio funcional (adicional) opcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo não compreende um fragmento da primeira cadeia de polipeptídeo. Em outras palavras, a segunda cadeia de polipeptídeo (em particular qualquer fragmento, tal como mesmo um único aminoácido do mesmo) não é requerido, nem envolvido no (funcionalidade do) domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo. Além disso, se a segunda cadeia de polipeptídeo também compreende um domínio funcional (adicional), a primeira cadeia de polipeptídeo (em particular qualquer fragmento, tal como até mesmo um único aminoácido do mesmo) não é nem requerido, nem envolvido na (funcionalidade do) domínio funcional (adicional) da segunda cadeia de polipeptídeo. Em vez disso, todos os aminoácidos (sequências de aminoácido) requeridos para, ou envolvidos na funcionalidade do domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo estão contidos no domínio funcional (adicional) da própria cadeia de polipeptídeo - nenhum fragmento ou aminoácidos da outra cadeia de polipeptídeo são requeridos/envolvidos. Por conseguinte, o domínio funcional (adicional) difere, por exemplo, de um sítio de ligação ao antígeno formado pelo domínio variável da primeira cadeia de polipeptídeo, juntamente com o domínio variável da segunda cadeia de polipeptídeo. Em outras palavras, o domínio funcional (adicional) difere, por exemplo, de um sítio de ligação a antígeno formado por domínios variáveis de duas cadeias de polipeptídeo diferentes (no entanto, o domínio funcional (adicional) pode ainda compreender um sítio de ligação ao antígeno - se os domínios variáveis envolvidos estiverem localizados em uma única cadeia de polipeptídeo, como descrito em maiores detalhes abaixo).

[0062] Particularmente preferido, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em um domínio similar a Ig; por exemplo, um domínio similar a Ig de uma proteína ou (poli)peptídeo, por exemplo, como exemplificado abaixo. A estrutura básica das moléculas de imunoglobulina (Ig) é um tetrâmero de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas ligadas por ligações dissulfeto. Existem dois tipos de cadeias leves: kappa e lambda, cada uma composta por um domínio constante (CL) e um domínio variável (VL). Existem cinco tipos de cadeias pesadas: alfa, delta, epsilon, gama e mu, todos consistindo em um domínio variável (VH) e três (em alfa, delta e gama) ou quatro (em epsilon e mu) domínios constantes (CH1 a CH4). As moléculas de Ig são proteínas altamente modulares, nas quais os domínios variável e constante têm padrões de sequência conservados, claros. Os domínios nas moléculas Ig e tipo-Ig são agrupados em quatro tipos: conjunto V (variável), conjunto C1 (constante 1), conjunto C2 (constante 2) e conjunto I (intermediário). Estudos estruturais mostraram que esses domínios compartilham uma estrutura beta-sanduíche chave grega comum, com os tipos que diferem no número de fitas nas folhas beta, bem como em seus padrões de sequência. Os domínios do tipo imunoglobulina que estão relacionados tanto na sequência quanto na estrutura podem ser encontrados em várias famílias de proteína diversas. Os domínios similares a Ig estão envolvidos em uma variedade de funções, incluindo reconhecimento célula-célula, receptores célula-superfície, estrutura muscular e sistema imunológico.

[0063] Exemplos preferidos de domínios similares a Ig incluem os domínios similares a Ig de qualquer uma ou das seguintes proteínas ou (poli)peptídeos: A1BG (glicoproteína alfa-1-B), ACAM, ADAMTS1 (ADAMTS como 1), ADAMTS3 (ADAMTS como 3 ), AGER (receptor específico do produto final de glicosilação avançada), ALCAM (molécula

de adesão de células leucocitárias ativadas), ALPK3 (alfa-cinase 3), AMIGO1 (molécula de adesão com domínio 1 similar a Ig), AMIGO2 (molécula de adesão com domínio 3 similar a Ig) , AMIGO3 (molécula de adesão com domínio 3 similar a Ig 3), AXL (de tirosina cinase AXL receptora), BCAM (molécula de adesão de célula basal (grupo sanguíneo luterano)), BOC (associada à adesão celular BOC, regulada por oncogene), BSG (basigina (grupo sangue Ok)), BTLA (associado a linfócitos B e T), C10orf72, C20orf102, CADM1 (molécula de adesão celular 1), CADM3 (molécula de adesão celular 3), CADM4 (molécula de adesão celular 4), CCDC141 (domínio de bobina enrolada contendo 141) , CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD33, CD47, CD48, CD80, CD84, CD86, CD96, CD101, CD160, CD200, CD244, CD276, CDON (associado à adesão celular, regulada por oncogene), CEACAM1 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 1), CEACAM5 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 5), CEACAM6 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 6), CEACAM7 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 6), CEACAM7 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 7), CEACAM8 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 8), CEACAM16 (molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 16), CEACAM18 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 18), CEACAM20 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 18), CEACAM20 (molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 20), molécula de adesão celular relacionada com o antígeno carcinoembrionário 21), CHL1 (molécula de adesão celular tipo L1), CILP (proteína da camada

intermediária da cartilagem), CILP2 (proteína 2 da camada intermediária da cartilagem), CLMP (proteína da membrana similar à CXADR), CNTFR (receptor de fator neurotrófico ciliar) , CNTN1 (contato em 1), CNTN2 (contato em 2), CNTN3 (contato em 3, CNTN4 (contato em 4), CNTN5 (contato em 5), CNTN6 (contactina 6), CSF1R (receptor do fator 1 estimulador de colônias), CXADR (CXADR, molécula de adesão celular ike), DSCAM (molécula de adesão celular DS), DSCAML1 (molécula de adesão de célula DS como 1), EMB (embigin), ESAM (molécula de adesão celular endotelial), F11R (receptor F11), FAIM3, FCMR (fragmento Fc de receptor IgM), HMCN1 (hemicentrina 1), HMCN2 (hemicentrina 2), FCAR (fragmento Fc do receptor IgA), FCER1A (fragmento Fc do receptor IgE Ia), FCGR1A (fragmento Fc do receptor IgG Ia), FCGR1B (fragmento Fc de Receptor de IgG 1b), FCGR1CP (fragmento Fc do receptor de IgG Ic, pseudogene), FCGR2A (fragmento Fc do receptor de IgG IIa), FCGR2B (fragmento Fc do receptor de IgG IIb), FCGR2C (fragmento Fc do receptor de IgG IIc), FCGR3A (fragmento Fc do receptor de IgG IIIa), FCGR3B (fragmento Fc do receptor de IgG IIIb), FCRH1, FCRH3, FCRH4, FCRL1 (receptor Fc como 1), FCRL2 (receptor Fc como 2), FCRL3 (receptor Fc como 3), FCRL4 (receptor Fc como 4), FCRL5 (receptor Fc como 5), FCRL6 (receptor Fc como 6), FCRLA (receptor Fc como A), FCRLB (receptor Fc como B), FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR1L, FLT1 (tirosina cinase 1 relacionada com fms), FLT3 (tirosina cinase 3 relacionada com fms), FLT4 (tirosina cinase relacionada com fms 4), FSTL4 (folistatina como 4), FSTL5 (folistatina como 5), GP6 (plaquetas da glicoproteína VI), GPA33 (glicoproteína VI plaquetária), GPA33 (glicoproteína A33, GPR116 , GPR125, ADGRF5 (receptor F5 acoplado à proteína G de adesão), ADGRA2 (receptor A2 acoplado à proteína G de adesão), hEMMPRIN, HEPACAM (molécula de adesão de células hepáticas e gliais), HEPACAM2 (membro 2 da família HEPACAM), HLA-

DMA, HLA -DMB, HLA-DQB, HLA-DQB1, HNT, HSPG2 (proteoglicano 2 de sulfato de heparano), HYST2477, ICAM1 (molécula 1 de adesão intercelular), ICAM2 (molécula 2 de adesão intercelular), ICAM3 (molécula 3 de adesão intercelular), ICAM3 (molécula 3 de adesão intercelular), ICAM4 (intercelular) molécula de adesão 4 (grupo sanguíneo Landsteiner-Wiener)), ICAM5 (molécula 5 de adesão intercelular), DCC (receptor de netrina 1 DCC), NEO1 (neogenina 1), IGHA1, IGHD, IGHE, IGDCC4 (membro 4 da subclasse DCC da superfamília de imunoglobulina), IGLON5 (membro 5 da família IgLON), IGSF1 (membro 1 da superfamília de imunoglobulina), IGSF2 (membro 2 da superfamília de imunoglobulina), IGSF3 (membro 3 da superfamília de imunoglobulina), IGSF5 (membro 5 da superfamília de imunoglobulina), IGSF9 (membro 9 da superfamília de imunoglobulina), IGSF9B (membro 9B da superfamília de imunoglobulina), IGSF10 (membro 10 da superfamília de imunoglobulina), IGSF11 (membro 11 da superfamília de imunoglobulina 11 ), IGSF21 (membro 21 da superfamília de imunoglobulina 21), IGSF23 (membro 23 da superfamília de imunoglobulina), IL1R1 (receptor tipo 1 da interleucina 1), IL1R2 (receptor tipo 2 da interleucina), IL1RAP (proteína acessória receptora de interleucina 1), IL1RAPL1 (proteína tipo 1 acessória receptora de interleucina 1), IL1RAPL2 (proteína tipo 2 acessória receptora de interleucina 1), IL1RL1 (receptor tipo 1 de interleucina 1), IL1RL2 (receptor tipo 2 de interleucina 1), IL6R (receptor de interleucina 6), IL11RA (subunidade alfa de receptor de interleucina 11), IL12B (interleucina 12B), IL18BP (proteína de ligação à interleucina 18), IL18R1 (receptor 1 de interleucina 18), IL18RAP (proteína acessória receptora de interleucina 18), ISLR2 (superfamília da imunoglobulina contendo repetição 2 rica em leucina), JAM2 (molécula 2 de adesão juncional), JAM3 (molécula 3 de adesão juncional), KDR (receptor de domínio de inserção de cinase), KIR-123FM, KIR2DL1 (receptor similar

à imunoglobulina de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda 1 citoplasmática longa), KIR2DL2 (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda 2 citoplasmática longa), KIR2DL3 (receptor similar à imunoglobulina de célula exterminadora, dois domínios Ig e cauda 3 citoplasmática longa), KIR2DL4 (receptor similar à imunoglobulina de célula exterminadora, dois domínios Ig e cauda 4 citoplasmática longa), KIR2DL5A (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda longa citoplasmática 5A), KIR2DL5B (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda longa citoplasmática 5B), KIR2DLX, KIR2DS1 (receptor similar à imunoglobulina de célula exterminadora, dois domínios Ig e cauda 1 citoplasmática curta), KIR2DS2 (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras), dois domínios Ig e cauda 2 citoplasmática curta), KIR2DS3 (receptor similar à imunoglobulina celular de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda 3 citoplasmática curta), KIR2DS4 (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda citoplasmática curta 4), KIR2DS5 (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, dois domínios Ig e cauda citoplasmática curta 5), kir3d, KIR3DL1 (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, três domínios Ig e cauda citoplasmática longa 1), KIR3DL2 (receptor similar à imunoglobulina de células exterminadoras, três domínios Ig e cauda citoplasmática longa 2), KIR3DL3 (receptor similar à imunoglobulina celular de células exterminadoras, três domínios Ig e cauda citoplasmática longa 3), KIR3DP1 (receptor similar à imunoglobulina de célula exterminadora, três domínios Ig pseudogene 1, KIR3DS1 (receptor similar à imunoglobulina de célula exterminadora, três domínios Ig e cauda citoplasmática curta 1), KIR3DX1 (receptor similar à imunoglobulina de célula exterminadora, três domínios Ig X1), KIRREL1 (molécula 1 de

adesão da família nefrina similar a kirre), KIRREL2 (molécula 2 de adesão da família nefrina similar a kirre), KIRREL3 (molécula 3 de adesão da família nefrina similar a kirre), KIT (tirosina cinase receptora proto-oncogene KIT), L1CAM, LAG3 (ativação de linfócitos 3), LAIR1 (receptor 1 similar à imunoglobulina associado a leucócitos), LAIR2 (receptor 2 similar à imunoglobulina associado a leucócitos), LEPR (receptor de leptina), LILRA1 (receptor A1 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRA2 (receptor A2 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRA3 (receptor A3 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRA4 (receptor A4 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRA5 (receptor A5 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRA6 (receptor A6 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRB1 (receptor B1 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRB2 (receptor B2 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRB3 (receptor B3 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRB4 (receptor B4 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRB5 (receptor B5 similar à imunoglobulina leucocitária), LILRP2, LRIG1, LRIG2, LRIG3, LRIT1, LRRC4, LSAMP, LSR (receptor de lipoproteína estimulada por lipólise), LY9 (antígeno linfocitário 9), MADCAM1 (molécula 1 de adesão celular de adressina vascular mucosal), MAG (glicoproteína associada à mielina), MALT1 (paracaspase MALT1), MCAM (molécula de adesão celular de melanoma), MDGA1 (domínio MAM contendo âncora 1 de glicosilfosfatidilinositol), MDGA2 (domínio MAM contendo âncora 2 de glicosilfosfatidilinositol), MERTK (proto-oncogene MER, tirosina-cinase), MFAP3, MIR, MILR1 (receptor 1 similar à imunoglobulina de mastócitos), MMP23A (metallopeptidase 23A matriz (pseudogene)), MMP23B (metallopeptidase 23B da matriz), MUSK (tirosina cinase receptora associada ao músculo), MXRA5 (5 associado à remodelagem da matriz), MYBPC3, MYOM1 (miomesina 1), MYOM2 (miomesina 2), MYOM3 (miomesina 3), NCA, NCAM1, NCAM2, NCR1 (receptor 1

desencadeador de citotoxicidade natural), NEGR1, NEO1, NFASC, NOPE, NPHS1 (NPHS1, nefrina), NPTN (neuroplastina), NRCAM (molécula de adesão celular neuronal), NTRK1 (tirosina cinasse 1 receptora neurotrófica), NRG1, NT, NTRK3, OBSCN, OBSL1 (obscurina tipo 1), OPCML, OSCAR (receptor similar à imunoglobulina associada a osteoclastos), PAPLN, PDCD1LG2 (ligante 2 de morte celular programada 1), PDGFRA (receptor alfa de fator de crescimento derivado de plaquetas), PDGFRB (receptor beta de fator de crescimento derivado de plaquetas), PDGFRL (similar ao receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas), PECAM1 (molécula 1 de adesão de células plaquetárias e endoteliais), PRODH2, PSG1 (beta-1-glicoproteína-1 específica da gravidez), PSG2 (beta-1-glicoproteína-2 específica da gravidez), PSG3 (beta-1-glicoproteína 3 específica da gravidez 3), PSG4 (beta-1-glicoproteína-4 específica da gravidez), PSG5 (beta-1-glicoproteína-5 específica da gravidez), PSG6 (beta-1-glicoproteína-6 específica da gravidez), PSG7 (beta-1-glicoproteína-7 específica da gravidez (gene / pseudogene)), PSG8 (beta-1-glicoproteína-8 específica da gravidez), PSG9 (beta-1-glicoproteína-9 específica da gravidez), PSG10 (beta-1-glicoproteína 10 específica da gravidez), PSG11 (beta-1-glicoproteína-11 específica da gravidez), PSG11s' (beta-1-glicoproteína-11s' específica da gravidez), PTGFRN (inibidor do receptor de prostaglandina F2), PTK7 (proteína tirosina cinase 7 (inativa)), PTPRD (proteína tirosina fosfatase, receptor tipo D), PTPRK (proteína tirosina fosfatase, receptor tipo K), PTPRM (proteína tirosina fosfatase, receptor tipo M), PTPRS (proteína tirosina fosfatase, receptor tipo S), PTPRT (proteína tirosina fosfatase, receptor tipo T), PTPsigma, PUNC, PVR (receptor do poliovírus), PVRL1, PVRL2, PVRL4, NECTINA1 (molécula 1 de adesão celular de nectina), NECTIN2 (molécula 2 de adesão celular de nectina), NECTIN3 (molécula 3 de adesão celular de nectina), RAGE, ROBO3 (receptor 3

de orientação rotatória), SCN1B (subunidade beta 1 do canal fechado por voltagem de sódio), SDK1 (molécula 1 de adesão celular auxiliar), SDK2 (molécula 2 de adesão celular auxiliar), SEMA3A (semaforina 3A), SEMA3B (semaforina 3B), SEMA3E (semaforina 3E), SEMA3F (semaforina 3F), SEMA3G (semaforina 3G), SEMA4C (semaforina 4C), SEMA4D (semaforina 4D), SEMA4G (semaforina 4G), SEMA7A (semaforina 7A) (grupo sanguíneo John Milton Hagen)), SIGIRR (contendo domínio único de Ig e TIR), SIGLEC1 (lectina 1 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC5 (lectina 5 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC6 (lectina 6 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC7 (lectina 7 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC8 (lectina 8 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC9 (lectina 9 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC10 (lectina 10 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC11 (lectina 11 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC12 (lectina 12 similar a Ig de ligação ao ácido siálico) (gene / pseudogene)), SIGLEC14 (lectina 14 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SIGLEC15 (lectina 15 similar a Ig de ligação ao ácido siálico), SLAMF1 (membro 1 da família de molécula de ativação linfocítica de sinalização), SLAMF6 (membro 6 da família SLAM), SLAMF8 (membro 8 da família SLAM), SIRPG; TARM1 (receptor ativador de interação de células T em células mieloides 1), TEK (tirosina cinase receptora TEK), THY1 (antígeno de superfície celular Thy-1), TIE1 (tirosina cinase com domínios 1 similares à imunoglobulina e EGF), TMEM81 (proteína de transmembrana 81), TMIGD1 (domínio de transmembrana e imunoglobulina contendo 1), TMIGD2 (domínio de transmembrana e imunoglobulina contendo 2), TTN (titina), TYRO3 (proteína tirosina cinase TYRO3), UNC5D, VCAM1 (molécula 1 de adesão de célula vascular), VSIG1 (domínio de conjunto V e imunoglobulina contendo 1), VSIG2 (domínio de conjunto V e imunoglobulina contendo 2), VSIG4 (domínio de conjunto V e

imunoglobulina contendo 4), VSIG10 (domínio de conjunto V e imunoglobulina contendo 10), VSIG10L (domínio de conjunto V e imunoglobulina contendo 10 similar), VSTM1 (domínio de conjunto V e transmembrana contendo 1), VTCN1 (domínio e conjunto V contendo inibidor 1 de ativação de células T), ZPBP (proteína de ligação à zona pelúcida) ou ZPBP2 (proteína 2 de ligação à zona pelúcida).

[0064] Mais preferivelmente, o domínio similar a Ig é um domínio similar a Ig de qualquer uma das seguintes proteínas: CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD22, CD33, CD80, CD86, em particular de CD4.

[0065] Exemplos preferidos adicionais de domínios similares a Ig são descritos abaixo.

[0066] Também é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo compreenda ou consista em um domínio extra e / ou intracelular de uma proteína (conhecida). Além disso, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode preferivelmente compreender ou consistir em um domínio de uma proteína globular solúvel (conhecida). Mais preferivelmente, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em um domínio extracelular de uma proteína (conhecida) ou um domínio de uma proteína globular solúvel (conhecida).

[0067] Preferivelmente, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo tem um comprimento de até 1000 aminoácidos, mais preferivelmente de até 750 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de até 500 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de até 400 aminoácidos, particularmente preferivelmente de até 300 aminoácidos e mais preferivelmente de até 275 ou 250 aminoácidos. Além disso, é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de

polipeptídeo tenha um comprimento de 5 a 1000 aminoácidos, mais preferivelmente de 10 a 750 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de 20 a 500 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de 50 a 400 aminoácidos, particularmente preferivelmente de 70 a 300 aminoácidos e mais preferivelmente de 75 a 275 ou de 100 a 250 aminoácidos.

[0068] Também é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo tenha um tamanho de até 150 kDa, mais preferivelmente de até 100 kDa, ainda mais preferivelmente de até 80 kDa, ainda mais preferivelmente de até 70 kDa, particularmente preferivelmente até 50 kDa e mais preferivelmente até 30 ou 25 kDa. Além disso, é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo tenha um tamanho de 0,5 kDa a 150 kDa, mais preferivelmente de 1 kDa a 100 kDa, ainda mais preferivelmente de 2,5 kDa a 80 kDa, ainda mais preferivelmente de 5 kDa a 70 kDa, particularmente preferivelmente de 7,5 kDa a 50 kDa e mais preferivelmente de 10 kDa a 30 ou 25 kDa.

[0069] O domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender um domínio monomérico ou domínios multiméricos. Um domínio monomérico é um domínio que media sua funcionalidade sem o envolvimento de qualquer outro domínio (adicional). Domínios multiméricos, por exemplo, dois domínios formando um dímero ou três domínios formando um trímero, mediam sua funcionalidade juntos, em particular como multímero, por exemplo, como dímero ou trímero. No caso de domínios multiméricos, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender ligantes, como descrito aqui, para fornecer flexibilidade suficiente para formar o multímero, em particular um ligante pode estar localizado (diretamente) adjacente a um ou mais domínios multiméricos, por exemplo, entre dois domínios multiméricos ou em cada lado de todos os domínios multiméricos. Preferivelmente, o

domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em um ou mais domínios monoméricos.

[0070] Em geral, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender ou consistir em um único domínio de proteína ou em mais do que um domínio de proteína. "Mais do que um domínio de proteína" podem ser domínios multiméricos como descrito acima e / ou um ou mais domínios monoméricos, como descrito acima. Por exemplo, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender ou consistir em dois ou três domínios monoméricos, que podem mediar a mesma funcionalidade ou funcionalidade distinta e / ou que podem ser opcionalmente conectados por um ligante. Por exemplo, o domínio funcional (adicional) da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 domínios de proteína (distintos).

[0071] Preferivelmente, o domínio funcional (adicional) é uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo humano ou um fragmento (em particular um domínio) ou derivado do mesmo.

[0072] Em particular, o domínio funcional (adicional) não é um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Embora o domínio funcional (adicional) possa opcionalmente compreender um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, ele preferivelmente não consiste em um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em outras palavras, mesmo que o domínio funcional (adicional) compreenda um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, ele preferivelmente compreende uma sequência de aminoácidos adicional mediando uma função distinta de (puramente) ligação de dois peptídeos um ao outro. Portanto, o domínio funcional (adicional) é preferivelmente distinto de um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em particular, o domínio funcional (adicional) pode não

compreender um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em geral, a funcionalidade fornecida pelo domínio funcional (adicional) não é preferivelmente uma mera ligação de dois (poli)peptídeos. Embora o domínio funcional (adicional) possa "ligar" dois (poli)peptídeos, tais como a variável adjacente e domínio constante, e, opcionalmente, forneça flexibilidade, o domínio funcional (adicional) preferivelmente fornece uma função (adicional) distinta de ligação e flexibilidade de (poli)peptídeos.

[0073] Preferivelmente, a segunda cadeia de polipeptídeo comprehende um domínio funcional (adicional) (v). Neste caso, a primeira e a segunda cadeias de polipeptídeos comprehendem ambas um domínio funcional (adicional), resultando desse modo em um anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, com dois domínios funcionais distintos (separados) (pcionais). Os domínios funcionais (pcionais) da primeira cadeia de polipeptídeo e da segunda cadeia de polipeptídeo podem ser os mesmos ou distintos, isto é, os mesmos ou diferentes domínios funcionais. Em outras palavras, mesmo que os domínios funcionais (pcionais) da primeira e segunda cadeias de polipeptídeos tenham uma sequência de aminoácidos idêntica, esses domínios funcionais (pcionais) são "independentes", isto é, eles mediam suas funções independentemente um do outro. Por exemplo, os domínios funcionais (pcionais) da primeira e da segunda cadeia de polipeptídeo se ligam a alvos separados (por exemplo, antígenos separados ou epítopos separados do mesmo antígeno; moléculas separadas ou partes separadas da mesma molécula) e nenhum dos sítios de ligação independentes requer ou envolve o outro de modo a se ligar ao seu alvo.

[0074] Entretanto, mais preferivelmente, a segunda cadeia de polipeptídeo não comprehende nenhum domínio funcional (adicional) (v) e que o C-terminal do domínio variável mais C-terminal da segunda

cadeia de polipeptídeo é preferivelmente diretamente acoplado ao N-terminal do domínio constante mais N-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo. Por exemplo, se a segunda cadeia de polipeptídeo for uma cadeia leve, o C-terminal do domínio VL mais C-terminal (ou do único domínio VL) é preferivelmente diretamente acoplado ao N-terminal do domínio CL. Por exemplo, se a segunda cadeia de polipeptídeo for uma cadeia pesada, o C-terminal do domínio VH mais C-terminal (ou do único domínio VH) é preferivelmente diretamente acoplado ao N-terminal do domínio CH1.

[0075] Portanto, a presente invenção também fornece um anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreendendo uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo, em que a referida primeira cadeia de polipeptídeo compreende na direção de N- ao C-terminal

- (i) um ou mais domínios variáveis;
- (ii) um domínio funcional (adicional) e
- (iii) um ou mais domínios constantes; e

em que a referida segunda cadeia de polipeptídeo compreende na direção de N- ao C-terminal

(iv) um ou mais domínios variáveis formando sítios de ligação a antígeno com o um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo; e

- (v) um ou mais domínios constantes,

Caracterizado pelo fato de que o C-terminal do domínio variável mais C-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo é diretamente acoplado ao N-terminal do domínio constante mais N-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo.

[0076] Novamente, o termo "domínio funcional" refere-se a uma unidade funcional, por exemplo, do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno, como descrito acima. Resumidamente, um domínio

funcional fornece tipicamente a proteína, por exemplo, o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno, com uma funcionalidade (adicional) como descrito acima. Portanto, o domínio funcional (adicional) geralmente contém todos os aminoácidos / sequências requeridos para fornecer a função (adicional). Em particular, o domínio funcional (adicional) (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo não compreende um fragmento da segunda cadeia de polipeptídeo, como descrito acima em mais detalhes.

[0077] Particularmente, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo preferivelmente compreende ou consiste em um domínio similar a Ig como descrito acima. Exemplos preferidos de domínios similares a Ig incluem aqueles descritos acima e aqueles descritos aqui abaixo.

[0078] Também é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo compreenda ou consista em um domínio extra e / ou intracelular de uma proteína (conhecida). Além disso, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo pode preferivelmente compreender ou consistir em um domínio de uma proteína globular solúvel (conhecida). Mais preferivelmente, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em um domínio extracelular de uma proteína (conhecida) ou um domínio de uma proteína globular solúvel (conhecida).

[0079] Preferivelmente, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo tem um comprimento de até 1000 aminoácidos, mais preferivelmente de até 750 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de até 500 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de até 400 aminoácidos ácidos, particularmente preferivelmente até 300 aminoácidos e mais preferivelmente até 275 ou 250 aminoácidos. Além disso, é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo tenha um comprimento de 5 a 1000 aminoácidos, mais

preferivelmente de 10 a 750 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de 20 a 500 aminoácidos, ainda mais preferivelmente de 50 a 400 aminoácidos, particularmente preferivelmente de 70 a 300 aminoácidos e mais preferivelmente de 75 a 275 ou de 100 a 250 aminoácidos.

[0080] Também é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo tenha um tamanho de até 150 kDa, mais preferivelmente de até 100 kDa, ainda mais preferivelmente de até 80 kDa, ainda mais preferivelmente de até 70 kDa, particularmente preferivelmente até 50 kDa e mais preferivelmente até 30 ou 25 kDa. Além disso, é preferido que o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo tenha um tamanho de 0,5 kDa a 150 kDa, mais preferivelmente de 1 kDa a 100 kDa, ainda mais preferivelmente de 2,5 kDa a 80 kDa, ainda mais preferivelmente de 5 kDa a 70 kDa, particularmente preferivelmente de 7,5 kDa a 50 kDa e mais preferivelmente de 10 kDa a 30 ou 25 kDa.

[0081] O domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo pode compreender um domínio monomérico ou domínios multiméricos, como descrito acima. Além disso, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo pode compreender ou consistir em um único domínio de proteína ou em mais do que um domínio de proteína, conforme descrito acima.

[0082] Preferivelmente, o domínio funcional (adicional) é uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo humano ou um fragmento (em particular um domínio) ou derivado do mesmo.

[0083] Em particular, o domínio funcional (adicional) não é um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, como descrito acima. Embora o domínio funcional (adicional) possa opcionalmente compreender um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, ele preferivelmente não consiste em um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em outras palavras, ainda que o domínio funcional

(adicional) compreenda um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, ele preferivelmente compreende uma sequência de aminoácidos adicional mediando uma função distinta de (puramente) ligar dois peptídeos um ao outro. Portanto, o domínio funcional (adicional) é preferivelmente distinto de um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em particular, o domínio funcional (adicional) pode não compreender um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em geral, a funcionalidade fornecida pelo domínio funcional (adicional) não é preferivelmente uma mera ligação de dois (poli)peptídeos. Embora o domínio funcional (adicional) possa "ligar" dois (poli)peptídeos, tal como a variável adjacente e domínio constante, e, opcionalmente, forneça flexibilidade, o domínio funcional (adicional) preferivelmente fornece uma função (adicional) distinta de ligação e flexibilidade de (poli)peptídeos.

[0084] Além disso, o C-terminal do domínio variável mais C-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo é preferivelmente diretamente acoplado ao N-terminal do domínio constante mais N-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo. Por exemplo, se a segunda cadeia de polipeptídeo for uma cadeia leve, o C-terminal do domínio VL mais C-terminal (ou do único domínio VL) é preferivelmente diretamente acoplado ao N-terminal do domínio CL. Por exemplo, se a segunda cadeia de polipeptídeo for uma cadeia pesada, o C-terminal do domínio VH mais C-terminal (ou do único domínio VH) é preferivelmente diretamente acoplada ao N-terminal do domínio CH1.

[0085] Em geral, é preferido no anticorpo, ou no fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção que um ou mais domínios constantes da primeira cadeia de polipeptídeo sejam domínios constantes de cadeia pesada, preferivelmente compreendendo pelo menos um domínio constante CH1 e o domínio constante da segunda cadeia de polipeptídeo seja um domínio

constante da cadeia leve CL. Mais preferivelmente, um ou mais domínios constantes da primeira cadeia de polipeptídeo é / são domínios constantes de cadeia pesada, preferivelmente compreendendo pelo menos um domínio constante CH1, um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo é / são domínios variáveis da cadeia pesada VH, o domínio constante da segunda cadeia de polipeptídeo é um domínio constante da cadeia leve CL e um ou mais domínios variáveis da segunda cadeia de polipeptídeo é / são domínios variáveis da cadeia leve VL. Em outras palavras, é preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo seja derivada de uma cadeia pesada e a segunda cadeia de polipeptídeo seja derivada de uma cadeia leve. É particularmente preferido que a região constante da primeira cadeia de polipeptídeo compreenda três domínios constantes, nomeadamente CH1, CH2 e CH3 (em particular, na direção de N- ao C-terminal CH1 - CH2 - CH3), mais preferivelmente com uma região de articulação entre CH1 e CH2.

[0086] Alternativamente, também é preferido no anticorpo, ou no fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção que os domínios constantes da primeira cadeia de polipeptídeo sejam um domínio constante da cadeia leve CL e um ou mais domínios constantes da segunda cadeia de polipeptídeo sejam domínios constantes de cadeia pesada, preferivelmente compreendendo pelo menos um domínio constante CH1. Mais preferivelmente, os domínios constantes da primeira cadeia de polipeptídeo são um domínio constante de cadeia leve CL, um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo são domínios variáveis de cadeia leve VL, um ou mais domínios constantes da segunda cadeia de polipeptídeo são domínios constantes de cadeia pesada, preferivelmente compreendendo pelo menos um domínio constante CH1, e um ou mais domínios variáveis da segunda cadeia de

polipeptídeo domínios variáveis da cadeia pesada VH. Em outras palavras, é preferido que a segunda cadeia de polipeptídeo seja derivada de uma cadeia pesada e a primeira cadeia de polipeptídeo seja derivada de uma cadeia leve. É particularmente preferido que a região constante da segunda cadeia de polipeptídeo compreenda três domínios constantes, a saber, CH1, CH2 e CH3 (em particular, na direção de N- ao C-terminal CH1 - CH2 - CH3), mais preferivelmente com uma região de articulação entre CH1 e CH2.

[0087] Além disso, é preferido que, na primeira e / ou na segunda cadeia de polipeptídeo, os domínios constantes diretamente adjacentes ao domínio funcional (adicional) (e / ou à região variável, se o segundo polipeptídeo não compreender um domínio funcional (adicional)) não contribuam para a região Fc. Em anticorpos nativos, a região constante próxima aos domínios variáveis CH1 e CL normalmente não contribui para a região Fc. Portanto, é preferido que uma cadeia de polipeptídeo (a primeira ou a segunda) comporte um domínio constante CH1, enquanto a outra cadeia de polipeptídeo (a outra da primeira ou da segunda) comporte um domínio constante CL.

[0088] Preferivelmente, o domínio constante de cadeia pesada, em particular, CH1, ou qualquer outro domínio constante de cadeia pesada, é selecionado das seguintes classes:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$ ; preferivelmente  $\gamma$ , tal como de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

[0089] Além disso, é preferido que o domínio constante da cadeia leve, em particular CL, seja selecionado das seguintes classes:  $\kappa$  e  $\lambda$ .

[0090] Preferivelmente, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, é um anticorpo recombinante ou fragmento de ligação a antígeno. Como usado neste documento, o termo "recombinante" significa que o anticorpo recombinante ou fragmento de anticorpo não ocorre na natureza.

[0091] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreende ou consiste em um domínio veículo, um domínio-repórter, um marcador, um domínio de localização, um sítio de ligação (independente), uma enzima ou um domínio enzimático, um receptor ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ligante ou um fragmento funcional do mesmo.

[0092] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em uma enzima ou um domínio enzimático do mesmo. Uma "enzima" é um polipeptídeo ou catalisador de proteína, isto é, uma enzima normalmente acelera uma reação química. As moléculas nas quais as enzimas podem atuar são chamadas de substratos e a enzima converte os substratos em diferentes moléculas conhecidas como produtos. Quase todos os processos metabólicos na célula precisam de enzimas de modo a ocorrer em taxas suficientemente rápidas para sustentar a vida. Enzimas preferidas incluem oxidorredutases, transferases, hidrolases, lisases, isomerases e ligases. Para enzimas, que formam um dímero, o domínio funcional da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender dois domínios idênticos conectados por um ligante. Por exemplo, as enzimas podem ser úteis para ativar um pró-fármaco em um sítio específico, por exemplo, um tumor. Exemplos de enzimas preferidas e usos de anticorpos compreendendo essas enzimas são descritos em Andraday C, Sharma SK, Chester KA; *Antibody-enzyme fusion proteins for cancer therapy; Immunotherapy*. 3 de fevereiro de 2011; (2): 193-211 e em Boado RJ1, Zhang Y, Zhang Y, Xia CF, Wang Y, Pardridge WM; *Genetic engineering of a lysosomal*

*enzyme fusion protein for targeted delivery across the human blood-brain barrier; Biotechnol Bioeng. 1 de fevereiro de 2008; 99 (2): 475-84.*

[0093] Enzimas preferidas são selecionadas do grupo que consiste em desidrogenase, luciferase, DMSO redutase, álcool desidrogenase (NAD), álcool desidrogenase (NADP), homoserina desidrogenase, aminopropanol oxidoredutase, diacetil redutase, glicerol desidrogenase, propanodiol-3, propanodiol-fosfato desidrogenase, glicerol-3-fosfato desidrogenase (NAD+), D-xilulose redutase, L-xilulose redutase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, HMG-CoA redutase, glicose oxidase, L-gulonolactona oxidase, tiamina oxidase, xantina oxidase, acetaldeído desidrogenase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase, oxoglutarato desidrogenase, biliverdina redutase, monoamina oxidase, di-hidrofolato redutase, di-hidrofolato redutase, metilenotetra-hidrofolato redutase, sarcosina oxidase, di-hidrobenzofenantiridina oxidase, NADH desidrogenase, urato oxidase, nitrito redutase, nitrato redutase, glutationa redutase, tioredoxina redutase, sulfito oxidase, citocromo c oxidase, coenzima Q - citocromo c redutase, catecol oxidase, lacase, citocromo c peroxidase, catalase, mieloperoxidase, tiroide peroxidase, glutationa peroxidase, 4-hidroxifenilpiruvato disoxigenase, renilla-luciferina 2-monooxigenase, cipridina-luciferina 2-mono-oxigenase, vagalume luciferase, wasasenia-luciferina 2-monooxigenase, oploforus-luciferina 2-monooxigenase, aromatase, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, citocromo P450 oxidase, óxido nítrico desoxigenase, óxido nítrico sintase, aromatase, fenilalanina hidroxilase, tirosinase, superóxido dismutase, ceruloplasmina, nitrogenase, deiodinase, glutationa S-transferase, catecol-O-metil transferase, DNA metiltransferase, histona metiltransferase, ATCase, Ornitinatranscarbamoilase, ácido aminolevulínico sintase, colina acetiltransferase, fator XIII, gama glutamil transpeptidase, transglutaminase, hipoxantina-guanina

fosforibosiltransferase, tiaminase, alanina transaminase, aspartato transaminase, butirato cinase, nuclease, endonuclease, exonuclease, hidrolase ácida, fosfolipase A, fosfolipase C, acetilcolinesterase, colinesterase, lipoproteína lipase, ubiquitina de terminação carboxi hidrolase L1, fosfatase, fosfatase alcalina, frutose bifosfatase, fosfodiesterase tipo 5 específica de CGMP, fosfolipase D, enzima de restrição tipo 1, enzima de restrição tipo 2, enzima de restrição tipo 3, enzima de restrição tipo 4, desoxirribonuclease I, RNase H, ribonuclease, amilase, sucrose, quitinase, lisozima, maltase, lactase, beta-galactosidase, hialuronidase, adenosilmetionina hidrolase, S-adenosil-L-homocisteína hidrolase, alquenilglicerofofocolina hidrolase, Alquenilglicerofoetanolamina hidrolase, colesterol-5,6-óxido hidrolase, hepoxilina-epóxido hidrolase, isocorismatase, leucotrieno-A4 hidrolase, limoneno-1,2-epóxido hidrolase, microsomal epóxido hidrolase, trans-epoxisucinato hidrolase, alanina aminopeptidase, enzima conversora de angiotensina, protease de serina, quimotripsina, tripsina, trombina, fator X, plasmina, acrosina, fator VII, fator IX, prolil oligopeptidase, Fator XI, elastase, fator XII, proteinase K, ativador do plasminogênio tecidual, proteína C, separase, pepsina, coalho, renina, tripsinogênio, plasmepsina, metaloproteinase de matriz, metaloendopeptidase, urease, beta-lactamase, arginase, adenosina desaminase, GTP ciclo-hidrolase I, nitritrilase, helicase, DnaB helicase, ATPase, NaKATPase, ATP sintase, quinureninase, haloacetato desalogenase, liase, ornitina descarboxilase, uridina monofosfato sintetase, descarboxilase aromática de L-aminoácido, RubisCO, anidrase carbônica, triptofano sintase, fenilalanina amônia-liase, cistationina gama-liase, cistationina beta-liase, leucotrieno C4 sintase, diclorometano desalogenase, halo-hidrina desalogenase, adenilato ciclase, guanilato ciclase, aminoácido racemase: fenilalanina racemase, serina racemase, mandelato racemase, UDP-glicose 4-epimerase,

metilmalonil-CoA epimerase, FKBP: FKBP1A, FKBP1B, FKBP2, FKBP3, FKBP5, FKBP6, FKBP8, FKBP9, FKBP10, FKBP52, FKBPL, ciclofilina, parvulina, prolil isomerase, 2-cloro-4-carboximetilenobut-2-en-1,4-olide isomerase, beta-caroteno isomerase, farnesol 2-isomerase, furifuramida isomerase, linoleato isomerase, maleato isomerase, maleilacetatoacetato isomerase, maleilpiruvato isomerase, parvulina, fotoisomerase, prolicopeno isomerase, prolil isomerase, retinal isomerase, retinol isomerase, zeta-caroteno isomerase, enoil CoA isomerase, proteína dissulfeto isomerase, fosfoglucomutase, muconato de cicloisomerase, 3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerase, tetra-hidroxipteridina cicloisomerase, inositol-3-fosfato sintase, carboxi-cis,cis-muconato ciclase, chalcona isomerase, cloromuconato cicloisomerase, (+)- bornil difosfato sintase, cicloecalenol cicloisomerase, alfapineno-óxido deciclase, dicloromuconato cicloisomerase, copalil difosfato sintase, ent-copalil difosfato sintase, sin-copalil-difosfato sintase, terpentedienil-difosfato sintase, halimadienil-difosfato sintase, (S)-beta-macrocarpeno sintase, licopeno epsilon-ciclase, licopena beta-ciclase, prosolanapirona-III cicloisomerase, D-ribose piranase, esteroide delta isomerase, topoisomerase, 6-carboxitetra-hidropterina sintase, FARSB, glutamina sintetase, CTP sintetase, argininossucinato sintetase, piruvato carboxilase, acetil-CoA carboxilase, e DNA ligase.

[0094] Enzimas mais preferidas podem ser selecionadas do grupo que consiste em carboxipeptidase,  $\beta$ -lactamase, citosina desaminase,  $\beta$ -glucuronidase, purina nucleosídeo fosforilase, granzima B, caspase e RNase, tal como HPR (RNase pancreática humana, barnase, RNA seminal bovina, onconase, RapLR1, angiogenina, dínero, exonuclease 2 tipo DIS3, fosfodiesterase ELAC2, RNase HIII, RNase T2, e tRNA ribonuclease de união.

[0095] Um fragmento funcional de uma enzima pode ser qualquer

fragmento de uma enzima, que tem a capacidade de mediar uma funcionalidade. Geralmente, tais fragmentos são chamados de "domínios". Portanto, o fragmento funcional de uma enzima pode ser qualquer domínio da enzima. Exemplos preferidos incluem fragmentos funcionais (por exemplo, domínios) das enzimas (exemplificadas) descritas acima. Preferivelmente, o fragmento funcional da enzima, que é compreendido pelo domínio funcional (adicional), é um domínio catalítico de uma enzima. O domínio catalítico de uma enzima é a região de uma enzima que interage com seu substrato para causar a reação enzimática. Por exemplo, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode ser um domínio catalítico de qualquer uma das seguintes enzimas: carboxipeptidase, β-lactamase, citosina desaminase, β-glucuronidase, nucleosídeo purina fosforilase, granzima B, caspase e RNase, tal como HPR (RNase pancreática humana, barnase, RNase seminal bovina, onconase, RapLR1, angiogenina, dicer, exonuclease 2 tipo DIS3, fosfodiesterase ELAC 2, RNase HIII, RNase T2 e ribonuclease de união a tRNA).

[0096] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreende ou consiste em um domínio veículo. Como usado neste documento, um "domínio veículo" refere-se a uma sequência de aminoácidos, que fornece a conjugação do anticorpo para outra molécula. Em um exemplo preferido, o domínio veículo proporciona a conjugação do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, por exemplo, a um fármaco, a um agente de imageamento ou a uma nanopartícula. Em geral, exemplos preferidos de conjugados, que podem ser úteis no contexto da presente invenção, são descritos em *Wu, A.M. e Senter, P. D. (2005) Arming*

*antibodies: Prospects and challenges for immunoconjugates.* *Nat. Biotechnol.* 23, 1137-1146.

[0097] Por exemplo, fármacos que podem ser conjugadas com o anticorpo incluem fármacos anticâncer, tais como os descritos em *Thomas A, Teicher BA, Hassan R; Antibody-drug conjugates for cancer therapy; Lancet Oncol. Jun 2016; 17 (6): e254-62. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30030-4.* Por exemplo, agentes de imageamento, que podem ser conjugados com o anticorpo, são descritos em *Steve Knutson, Erum Raja, Ryan Bomgarden, Marie Nlend, Aoshuang Chen, Ramaswamy Kalyanasundaram e Surbhi Desai; Development and Evaluation of a Fluorescent Antibody-Drug Conjugate for Molecular Imaging and Target Therapy of Pancreatic Cancer; PLoS One 2016; 11 (6): e0157762.* Tais fármacos são preferivelmente agentes citotóxicos. Exemplos preferidos de fármacos, que podem ser conjugados com o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno da presente invenção, incluem doxorrubicina, exotoxina A de *Pseudomonas truncada*, maitansinoide DM1.

[0098] Exemplos de agentes de imageamento, que podem ser conjugados ao anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno da presente invenção, incluem radioisótopos, tais como os descritos em *Schubert M, Bergmann R, Förster C, Sihver W, Vonhoff S, Klussmann S, Bethge L, Walther M, Schlesinger J, Pietzsch J, Steinbach J, Pietzsch HJ; Novel Tumor Pretargeting System Based on Complementary I-Configured Oligonucleotides; Bioconjug Chem. 2017 Abr 19; 28(4): 1176-1188* e em *Bhusari P, Vatsa R, Singh G, Parmar M, Bal A, Dhawan DK, Mittal BR, Shukla J; Development of Lu-177-trastuzumab for radioimmunotherapy of HER2 expressing breast cancer and its feasibility assessment in breast cancer patients; Int J Cancer. 2017 15 de fevereiro; 140 (4): 938-947.* Exemplos preferidos de radioisótopos incluem  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$  e  $^{177}\text{Lu}$ .

[0099] Outros exemplos de agentes de imageamento, que podem

ser conjugados com o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno da presente invenção, incluem corantes fluorescentes, pontos quânticos e óxido de ferro. Exemplos de corantes fluorescentes incluem aqueles descritos abaixo como domínios-repórteres. Um exemplo de nanopartículas de óxido de ferro é descrito em *Hengyi Xu, Zoraida P. Aguilar, Lily Yang, Min Kuang, Hongwei Duan, Yonghua Xiong, Hua Wei e Andrew Wang: Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood. Biomaterials. 2011 dez; 32 (36): 9758-9765.*

[00100] Conjugados de anticorpos (isto é, anticorpos conjugados com outras moléculas) são conhecidos na técnica. Em particular, a molécula conjugada ao anticorpo pode ser ligada ao anticorpo por um ligante clivável ou não clivável (por exemplo, como descrito em: *Thomas H. Pillow. Novel linkers and connections for antibody-drug conjugates to treat cancer and infectious disease. Pharmaceutical Patent Analyst Vol. 6, Nº 1, 3 de fevereiro de 2017, <https://doi.org/10.4155/ppa-2016-0032>*; ou em: *Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaïa N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. Nat Rev Drug Discov. 2017 maio; 16 (5): 315-337*). Exemplos de tais ligantes, que podem ser usados para ligar a molécula ao anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, são descritos, por exemplo, em *EP 2927227* e em *Thomas H. Pillow. Novel linkers and connections for antibody-drug conjugates to treat cancer and infectious disease. Pharmaceutical Patent Analyst Vol. 6, nº 1, 3 de fevereiro de 2017, <https://doi.org/10.4155/ppa-2016-0032>*. Entretanto, na técnica anterior, os ligantes estão ligados diretamente aos domínios Ig do anticorpo (a saber, aos domínios variáveis e / ou constantes do anticorpo), o que pode interferir com a funcionalidade dos domínios Ig do anticorpo. Em vista disso, o domínio funcional (adicional) do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção pode ser

usado para ligação de um ligante ao anticorpo. Ligantes preferidos diferem dos ligantes "clássicos", pois são projetados para conter cisteínas ou lisinas adicionais. Preferivelmente, o domínio veículo compreende um ou mais aminoácidos não canônicos úteis para a conjugação específica de sítio, por exemplo, como descrito em *Link AJ, Mock ML, Tirrell DA. Non-canonical amino acids in protein engineering. Curr Opin Biotechnol. Dezembro de 2003; 14 (6): 603-9.* Além disso, o domínio veículo pode ser projetado de modo que seja reconhecido por enzimas específicas (tais como enzima geradora de formilglicina, sortase e / ou transglutaminases), que modificam aminoácidos específicos que podem ser usados para conjugação como descrito em seção 6 de *Dennler P., Fischer E., Schibli R. Antibody conjugates: From heterogeneous populations to defined reagents. Antibodies. 2015; 4: 197–224.*

[00101] Domínios veículos preferidos adicionais são domínios para conjugação, tais como material de reação cruzada geneticamente modificado (CRM) da toxina da difteria, toxoide do tétano (T), complexo de proteína de membrana externa meningocócica (OMPC), toxoide da difteria (D) e proteína H. influenzae D (HiD), por exemplo, como descrito em *Pichichero ME: Protein carriers of conjugate vaccines characteristics, development, and clinical trials, Hum Vaccin Immunother. 2013 Dez; 9 (12): 2505-23.*

[00102] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreende ou consiste em um domínio-repórter. Um domínio-repórter é tipicamente codificado por um gene repórter. Domínios-repórteres são domínios cuja presença (por exemplo, em uma célula, organismo) pode ser facilmente observada. Domínios-repórteres incluem, por exemplo, proteínas fluorescentes, tais

como GFP / EGFP (proteína fluorescente verde / proteína fluorescente verde melhorada), YFP (proteína fluorescente amarela), RFP (proteína fluorescente vermelha) e CFP (proteína fluorescente ciano), luciferases e enzimas tais como beta-galactosidase e peroxidase. Domínios-repórteres podem ser úteis para abordagens *in vivo* e *ex vivo*. Por exemplo, proteínas fluorescentes fazem com que uma célula fique fluorescente quando excitada com luz de um comprimento de onda específico, luciferases fazem com que uma célula catalise uma reação que produz luz, e enzimas tais como a beta-galactosidase convertem um substrato em um produto colorido. Existem várias maneiras diferentes de medir ou quantificar um repórter, dependendo do repórter em particular e que tipo de dados de caracterização são desejados. Em geral, microscopia é útil para obter informações espaciais e temporais sobre a atividade do repórter, particularmente no nível de uma única célula. Citômetros de fluxo são mais adequados para medir a distribuição da atividade do repórter em uma grande população de células. Leitores de placas são geralmente melhores para realizar medições de população de muitas amostras diferentes ao longo do tempo. Enzima, tal como beta-galactosidase e peroxidase, que podem reagir a um determinado substrato, pode ser útil, por exemplo, para manchas *ex vivo* de amostras humanas, por exemplo, no diagnóstico de tumores.

[00103] Preferivelmente, o domínio-repórter compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos que codifica GFP / EGFP, YFP, RFP, CFP, lucifase, beta-galactosidase ou peroxidase. Além disso, marcadores fluorescentes como descritos abaixo também são úteis como domínios-repórteres.

[00104] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno de

acordo com a presente invenção compreende ou consiste em um domínio de localização. Em geral, um domínio de localização direciona uma proteína para um determinado alvo, por exemplo, no nível de um organismo ou célula. Um domínio de localização pode direcionar o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção para um local físico específico na célula, tal como o núcleo, a membrana, o periplasma, secreção fora da célula, para uma parte específica do corpo ou em outro lugar.

[00105] Por exemplo, de modo a direcionar o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção em uma célula, o domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um peptídeo de penetração celular. O termo "peptídeos de penetração celular" ("CPPs", também conhecido como "domínio de transdução de proteína" / "PTD") é geralmente usado para designar peptídeos curtos que são capazes de transportar diferentes tipos de moléculas de carga através da membrana plasmática e, portanto, facilitam a captação celular de várias cargas moleculares (de partículas de nanotamanho a pequenas moléculas químicas e grandes fragmentos de DNA). Peptídeos de penetração celular geralmente têm uma composição de aminoácidos que contém uma alta abundância relativa de aminoácidos carregados positivamente, como lisina ou arginina, ou possuem uma sequência que contém um padrão alternado de aminoácidos polares / carregados e aminoácidos hidrofóbicos, não polares. Esses dois tipos de estruturas são referidos como poliaciônicos ou anfipáticos, respectivamente. Tipicamente, os peptídeos de penetração celular (CPPs) são peptídeos de 8 a 50 resíduos que têm a capacidade de atravessar a membrana celular e entrar na maioria dos tipos de células. Alternativamente, eles também são chamados de domínio de transdução de proteínas (PTDs), refletindo sua origem como ocorrendo em proteínas naturais. Frankel e Pabo simultaneamente a

Green e Lowenstein descreveram a capacidade do ativador transcripcional de ativação *trans* do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-TAT) de penetrar nas células (Frankel, A.D e C.O Pabo, captação celular da proteína *tat* da imunodeficiência humana. *Cell*, 1988. 55 (6): p. 1189-93). Em 1991, transdução em células neurais do homeodomínio de Antennapedia (domínio de ligação ao DNA) de *Drosophila melanogaster* foi descrita (Joliot, A., et al., *Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88 (5): p. 1864-8). Em 1994, o primeiro CPP de peptídeo de 16-mer chamado Penetratina foi caracterizado a partir da terceira hélice do homeodomínio de Antennapedia (Derossi, D., et al., *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. *J BiolChem*, 1994 269 (14): p. 10444-50), seguida em 1998 pela identificação do domínio mínimo de TAT necessário para a transdução de proteínas (Vives, E., P. Brodin e B. Lebleu, *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus*. *J Biol Chem*, 1997. 272 (25): p. 16010-7). Nas duas últimas décadas, foram descritas dezenas de peptídeos de diferentes origens, incluindo proteínas virais, por exemplo, VP22 (Elliott, G. e P. O'Hare, *Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein*. *Cell*, 1997. 88 (2): p. 223-33), ou de venenos, por exemplo, melitina (Dempsey, CE, *The actions of melittin on membranes*. *BiochimBiophys Acta*, 1990. 1031 (2): p. 143-61), mastoporana (Konno, K., et al., *Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solidary wasp (Anterhynchium flavomarginatum micado)* *Toxicon*, 2000. 38 (11): p. 1505-15), maurocalcina (Esteve, E., et. al., *Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane*. *J Biol Chem*, 2005. 280 (13): p. 12833-9), crotamina

(Nascimento, FD, et al., *Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans*. *J. Biol Chem*, 2007. 282 (29): p. 21349-60) ou buforina (Kobayashi, S., et al., *Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin* 2. *Bioquímica*, 2004. 43 (49): p. 15610-6). CPPs sintéticos também foram projetados, incluindo a poli-arginina (R8, R9, R10 e R12) (Futaki, S., et al., *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptide having potential as carriers for intracellular protein delivery*. *J. Biol Chem*, 2001. 276 (8): p. 5836-40) ou transportan (Pooga, M., et al., *Cell penetration by transportan*. *FASEB J*, 1998. 12 (1): p. 67-77). Qualquer uma das CPPs descritas acima pode ser usada como peptídeo de penetração celular no anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção. Várias CPPs, que podem ser usadas como peptídeo de penetração celular no anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção, também são divulgadas na revisão: Milletti, F., *Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape*. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012.

[00106] Outro exemplo de um domínio de localização, que pode ser usado no anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, de acordo com a presente invenção, é um domínio para atravessar a barreira hematoencefálica, por exemplo, como descrito em Farrington GK, Caram-Salas N, Haqqani AS, Brunette E, Eldredge J, Pepinsky B, Antognetti G, Baumann E, Ding W, Garber E, Jiang S, Delaney C, Boileau E, Sisk WP, Stanimirovic DB. *A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics*. *FASEB J*. 2014 Nov; 28 (11): 4764-78.

[00107] Outro exemplo de um domínio de localização é um domínio de localização nuclear. Um domínio de localização nuclear direciona uma proteína, em particular o anticorpo ou fragmento de ligação a

antígeno de acordo com a presente invenção, para o núcleo celular. Um domínio de localização nuclear pode ser útil para um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno para bloquear a atividade de um fator de transcrição e para modular a expressão de gene. Exemplos preferidos de domínios de localização nuclear são descritos em *Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) "A short amino acid sequence able to specify nuclear location"* *Cell* 39 (3Pt 2): 499–509 e em *Lusk CP, Blobel G, King MC (maio de 2007) "Highway to inner nuclear membrane: rules for the road"* *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (5): 414–20.

[00108] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em um marcador. Mais preferivelmente, o marcador é um marcador de afinidade, um marcador de solubilização, um marcador de cromatografia, um marcador de epítopo ou um marcador de fluorescência.

[00109] Um marcador é uma sequência de peptídeo enxertada em uma proteína recombinante. Exemplos de marcadores incluem marcadores de afinidade, marcadores de solubilização, marcadores de cromatografia, marcadores de epítopo, marcadores de fluorescência e marcadores de proteína. Marcadores de afinidade podem ser usados para purificar proteínas de sua fonte biológica bruta usando uma técnica de afinidade. Exemplos de marcadores de afinidade incluem proteína de ligação à quitina (CBP), proteína de ligação à maltose (MBP) e glutationa-S-transferase (GST). Outro exemplo é o marcador de poli(His) que se liga a matrizes metálicas. Marcadores de solubilização podem ser usados, especialmente para proteínas recombinantes expressas em espécies com deficiência de acompanhante, como *E. coli*,

para auxiliar no dobramento adequado das proteínas e evitar que elas se precipitem. Exemplos de marcadores de solubilização incluem tioredoxina (TRX) e poli(NANP). Marcadores de cromatografia podem ser usados para alterar propriedades cromatográficas da proteína para fornecer uma resolução diferente através de uma técnica de separação em particular. Marcadores de cromatografia geralmente consistem em aminoácidos polianiônicos, tais como um marcador de FLAG. Marcadores de epítopos são sequências de peptídeos curtas que são escolhidas porque os anticorpos de alta afinidade podem ser produzidos de maneira confiável em muitas espécies diferentes. Estes são geralmente derivados de genes virais, que explicam sua alta imunorreatividade. Marcadores de epítopo incluem marcadores V5, marcadores Myc, marcadores HA e marcadores NE. Esses marcadores são particularmente úteis para experimentos de *Western blotting*, imunofluorescência e imunoprecipitação, embora também encontrem uso na purificação de anticorpos. Marcadores de fluorescência podem ser usados para fornecer leitura visual de uma proteína. GFP e suas variantes são os marcadores de fluorescência mais usados. GFP pode ser usado como um repórter dobrável (fluorescente se dobrado, incolor, se não). Marcadores de proteína podem permitir modificação enzimática específica (tal como biotinilação pela biotina ligase) ou modificação química (tal como reação com FlAsH-EDT2 para imageamento por fluorescência). Marcadores podem ser combinados, por exemplo, de modo a conectar proteínas a vários outros componentes. Os marcadores podem ser removíveis por agentes químicos ou por meios enzimáticos, tais como proteólise ou união de interinas.

[00110] Exemplos preferidos de marcadores incluem, mas não são limitados a, os seguintes: marcador twin-Strep (SAWSHPQFEKGGSGGGSGGSAWSHPQFEK; SEQ ID NO: 20); AviMarcador, um peptídeo que permite biotinilação pela enzima BirA e,

portanto, a proteína pode ser isolada por estreptavidina (GLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO: 21); Calmodulina-marcador, um peptídeo ligado pela proteína calmodulina (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSLGAL; SEQ ID NO: 22); marcador de poliglutamato, um peptídeo que se liga eficientemente à resina de troca aniônica, tal como Mono-Q (EEEEEE; SEQ ID NO: 23); Marcador E, um peptídeo reconhecido por um anticorpo (GAPVPYPDPLEPR; SEQ ID NO: 24); marcador FLAG, um peptídeo reconhecido por um anticorpo (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 25); marcador HA, um peptídeo da hemaglutinina reconhecido por um anticorpo (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 26); marcador His, 5 a 10 histidinas ligadas por um quelato de níquel ou cobalto (HHHHHH; SEQ ID NO: 27); marcador Myc, um peptídeo derivado de c-myc reconhecido por um anticorpo (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 28); marcador NE, um peptídeo sintético de 18 aminoácidos (TKENPRSNQEESYDDNES; SEQ ID NO: 29) reconhecido por um anticorpo monoclonal IgG1, que é útil em um amplo espectro de aplicações, incluindo *Western blotting*, ELISA, citometria de fluxo, imunocitoquímica, imunoprecipitação, e purificação por afinidade de proteínas recombinantes; marcador S, um peptídeo derivado da Ribonuclease A (KETAAAKFERQHMDS; SEQ ID NO: 30); marcador SBP, um peptídeo que se liga à estreptavidina (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP; SEQ ID NO: 31); Marcador Soft 1, para expressão em mamíferos (SLAELLNAGLGGSS; SEQ ID NO: 32); Marcador Soft 3, para expressão procariótica (TQDPSRVG; SEQ ID NO: 33); marcador Strep, um peptídeo que se liga à estreptavidina ou à estreptavidina modificada chamada estreptactina (marcador Strep II: WSHPQFEK; SEQ ID NO: 34); marcador TC, um marcador de tetracisteína que é reconhecido pelos compostos biarsênicos FIAsH e ReAsH (CCPGGCC; SEQ ID NO: 35); marcador V5, um peptídeo reconhecido por um anticorpo

(GKPIPPLLGLDST; SEQ ID NO: 36); marcador VSV, um peptídeo reconhecido por um anticorpo (YTDIEMNRLGK; SEQ ID NO: 37); marcador Xpress (DLYDDDDK; SEQ ID NO: 38); Marcador Isopep, um peptídeo que se liga covalentemente à proteína pilina-C (TDKDMTITFTNKKDAE; SEQ ID NO: 39); marcador Spy, um peptídeo que se liga covalentemente à proteína SpyCatcher (AHIVMVDAYKPTK; SEQ ID NO: 40); marcador Snoop, um peptídeo que se liga covalentemente à proteína SnoopCatcher (KLGDIEFIKVNK; SEQ ID NO: 41); marcador Ty1 (EVHTNQDPLD; SEQ ID NO: 42); BCCP (Proteína Veículo de Carboxila de Biotina), um domínio de proteína biotinilada por BirA, permitindo o reconhecimento por estreptavidina; marcador glutationa-S-transferase (GST), uma proteína que se liga à glutationa imobilizada; etiqueta de proteína fluorescente verde, uma proteína que é espontaneamente fluorescente e pode ser ligada por nanocorpos; marcador Halo, um haloalcano desalogenase bacteriano mutado que se liga covalentemente a um substrato de haloalcano reativo, permite a ligação a uma ampla variedade de substratos; marcador de proteína de ligação à maltose (MBP), uma proteína que se liga à amilose agarose; marcador Nus (substância de utilização N); marcador tioredoxina (Trx); marcador do antígeno 8-kDa de Fasciola hepática (Fh8); marcador pequeno de ubiquitina modificada (SUMO); marcador de sequências de peptídeo potenciador de solubilidade (SET); marcador de domínio IgG B1 da Proteína G (GB1); marcador de domínio ZZ de repetição de IgG de Proteína A (ZZ); marcador de etiqueta onipresente de mudança de solubilidade (SNUT); marcador de proteína com dezessete quilodalton (Skp); marcador da proteína cinase do fago T7 (T7PK); marcador da proteína A (EspA) secretada por *E. coli*; marcador de proteína do bacteriófago monomérico T7 0,3 (proteína Orc) / Mocr; marcador do inibidor da tripsina de *E. coli* (Ecotin); marcador da proteína de ligação ao cálcio (CaBP); marcador de arseniato redutase

responsiva ao estresse (ArsC); marcador de fragmento de N-terminal do fator de iniciação da tradução IF2 (domínio I IF2); marcador de expressividade (fragmento de N-terminal do fator de iniciação da tradução IF2); marcador de proteínas responsivas ao estresse RpoA, SlyD, Tsf, RpoS, PotD, Crr; marcadores de proteínas ácidas de *E. coli* msyB, yjgD, rpoD (ver, por exemplo, marcadores de Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. de fusão para solubilidade, purificação e imunogenicidade de proteínas em *Escherichia coli: the novel Fh8 system. Frontiers in Microbiology*. 2014; 5: 63, em particular a Tabela 1 em Costa et al., 2014).

[00111] Portanto, é preferido que o marcador compreenda ou consista em uma sequência de aminoácidos de acordo com qualquer uma das SEQ ID NO: 20 - 42 ou uma variante de sequência da mesma. Mais preferivelmente, o marcador é um marcador Strep, em particular de acordo com a SEQ ID NO: 20 ou 34.

[00112] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, comprehende ou consiste em um receptor ou um fragmento funcional do mesmo. Um "receptor" é um polipeptídeo ou proteína que liga uma molécula (sinal) específica, seu ligante e que pode iniciar uma resposta, por exemplo, em uma célula. Na natureza, receptores estão localizados principalmente na membrana celular (receptores da superfície celular) ou intracelularmente (receptores intracelulares). Receptores preferidos incluem receptores ligados a canais iônicos (ionotrópicos), receptores hormonais ligados a proteínas G (metabotrópicos) e receptores hormonais ligados a enzimas, receptores citoplasmáticos e receptores nucleares. Para receptores que formam um dímero, o domínio funcional da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender dois domínios

idênticos conectados por um ligante.

[00113] Receptores preferidos são receptores compreendendo um domínio similar a Ig. Em particular, o receptor pode ser um receptor inibidor compreendendo um domínio similar a Ig ou um receptor de ativação compreendendo um domínio similar a Ig. Exemplos preferidos de receptores inibitórios compreendendo um domínio similar a Ig incluem proteína 1 de morte celular programada (PD-1 ou PD1), proteína 4 associada a linfócitos T citotóxica (CTLA4), atenuador de linfócitos B e T (BTLA), imunoglobulina de célula T e domínio de mucina contendo 3 (TIM-3; também conhecido como receptor 2 celular de vírus da hepatite A (HAVCR2)), imunorreceptor de célula T com domínios Ig e ITIM (TIGIT), receptor 1 de glicoproteína CD200 de superfície celular (CD200R1), 2B4 (CD244; SLAMF4), transcrito 2 tipo Trem (receptor desencadeante expresso em células mieloides) (TLT2), membro 4 da subfamília B do receptor tipo imunoglobulina de leucócito (LILRB4) e receptor tipo imunoglobulina de célula exterminadora, dois domínios Ig e cauda citoplasmática longa 2 (KIR2DL2). Exemplos preferidos de receptores de ativação compreendendo um domínio similar a Ig incluem coestimulador de célula T induzível (ICOS) e CD28. Particularmente, o receptor preferivelmente é proteína 1 de morte celular programada (PD-1 ou PD1) ou molécula de ativação linfocítica de sinalização (SLAM).

[00114] Outros receptores preferidos são receptores solúveis, por exemplo, como divulgado em Heaney ML, Golde DW. *Soluble receptors in human disease*. J. Leukoc Biol. Agosto de 1998; 64 (2): 135-46. Exemplos do mesmo incluem TNFR (receptor do fator de necrose tumoral), p55, p75, Fas (CD95), receptor do fator de crescimento de nervo, CD27, CD30, receptor de hormônio do crescimento, receptor GM-CSF, receptor de eritropoietina (EpoR), receptor de trombopoietina, receptor de G-CSF, IL-1RI (receptor I de interleucina 1), IL-1RII (receptor II de interleucina 1), IL-2Ra (receptor α de interleucina 2, Tac,

CD25), IL-4R (receptor de interleucina 4), IL-5R $\alpha$  (receptor  $\alpha$  da interleucina 5), IL-7R (receptor de interleucina 7), IL-6R $\alpha$  (receptor de interleucina 6  $\alpha$ ), gp130, CNTFR (receptor de fator neurotrófico ciliar), LIFR (receptor de fator inibidor de leucemia), receptor de leptina, IL-11R (receptor de interleucina 11), IL-12 p40 (receptor p40 de interleucina 12), receptor de fator de célula-tronco (c-kit), receptor de interferon, receptor de lipopolissacarídeo (CD14), receptor de complemento tipo I (CD35), receptor de hialuronato (CD44), CD58, receptor de IgE (Fc $\epsilon$ RII, CD23), IgG receptor (Fc $\gamma$ RII), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), receptor  $\beta$  III de fator de crescimento transformador, receptor de fator de crescimento epidérmico (c-erb B), receptor de fator de crescimento endotelial vascular, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos, receptor de fator 1 estimulante de colônias (MCFR, c-fms), ARK (receptor cinase adrenérgico), Tie (receptor de angiopoietina), receptor de insulina, receptor de fator II de crescimento tipo insulina e receptor de 6-fosfato de manose.

[00115] Mais preferivelmente, o receptor solúvel é um receptor de citocina solúvel, tal como um receptor de superfamília de receptor de citocina classe I, um receptor de superfamília de receptor de citocina classe II, um receptor de família IL-1 / TLR, um receptor de família de receptor de TGF- $\beta$ , um receptor de superfamília de TNFR ou IL-17R. Receptores preferidos da superfamília de receptores de citocina classe I incluem IL-4R $\alpha$ , IL-5R $\alpha$ , IL-6R $\alpha$ , IL-7R $\alpha$ , IL-9R $\alpha$ , EpoR, G-CSFR, GM-CSFR $\alpha$ , gp130 e LIFR $\alpha$ . Receptores preferidos da superfamília de receptores de citocina classe II incluem IFNR do tipo I, tal como IFNAR1 e IFNAR2 $\alpha$ . Receptores preferidos da família IL-1 / TLR incluem IL-1RII e IL-1RacP. Receptores preferidos da família de receptores TGF- $\beta$  incluem T $\beta$ R-I e cinase 7 tipo receptor de ativina. Receptores preferidos da superfamília TNFR incluem TNFRSF6 / Fas / CD95 e TNFRSF9 / 4-1BB / CD137. Portanto, exemplos preferidos de receptores de citocinas

incluem IL-4R $\alpha$ , IL-5R $\alpha$ , IL-6R $\alpha$ , IL-7R $\alpha$ , IL-9R $\alpha$ , EpoR, G-CSFR, GM-CSFR $\alpha$ , gp130, LIFR $\alpha$ , IFNAR1, IFNAR2 $\alpha$ , IL-1RII, IL-1RacP, T $\beta$ R-I, cinase 7 tipo receptor de ativina, TNFRSF6 / Fas / CD95, TNFRSF9 / 4-1BB / CD137 e IL-17R. Um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo um domínio funcional compreendendo tal receptor ou um fragmento funcional do mesmo pode modular a resposta inflamatória enquanto o anticorpo atinge seu alvo. Por exemplo, receptores IL-1 tipo II solúveis (sIL-1RII), que são gerados principalmente por clivagem proteolítica em resposta a uma variedade de estímulos, podem atenuar a bioatividade excessiva de IL-1 ligando preferivelmente por IL-1 $\beta$ . Por exemplo, IL-1RAcP solúvel, que é gerado por união alternativa em vez de clivagem de ectodomínio. Por exemplo, os receptores IL-6 solúveis ligam-se a IL-6 com uma afinidade semelhante à IL-6R de membrana, prolongando, assim, a meia-vida de IL-6.

[00116] Um fragmento funcional de um receptor pode ser qualquer fragmento de um receptor, que tem a capacidade de mediar uma funcionalidade. Geralmente, tais fragmentos são chamados de "domínios". Portanto, o fragmento funcional de um receptor pode ser qualquer domínio do receptor. Exemplos preferidos incluem fragmentos funcionais (por exemplo, domínios) dos receptores (exemplificados) descritos acima. Preferivelmente, o fragmento funcional do receptor, que é compreendido pelo domínio funcional (adicional), é um domínio extracelular de um receptor. Por exemplo, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode ser um domínio extracelular de qualquer um dos seguintes receptores IL-4R $\alpha$ , IL-5R $\alpha$ , IL-6R $\alpha$ , IL-7R $\alpha$ , IL -9R $\alpha$ , EpoR, G-CSFR, GM-CSFR $\alpha$ , gp130, LIFR $\alpha$ , IFNAR1, IFNAR2 $\alpha$ , IL-1RII, IL-1RacP, T $\beta$ R-I, cinase 7 tipo receptor de activina, TNFRSF6 / Fas / CD95, TNFRSF9 / 4-1BB / CD137, IL-17R, p55, p75, receptor do fator

de crescimento nervoso, CD27, CD30, receptor de hormônio de crescimento, receptor de trombopoietina, IL-1RI (receptor I de interleucina 1), IL-2Ra (receptor α de interleucina 2, Tac, CD25 ), CNTFR (receptor de fator neurotrófico ciliar), receptor de leptina, IL-11R (receptor de interleucina 11), IL-12 p40 (receptor de interleucina 12 p40), receptor de fator de célula-tronco (c-kit), receptor de interferon, receptor de lipopolissacarídeo (CD14 ), receptor de complemento tipo I (CD35), receptor de hialuronato (CD44), CD58, receptor de IgE (FcεRII, CD23), receptor de IgG (FcγRII), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), receptor β de fator de crescimento transformador ou III, receptor de fator de crescimento epidérmico (c-erb B), receptor de fator de crescimento endotelial vascular, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos, receptor de fator 1 de estimulação de colônias (MCFR, c-fms), ARK (receptor cinase adrenérgico), Tie (receptor de angiopoietina), receptor de insulina, receptor de fator II de crescimento tipo insulina II e receptor de 6-fosfato de manose.

[00117] Preferivelmente, o fragmento funcional do receptor, que é compreendido pelo domínio funcional (adicional), é um domínio similar a Ig. Por exemplo, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode ser um domínio similar a Ig de qualquer um dos seguintes receptores PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS ou CD28. Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não comprehende um domínio de transmembrana. Mais preferivelmente, o receptor comprehende ou consiste em uma sequência de aminoácidos como estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs

13 a 15 ou uma variante de sequência funcional da mesma.

[00118] Além disso, é particularmente preferido que o domínio funcional da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo compreenda ou consista em um fragmento de receptor 1 tipo imunoglobulina associado a leucócitos mutados (LAIR1), como descrito em WO 2016/207402 A1. O fragmento LAIR1 mutado, como estabelecido na SEQ ID NO: 13, ou uma variante de sequência da mesma tendo pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente 90 %, particularmente preferivelmente 95%, e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência, é o mais preferido.

[00119] Particularmente, o domínio funcional da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo preferivelmente comprehende ou consiste em um fragmento similar a Ig de PD1 ou SLAM, tal como uma sequência de aminoácidos como estabelecido na SEQ ID NO: 14 ou na SEQ ID NO: 15; ou uma variante de sequência do mesmo tendo pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente 90%, particularmente preferivelmente 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

[00120] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, comprehende ou consiste em um ligante ou um fragmento funcional do mesmo. Um "ligante" é uma molécula, que se liga especificamente a um sítio específico em uma proteína ou qualquer outra molécula. No contexto da presente invenção, o ligante é um peptídeo, polipeptídeo ou proteína, uma vez que está

compreendido em uma cadeia de polipeptídeo. Ligação de um ligante ocorre em particular por forças intermoleculares, tais como ligações iônicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Exemplos preferidos de ligantes são citocinas e ligantes de qualquer um dos receptores descritos acima, em particular os receptores PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2 , ICOS ou CD28, como PD-L1, PD-L2, B7-1, B7-2, B7-H4 (homólogo B7), galectina-9, receptor de poliovírus (PVR), glicoproteína de membrana OX-2, CD48, B7-H3 (homólogo de B7), MHCI e ICOS-L.

[00121] Preferivelmente, o ligante é uma citocina ou um fragmento funcional da mesma. Citocinas são geralmente pequenas proteínas (~ 5 a 20 kDa) que são importantes na sinalização celular. Eles são liberados pelas células e afetam o comportamento de outras células, e às vezes afetam o comportamento da própria célula liberadora. Uma citocina pode ser selecionada de quimiocinas, tais como a família SIS de citocinas, a família SIG de citocinas, a família SCY de citocinas, a superfamília e interleucinas do fator plaquetário-4, os ligantes de quimiocinas CC (CCL) -1 a -28 (em particular CCL12), CXCL1 - CXCL17, XCL1 (linfotactina- $\alpha$ ) e XCL2 (linfotactina- $\beta$ ), fracalquina (ou CX3CL1); interferons, tais como IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III, em particular IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IL10R2 (também chamado de CRF2-4) e IFNLR1 (também chamado de CRF2-12); interleucinas, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35 e IL-36; linfocinas, tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF e Interferon-gama; fatores de necrose tumoral, tais como CD40LG (TNFSF5); CD70 (TNFSF7); EDA; FASLG (TNFSF6); LTA (TNFSF1); LTB (TNFSF3); TNF, TNF $\alpha$ , TNFSF4 (OX40L); TNFSF8

(CD153); TNFSF9; TNFSF10 (TRILHA); TNFSF11 (RANKL); TNFSF12 (TWEAK); TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15; e TNFSF18; e fatores estimuladores de colônias, como CSF1 (também conhecido como “fator estimulador de colônias de macrófagos”), CSF2 (também conhecido como “fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos”; GM-CSF e sargamostim), CSF3 (também conhecido como “fator de estimulação de colônia de granulócitos”; G-CSF e filgrastim), bem como CSFs sintéticos, tais como Promegapoitina. Portanto, exemplos preferidos de citocinas incluem IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 , IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL -24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36 , CCL-1, CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-6, CCL-7, CCL-8, CCL-9, CCL-10, CCL-11, CCL-12, CCL -13, CCL-14, CCL-15, CCL-16, CCL-17, CCL-18, CCL-19, CCL-20, CCL-21, CCL-22, CCL-23, CCL-24, CCL-25 , CCL-26, CCL-27, CCL-28, CXCL1, CXCL2, CXCL3,CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2, fratalina, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IL10R2, IFNLR1, CD40LG, CD70, EDA, FASLG (TNFSF6), LTA (TNFSF1), LTB (TNFSF3), TNF $\alpha$ , TNFSF4 (OX40L), TNFSF8 (CD153), TNFSF9, TNFSF10 (CD153)), TNFSF11 (RANKL), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF15, TNFSF18, CSF1, CSF2 (GM-CSF) e CSF3 (G-CSF). Exemplos mais preferidos de citocinas incluem IL-2, IL6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, interferons, GM-CSF e TNF. Citocinas são produzidas por uma ampla gama de células, incluindo células imunes como macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e mastócitos, bem como células endoteliais, fibroblastos e várias células estromais, nas quais uma determinada citocina pode ser produzida por mais de um tipo de célula. Um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que

compreende um domínio funcional que compreende uma citocina ou um fragmento funcional do mesmo pode provocar uma resposta imunoestimulante pró-inflamatória ou uma resposta imunossupressora ou citotóxica anti-inflamatória, dependendo da citocina selecionada.

[00122] Outros ligantes preferidos incluem, por exemplo, hormônios, que são peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Hormônios são moléculas sinalizadoras, transportadas pelo sistema circulatório para atingir órgãos distantes, em particular para regular a fisiologia e o comportamento. Hormônios são tipicamente produzidos por glândulas em organismos multicelulares. Um hormônio particularmente preferido é hormônio de crescimento (humano). Outros exemplos de hormônios incluem TRH, vasopressina, insulina, prolactina, ACTH, oxitocina, peptídeo atrial-natriurético (ANP), glucagon, somatostatina, colecistocinina, gastrina, leptina, angiotensina II, fator 2 de crescimento básico de fibroblastos e proteína relacionada a hormônio da paratiireoide.

[00123] Um fragmento funcional de um ligante pode ser qualquer fragmento de um ligante, que tem a capacidade de mediar uma funcionalidade. Geralmente, tais fragmentos são chamados de "domínios". Portanto, o fragmento funcional de um ligante pode ser qualquer domínio do ligante. Exemplos preferidos incluem fragmentos funcionais (por exemplo, domínios) dos ligantes (exemplificados) descritos acima. Preferivelmente, o fragmento funcional do ligante, que é compreendido pelo domínio funcional (adicional), é um domínio similar a Ig.

[00124] Preferivelmente, o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em um (independente) sítio de ligação. Portanto, é preferido que a primeira e /

ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreenda um sítio de ligação (independente).

[00125] Em geral, o "sítio de ligação (independente)" é uma região da cadeia de polipeptídeo à qual um alvo específico (por exemplo, uma molécula e / ou um íon) pode se ligar, em particular pela formação de uma ligação química, por exemplo, ligação não covalente. Uma ligação não covalente é uma ligação química relativamente fraca que não envolve um compartilhamento íntimo de elétrons. Múltiplas ligações não covalentes frequentemente estabilizam a conformação de macromoléculas e mediam interações altamente específicas entre moléculas. Portanto, o sítio de ligação é um domínio funcional da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo, que fornece funcionalidade de ligação. Em particular, o sítio de ligação não é um ligante, tais como um ligante GS. Embora o sítio de ligação possa opcionalmente compreender um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, ele preferivelmente não consiste num ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em outras palavras, mesmo que o sítio de ligação compreenda um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS, preferivelmente compreende uma sequência de aminoácidos adicional mediando uma função distinta de (puramente) ligar dois peptídeos um ao outro. Portanto, o sítio de ligação é preferivelmente distinto de um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Em particular, o sítio de ligação pode não compreender um ligante (peptídeo), tal como um ligante GS. Um ligante normalmente não fornece uma funcionalidade de ligação.

[00126] Importantemente, o sítio de ligação (independente) (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo não compreende um fragmento da segunda cadeia de polipeptídeo. Portanto, o sítio de ligação independente opcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo não

compreende um fragmento da primeira cadeia de polipeptídeo. Em outras palavras, a segunda cadeia de polipeptídeo (em particular qualquer fragmento, tal como até mesmo um único aminoácido do mesmo) não é necessária para ou está envolvida no sítio de ligação independente da primeira cadeia de polipeptídeo. Além disso, se a segunda cadeia de polipeptídeo também compreender um sítio de ligação independente, a primeira cadeia de polipeptídeo (em particular qualquer fragmento, tal como até mesmo um único aminoácido do mesmo) não é necessária ou envolvida no sítio de ligação independente da segunda cadeia de polipeptídeo. Portanto, o sítio de ligação independente difere de um sítio de ligação a antígeno formado pelo domínio variável da primeira cadeia de polipeptídeo juntamente com o domínio variável da segunda cadeia de polipeptídeo. Em outras palavras, o sítio de ligação independente difere de um sítio de ligação a antígeno formado por domínios variáveis de duas cadeias de polipeptídeos diferentes (no entanto, o sítio de ligação independente ainda pode compreender um sítio de ligação a antígeno - se os domínios variáveis envolvidos estiverem localizados em uma única cadeia de polipeptídeo, como descrito em mais detalhes abaixo).

[00127] Preferivelmente, o sítio de ligação (independente) é selecionado do grupo que consiste em receptores e fragmentos funcionais dos mesmos, ligantes e fragmentos funcionais dos mesmos, moléculas CD e fragmentos funcionais dos mesmos, anticorpos de cadeia única e fragmentos de ligação a antígeno do mesmo, antígenos e fragmentos funcionais dos mesmos, e marcadores.

[00128] Mais preferivelmente, o sítio de ligação (independente) compreende ou consiste em um receptor ou um fragmento funcional do mesmo. Receptores normalmente são capazes de se ligar a um ligante (específico). Portanto, receptores também podem ser referidos como sítios de ligação (independentes). Vários receptores são descritos

acima e modalidades preferidas e exemplos dos mesmos se aplicam em conformidade.

[00129] No contexto do sítio de ligação, um fragmento funcional de um receptor é tal fragmento do receptor, que retém a capacidade do receptor de se ligar ao seu ligante. Desde que o sítio de ligação possa compreender um receptor ou um fragmento funcional do mesmo, é a função de ligação do receptor, à qual o termo "funcional" se refere no contexto do sítio de ligação. Outros fragmentos / domínios do receptor podem preferivelmente não ser compreendidos pelo sítio de ligação (independente). Por exemplo, um receptor pode compreender um ou mais domínios de transmembranas, que normalmente não estão envolvidos na função de ligação do receptor e que, portanto, preferivelmente não estão incluídos no sítio de ligação (independente). Portanto, é mais preferido que o fragmento do receptor, que é compreendido pelo sítio de ligação (independente), seja apenas o sítio de ligação ao receptor (em particular sem quaisquer outros domínios do receptor).

[00130] Também é mais preferido que o sítio de ligação (independente) compreenda ou consista em um ligante ou um fragmento funcional do mesmo. Ligantes são tipicamente capazes de se ligar a um receptor (específico). Portanto, ligantes também podem ser referidos como sítios de ligação (independentes). Vários ligantes são descritos acima e modalidades preferidas e exemplos dos mesmos se aplicam em conformidade.

[00131] No contexto do sítio de ligação, um fragmento funcional de um ligante é tal fragmento do ligante, que retém a capacidade de ligação do ligante. Como o sítio de ligação pode compreender um ligante ou um fragmento funcional do mesmo, é a função de ligação do ligante, à qual o termo "funcional" se refere no contexto do sítio de ligação. Outros fragmentos / domínios do ligante podem preferivelmente não estar

compreendidos pelo sítio de ligação (independente). Portanto, é mais preferido que o fragmento do ligante, que é constituído pelo sítio de ligação (independente), seja meramente o sítio de ligação do ligante (em particular sem quaisquer outros domínios do ligante).

[00132] Preferivelmente, o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo é uma molécula CD (cluster de diferenciação) ou um fragmento funcional da mesma. Uma molécula de CD (cluster de diferenciação) é um marcador da superfície celular. Moléculas de CD geralmente atuam como receptores ou ligantes ou estão envolvidas na adesão celular. A nomenclatura de CD foi desenvolvida e é mantida através do *workshop HLDA* (Antígenos de Diferenciação de Leucócitos Humanos) iniciado em 1982. Exemplos de moléculas de CD, que podem servir como sítios de ligação no contexto da presente invenção, podem ser recuperados, por exemplo, de uma variedade de fontes conhecidas pela pessoa versada na técnica, tal como <http://www.ebioscience.com/resources/human-cd-chart.htm>, "BD Biosciences's "*Human and Mouse CD Marker Handbook*" (recuperável em

[https://www.bdbiosciences.com/documents/cd\\_marker\\_handbook.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf)) ou em [www.hcdm.org](http://www.hcdm.org). Portanto, o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo pode ser um marcador de CD ou um fragmento funcional do mesmo, por exemplo, um marcador de CD (humano) descrito em *BD Bioscience's "Human and Mouse CD Marker Handbook"* (recuperável em

[https://www.bdbiosciences.com/documents/cd\\_marker\\_handbook.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf)) ou em outras fontes de "gráficos de marcadores de CD", que normalmente também indicam os parceiros de ligação, de modo que um sítio de ligação apropriado possa ser selecionado.

[00133] Um fragmento funcional de uma molécula de CD é um tal fragmento da molécula de CD, que retém a capacidade de ligação da molécula de CD. No contexto da presente invenção, o sítio de ligação pode compreender uma molécula de CD ou um fragmento funcional do mesmo e, portanto, é a função de ligação da molécula de CD à qual o termo "funcional" se refere. Outros fragmentos / domínios da molécula de CD podem preferivelmente não compreender o sítio de ligação (independente). Portanto, é mais preferido que o fragmento da molécula de CD, que é compreendido pelo sítio de ligação (independente), é apenas o sítio de ligação da molécula de CD (em particular sem quaisquer outros domínios da molécula de CD). Preferivelmente, o fragmento funcional da molécula de CD, que é compreendido pelo sítio de ligação (independente), é um domínio similar a Ig.

[00134] Preferivelmente, o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo é um anticorpo de cadeia única (tal como scFv ou VHH) ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Também é preferido que o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo seja um antígeno ou um fragmento funcional do mesmo, tal como um epítopo.

[00135] Preferivelmente, o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo é um anticorpo de cadeia única ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Um anticorpo de cadeia única é um anticorpo recombinante que consiste apenas em uma única cadeia de polipeptídeo. Exemplos preferidos de anticorpos de cadeia única incluem anticorpos de cadeia única sem domínios constantes, tais como anticorpos de domínio único, anticorpos de cadeia única com base em fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) e diacorpos de cadeia única (scDb) e anticorpos de cadeia única com domínios constantes, tais

como fragmentos Fab de cadeia única (scFab; Hust M, Jostock T, Menzel C, Voedisch B, Mohr A, Brenneis M, Kirsch MI, Meier D, Dübel S. Fragmento Fab de cadeia única (scFab) BMC Biotechnol. Março de 2007 8;7: 14).

[00136] Exemplos preferidos de anticorpos de cadeia única baseados em fragmentos variáveis de cadeia única (scFv's) incluem scFv (um único domínio VH e um único domínio VL) e scFvs em tandem, tais como tandem-di-scFv (BiTE), tandem-tri-scFv e tandem-tetra-scFv.

[00137] Um anticorpo de domínio único (também conhecido como "nanocorpo") é um fragmento de anticorpo que compreende / consiste em um único domínio variável (monomérico). Como um anticorpo inteiro, um anticorpo de domínio único é capaz de se ligar seletivamente a um antígeno específico. Os primeiros anticorpos de domínio único foram projetados de anticorpos de cadeia pesada encontrados em camelídeos; estes são chamados de "VHH" ou "fragmentos de VHH". Peixes cartilaginosos também possuem anticorpos de cadeia pesada (IgNAR, 'novo receptor de antígeno de imunoglobulina'), do qual os anticorpos de domínio único, chamados " $V_{NAR}$ " ou "fragmentos  $V_{NAR}$ ", podem ser obtidos. Uma abordagem alternativa é dividir os domínios variáveis diméricos de imunoglobulina G comum (IgG) de humanos ou camundongos em monômeros. Portanto, anticorpos de domínio único podem ser derivados de domínios variáveis de cadeia pesada ou leve (VH ou VL). Exemplos preferidos de anticorpos de domínio único incluem VHH, VNAR, VH derivado de IgG e VL derivado de IgG.

[00138] Mais preferivelmente, o domínio funcional da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo é um VHH ou um scFv. Um exemplo mais preferido de um VHH é T3-VHH ou F4-VHH. Por exemplo, o anticorpo de domínio único preferivelmente compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos como estabelecido na SEQ ID NO: 16 ou 18 ou uma variante de sequência da mesma tendo

pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente 90%, particularmente preferivelmente 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência. Um exemplo mais preferido de um scFv é TT39.7-scFv ou MPE8-scFv. Por exemplo, o anticorpo de domínio único preferivelmente comprehende ou consiste em uma sequência de aminoácidos como estabelecido na SEQ ID NO: 17 ou 19 ou uma variante de sequência da mesma tendo pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente 90%, particularmente preferivelmente 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

[00139] Preferivelmente, o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo é um antígeno ou um fragmento funcional do mesmo, em particular um epítopo. Um antígeno é uma molécula, ou uma parte de uma molécula capaz de ser ligada por um anticorpo. Como o antígeno, ou fragmento funcional do mesmo, é compreendido pela cadeia de polipeptídeo, entende-se que no contexto da presente invenção, se o sítio de ligação é um antígeno ou um fragmento funcional do mesmo, o referido antígeno ou fragmento funcional do mesmo é um peptídeo ou polipeptídeo. Um antígeno comprehende tipicamente um ou mais epítopos. O epítopo é a parte do antígeno, que é ligada por um anticorpo ("reconhecido" por um anticorpo). Exemplos preferidos de antígenos incluem, mas não estão limitados a, proteínas séricas, por exemplo, citocinas tais como IL4, IL5, IL9 e IL13, peptídeos bioativos, moléculas da superfície celular, por exemplo, receptores, transportadores, canais iônicos, proteínas virais e bacterianas, RAGE (Receptor para Produtos Finais de Glicosilação Avançada), GPVI e colágeno.

[00140] Um fragmento funcional de um antígeno é tal fragmento do antígeno, que retém a capacidade de ligação do antígeno. Por conseguinte, o fragmento do antígeno é preferivelmente um epítopo ou compreende um ou mais epítopos. Outros fragmentos/domínios do antígeno podem ser preferivelmente, não compreendidos pelo sítio de ligação (independente). Por conseguinte, é mais preferido que o fragmento do antígeno, que é constituído pelo sítio de ligação (independente), seja um epítopo ou inclua mais de um epítopo (em particular sem outros domínios do antígeno).

[00141] Também é preferido que o sítio de ligação (independente) da primeira cadeia de polipeptídeo e/ou da segunda cadeia de polipeptídeo seja um marcador compreendendo um sítio de ligação. A maioria dos marcadores é capaz de ligar, por exemplo, marcadores de afinidade. Por conseguinte, esses marcadores, que têm a capacidade de se ligar a outra molécula, também podem ser referidos como sítios de ligação (independentes). Vários marcadores, incluindo marcadores compreendendo um sítio de ligação, são descritos acima e modalidades e exemplos preferidos se aplicam em conformidade.

[00142] Mais preferivelmente, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo e/ou da segunda cadeia de polipeptídeo é um domínio similar a Ig, um scFv, um VH ou um marcador de Strep. Em particular, o domínio funcional (adicional) da primeira cadeia de polipeptídeo e/ou da segunda cadeia de polipeptídeo preferivelmente compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 13 a 20, ou uma variante de sequência funcional da mesma possuindo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

[00143] De preferência, a primeira cadeia de polipeptídeo

compreende um único domínio variável (i) N-terminal do domínio funcional (adicional) (ii) e a segunda cadeia de polipeptídeo comprehende um único domínio variável (iv) N-terminal do domínio funcional (adicional) opcional (v) ou N-terminal dos um ou mais domínios constantes (vi), o único domínio variável (iv) da segunda cadeia de polipeptídeo formando um sítio de ligação ao antígeno com o domínio variável (i) da primeira cadeia de polipeptídeo. Exemplos preferidos de tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, de acordo com a presente invenção, são mostrados nas Figuras 1B e 1C (todos os formatos das Figuras 1B e 1C, exceto o anticorpo com base em DVD-Ig mostrado no painel mais baixo da Fig. 1C).

[00144] Alternativamente, a primeira cadeia de polipeptídeo pode compreender dois ou mais domínios variáveis (i) N-terminal do domínio funcional (adicional) (ii) e a segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender dois ou mais domínios variáveis (iv) N-terminal do domínio funcional (adicional) opcional (v) ou N-terminal dos um ou mais domínios constantes (vi), os dois ou mais domínios variáveis (iv) da segunda cadeia de polipeptídeo formando sítios de ligação ao antígeno com os dois ou mais domínios variáveis (i) da primeira cadeia de polipeptídeo. Por exemplo, o anticorpo de estrutura, em cuja região do cotovelo o domínio funcional (adicional) está inserido, pode ser um anticorpo biespecífico do formato DVD-Ig, por exemplo, como mostrado na Figura 1C, painel mais baixo “DVD-Ig”.

[00145] Também é preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo compreenda um anticorpo de cadeia única, como um scFv ou um anticorpo de domínio único, por exemplo, VHH, N-terminal do domínio variável mais N-terminal (i) e/ou C-terminal do domínio constante mais terminal-C (iii). Alternativamente ou adicionalmente, a segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender um anticorpo de cadeia única, tal como um scFv ou um anticorpo de domínio único, por exemplo, VHH,

N-terminal do domínio variável mais N-terminal (i) ou C-terminal do domínio constante mais C-terminal (vi). Exemplos preferidos são mostrados na Fig. 1C e incluem anticorpos scFv-(H)IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L)-scFv, V-(H)IgG, IgG(H)-V, V-(L)IgG e IgG(L)-V com um ou mais domínios funcionais (adicionais) inseridos no cotovelo da(s) cadeia(s) pesada(s) e/ou leve(s).

[00146] De preferência, a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo compreendem cada qual um domínio constante único, em particular um domínio CL e um domínio CH1, respectivamente. Exemplos preferidos são mostrados na Fig. 1C e incluem fragmentos de anticorpo F(ab)<sub>2</sub> e Fab com um ou mais domínios funcionais (adicionais) inseridos no cotovelo da cadeia pesada e/ou leve.

[00147] Alternativamente, é também preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreenda um único domínio constante, em particular um domínio CL; e a outra da primeira cadeia de polipeptídeo ou da segunda cadeia de polipeptídeo compreende um domínio CH1 e um ou mais domínios constantes adicionais, como um domínio CH2 e/ou CH3. Exemplos preferidos de tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, de acordo com a presente invenção, são mostrados nas Figuras 1B e 1C (todos os formatos da Figura 1B e 1C, exceto os fragmentos de anticorpo baseados em F(ab)<sub>2</sub> e Fab mostrados nos painéis superiores da Fig. 1C).

[00148] De preferência, o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreende uma porção Fc, em particular uma região Fc. Mais preferivelmente, a porção Fc é derivada de origem humana, por exemplo, de IgG1, IgG2, IgG3 e/ou IgG4 humana, pelo que a IgG1 humana é particularmente preferida.

[00149] Conforme usado neste documento, o termo "porção Fc" refere-se a uma sequência derivada da parte de uma cadeia pesada de imunoglobulina começando na região de articulação longa a montante do sítio de clivagem da papaína (por exemplo, resíduo 216 na IgG nativa, levando o primeiro resíduo da região constante da cadeia pesada a ser 114) e terminando no C-terminal da cadeia pesada de imunoglobulina. Por conseguinte, uma porção Fc pode ser uma porção Fc completa ou uma parte (por exemplo, um domínio) da mesma. Uma porção Fc completa compreende pelo menos um domínio de articulação, um domínio CH2 e um domínio CH3 (por exemplo, posições de aminoácidos da UE 216-446). Às vezes, um resíduo de lisina adicional (K) está presente no C-terminal da porção Fc, mas é frequentemente clivado de um anticorpo maduro. Cada uma das posições de aminoácidos dentro de uma porção Fc foi numerada de acordo com o sistema de numeração EU reconhecido pela técnica da Kabat, ver, por exemplo, por Kabat *et al.*, em "Sequências de proteínas de interesse imunológico", Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, 1983 e 1987.

[00150] De preferência, no contexto da presente invenção, uma porção Fc compreende pelo menos um de: um domínio de articulação (por exemplo, região de articulação superior, média e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3 ou uma parte variante, ou fragmento do mesmo. Em modalidades preferidas, uma porção Fc compreende pelo menos um domínio de articulação, um domínio CH2 ou um domínio CH3. Mais preferivelmente, a porção Fc é uma porção Fc completa. A porção Fc também pode compreender uma ou mais inserções, deleções ou substituições de aminoácidos em relação a uma porção Fc que ocorre naturalmente. Por exemplo, pelo menos um de um domínio de articulação, domínio CH2 ou domínio CH3 (ou parte do mesmo) pode ser excluído. Por exemplo, uma porção Fc pode compreender ou

consistir em: (i) domínio de articulação (ou parte do mesmo) fundido com um domínio CH2 (ou parte do mesmo), (ii) um domínio de articulação (ou parte do mesmo) fundido com um domínio CH3 (ou parte do mesmo), (iii) um domínio CH2 (ou parte do mesmo) fundido com um domínio CH3 (ou parte do mesmo), (iv) um domínio articulado (ou parte do mesmo), (v) um domínio CH2 (ou parte do mesmo) ou (vi) um domínio CH3 ou uma porção do mesmo.

[00151] Será entendido por alguém versado na técnica que a porção Fc pode ser modificada de modo que varie na sequência de aminoácidos da porção Fc completa de uma molécula de imunoglobulina que ocorre naturalmente, mantendo ao menos uma função desejável conferida pela porção Fc recorrente. Tais funções incluem ligação ao receptor Fc (FcR), modulação da meia-vida do anticorpo, função ADCC, ligação à proteína A, ligação à proteína G e ligação ao complemento. As partes de porções Fc de ocorrência natural, que são responsáveis e/ou essenciais para tais funções são bem conhecidas por aqueles versados na técnica.

[00152] Por exemplo, para ativar a cascata C1q do complemento, se liga a pelo menos duas moléculas de IgG1 ou uma molécula de IgM, ligadas ao alvo antigênico (Ward, ES e Ghetie, V., Ther. Immunol. 2 (1995) 77-94). Burton, D. R., descreveu (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206) que a região da cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos 318 a 337 está envolvida na fixação do complemento. Duncan, A.R. e Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), utilizando mutagênese direcionada ao sítio, relataram que Glu318, Lys320 e Lys322 formam o sítio de ligação a C1q. O papel dos resíduos de Glu318, Lys320 e Lys 322 na ligação de C1q foi confirmado pela capacidade de um peptídeo sintético curto contendo esses resíduos para inibir a lise mediada por complemento.

[00153] Por exemplo, a ligação ao FcR pode ser mediada pela

interação da porção Fc (de um anticorpo) com os receptores Fc (FcRs), que são receptores especializados da superfície celular em células hematopoiéticas. Os receptores Fc pertencem à superfamília da imunoglobulina e demonstraram mediar tanto a remoção de patógenos revestidos por anticorpos por fagocitose de complexos imunes, quanto a lise de eritrócitos e vários outros alvos celulares (por exemplo, células tumorais) revestidos com o anticorpo correspondente, por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC; Van de Winkel, JG e Anderson, CL, *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). FcRs são definidos por sua especificidade para classes de imunoglobulina; receptores Fc para anticorpos IgG são referidos como Fc $\gamma$ R, para IgE como Fc $\epsilon$ R, para IgA como Fc $\alpha$ R e assim por diante e os receptores Fc neonatais são referidos como FcRn. A ligação ao receptor Fc é descrita, por exemplo, em Ravetch, J. V. e Kinet, J. P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J. et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M. et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; e Gessner, J.E. et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

[00154] A reticulação de receptores pelo domínio Fc dos anticorpos IgG nativos (Fc $\gamma$ R) desencadeia uma ampla variedade de funções efetoras, incluindo fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e liberação de mediadores inflamatórios, além de depuração do complexo imune e regulação da produção de anticorpos. Portanto, as porções Fc que fornecem reticulação de receptores (Fc $\gamma$ R) são preferidas. Em humanos, foram caracterizadas três classes de Fc $\gamma$ R, que são: (i) Fc $\gamma$ RI (CD64), que liga IgG monomérica com alta afinidade e é expressa em macrófagos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos; (ii) Fc $\gamma$ RII (CD32), que liga IgG complexa com afinidade média a baixa, é amplamente expresso, principalmente em leucócitos, é conhecido por ser um fator central na imunidade mediada por anticorpos e que pode

ser dividido em Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB e Fc $\gamma$ RIIC, que desempenham funções diferentes no sistema imunológico, porém se ligam com baixa afinidade semelhante à IgG-Fc, e os ectodomínios desses receptores são altamente homólogos; e (iii) Fc $\gamma$ RIII (CD16), que liga a IgG com afinidade média a baixa e existe em dois tipos: Fc $\gamma$ RIIA encontrada em células NK, macrófagos, eosinófilos e alguns monócitos e células T e mediando ADCC e Fc $\gamma$ RIIB, que é altamente expresso em neutrófilos. O Fc $\gamma$ RIIA é encontrado em muitas células envolvidas na morte celular (por exemplo, macrófagos, monócitos, neutrófilos) e parece capaz de ativar o processo de morte. O Fc $\gamma$ RIIB parece desempenhar um papel nos processos inibitórios e é encontrado em células B, macrófagos e mastócitos e eosinófilos.

[00155] Em relação à ligação a Fc $\gamma$ RI, a modificação na IgG nativa de pelo menos um de E233-G236, P238, D265, N297, A327 e P329 reduz a ligação a Fc $\gamma$ RI. Os resíduos de IgG2 nas posições 233-236, substituídos em IgG1 e IgG4, reduzem a ligação a Fc $\gamma$ RI em 10<sup>3</sup> vezes e eliminam a resposta do monócito humano aos glóbulos vermelhos sensibilizados por anticorpos (Armour, KL, et al. Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624). Em relação à ligação a Fc $\gamma$ RII, é encontrada uma ligação reduzida para Fc $\gamma$ RIIA, por exemplo, para mutação IgG de pelo menos um de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 e K414. Em relação à ligação a Fc $\gamma$ RIII, é encontrada uma ligação reduzida a Fc $\gamma$ RIIA, por exemplo, para mutação de pelo menos um de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 e D376. O mapeamento dos sítios de ligação na IgG1 humana para receptores Fc, os sítios de mutação e métodos acima mencionados para medir a ligação a Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIIA são descritos em Shields, R. L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

[00156] No que se refere à ligação ao Fc $\gamma$ RII crucial, duas regiões de

IgG Fc nativa parecem ser críticas para interações de FcγRIIs e IgGs, a saber (i) o sítio de articulação inferior de IgG Fc, em particular os resíduos de aminoácidos L, L, G, G (234 - 237, numeração EU) e (ii) a região adjacente do domínio CH2 de IgG Fc, em particular uma alça e fitas no domínio CH<sub>2</sub> superior adjacente à região da articulação inferior, por exemplo, em uma região de P331 (Wines, B.D., et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313 - 5318). Além disso, o FcγRI parece se ligar ao mesmo sítio no IgG Fc, enquanto o FcRn e a proteína A se ligam a um sítio diferente no IgG Fc, que parece estar na interface CH<sub>2</sub>-CH3 (Wines, BD, et al., *J. Immunol* 2000; 164: 5313 - 5318).

[00157] Por exemplo, a porção Fc pode compreender ou consistir em pelo menos a parte de uma porção Fc que é conhecida na técnica como necessária para a ligação a FcRn ou meia-vida prolongada. Alternativamente ou adicionalmente, a porção Fc do anticorpo da invenção compreende pelo menos a parte conhecida na técnica a ser necessária para a ligação à proteína A e/ou a porção Fc do anticorpo da invenção compreende pelo menos a parte de uma molécula Fc conhecida na técnica como requerida para a ligação à proteína G. Por conseguinte, uma porção Fc preferida compreende pelo menos a parte conhecida na técnica como necessária para a ligação a FcγR. Como descrito acima, uma porção Fc preferida pode, portanto, pelo menos compreender (i) o sítio de articulação inferior da IgG Fc nativa, em particular os resíduos de aminoácidos L, L, G, G (234 - 237, numeração EU) e (ii) a região adjacente do domínio CH2 da IgG Fc nativa, em particular uma alça e fita no domínio CH2 superior adjacente à região de articulação inferior, por exemplo, em uma região de P331, por exemplo, uma região de pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos consecutivos no domínio CH2 superior da IgG Fc nativa em torno de P331, por exemplo, entre os aminoácidos 320 e 340 (numeração EU) do IgG Fc nativo.

[00158] Preferivelmente, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreende uma região Fc. Como utilizado neste documento, o termo "região Fc" refere-se à parte de uma imunoglobulina formada por duas ou mais porções Fc de cadeias pesadas de anticorpos. Por exemplo, a região Fc pode ser uma região Fc monomérica ou de "cadeia única" (isto é, uma região scFc). As regiões Fc de cadeia única são constituídas por porções Fc ligadas dentro de uma única cadeia de polipeptídeo (por exemplo, codificadas em uma única sequência de ácido nucleico contígua). Regiões scFc exemplares são divulgadas no documento WO 2008/143954 A2. De preferência, a região Fc é uma região Fc dimérica. Uma "região Fc dimérica" ou "dcFc" refere-se ao dímero formado pelas porções Fc de duas cadeias pesadas de imunoglobulina separadas. A região Fc dimérica pode ser um homodímero de duas porções Fc idênticas (por exemplo, uma região Fc de uma imunoglobulina que ocorre naturalmente) ou um heterodímero de duas porções Fc não idênticas.

[00159] As porções Fc da região Fc podem ser da mesma classe ou classe e/ou subclasse diferentes. Por exemplo, as porções Fc podem ser derivadas de uma imunoglobulina (por exemplo, uma imunoglobulina humana) de uma subclasse IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. De preferência, as porções Fc da região Fc são da mesma classe e subclasse. No entanto, a região Fc (ou uma ou mais porções Fc de uma região Fc) também pode ser quimérica, pelo que uma região Fc quimérica pode compreender porções Fc derivadas de diferentes classes e/ou subclasses de imunoglobulinas. Por exemplo, pelo menos duas das porções Fc de uma região Fc dimérica ou de cadeia única podem ser de diferentes classes de imunoglobulinas e/ou subclasses. Adicional ou alternativamente, as regiões Fc quiméricas podem compreender uma ou mais porções Fc quiméricas. Por exemplo, a

região ou porção Fc quimérica pode compreender uma ou mais partes derivadas de uma imunoglobulina de uma primeira subclasse (por exemplo, uma subclasse IgG1, IgG2 ou IgG3) enquanto o restante da região ou porção Fc é de uma subclasse diferente. Por exemplo, uma região ou porção Fc de um polipeptídeo Fc pode compreender um domínio CH2 e/ou CH3 derivado de uma imunoglobulina de uma primeira subclasse (por exemplo, uma subclasse IgG1, IgG2 ou IgG4) e uma região articulada de uma imunoglobulina de uma segunda subclasse (por exemplo, uma subclasse IgG3). Por exemplo, a região ou porção Fc pode compreender um domínio articulado e/ou CH2 derivado de uma imunoglobulina de uma primeira subclasse (por exemplo, uma subclasse IgG4) e um domínio CH3 de uma imunoglobulina de uma segunda subclasse (por exemplo, uma IgG1, IgG2 ou subclasse IgG3). Por exemplo, a região Fc quimérica pode compreender uma porção Fc (por exemplo, uma porção Fc completa) de uma imunoglobulina para uma primeira subclasse (por exemplo, uma subclasse IgG4) e uma porção Fc de uma imunoglobulina de uma segunda subclasse (por exemplo, uma IgG1, subclasse IgG2 ou IgG3). Por exemplo, a região ou porção Fc pode compreender um domínio CH2 de uma imunoglobulina IgG4 e um domínio CH3 de uma imunoglobulina IgG1. Por exemplo, a região ou porção Fc pode compreender um domínio CH1 e um domínio CH2 de uma molécula de IgG4 e um domínio CH3 de uma molécula de IgG1. Por exemplo, a região ou porção Fc pode compreender uma parte de um domínio CH2 de uma subclasse específica de anticorpo, por exemplo, posições EU 292-340 de um domínio CH2. Por exemplo, uma região ou porção Fc pode compreender os aminoácidos nas posições 292-340 de CH2 derivadas de uma porção IgG4 e o restante CH2 derivado de uma porção IgG1 (alternativamente, 292-340 de CH2 pode ser derivado de uma porção IgG1 e o restante de CH2 derivado de uma porção de IgG4).

[00160] Além disso, uma região ou porção Fc pode (adicional ou alternativamente), por exemplo, compreender uma articulação quimérica. Por exemplo, a articulação quimérica pode ser derivada, por exemplo, em parte, de uma molécula de IgG1, IgG2 ou IgG4 (por exemplo, uma sequência de articulação média superior e inferior) e, em parte, de uma molécula de IgG3 (por exemplo, uma sequência de articulação média). Em outro exemplo, uma região ou porção Fc pode compreender uma articulação quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4. Em outro exemplo, a articulação quimérica pode compreender domínios de articulação superior e inferior de uma molécula de IgG4 e um domínio de articulação médio de uma molécula de IgG1. Tal articulação quimérica pode ser feita, por exemplo, através da introdução de uma substituição de prolina (Ser228Pro) na posição UE 228 no domínio da articulação média de uma região de articulação IgG4. Em outra modalidade, a articulação quimérica pode compreender aminoácidos nas posições EU 233-236 são de um anticorpo IgG2 e/ou da mutação Ser228Pro, em que os aminoácidos restantes da articulação são de um anticorpo IgG4. Articulações químéricas, que podem ser utilizadas na porção Fc do anticorpo de acordo com a presente invenção, são descritas no documento US 2005/0163783 A1.

[00161] Na presente invenção, é preferido que a porção Fc, ou a região Fc, compreenda ou consista em uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência de imunoglobulina humana (por exemplo, de uma região Fc ou porção Fc de uma molécula de IgG humana). No entanto, os polipeptídeos podem compreender um ou mais aminoácidos de outras espécies de mamíferos. Por exemplo, uma porção Fc de primata ou um sítio de ligação de primata pode ser incluído nos polipeptídeos em questão. Alternativamente, um ou mais aminoácidos murinos podem estar presentes na porção Fc ou na região Fc.

[00162] Preferivelmente, o anticorpo de acordo com a presente invenção compreende, em particular além de uma porção Fc como descrito acima, outras partes derivadas de uma região constante, em particular de uma região constante de IgG, preferivelmente de uma região constante de IgG1, mais preferivelmente de uma região constante de IgG1 humana. Mais preferivelmente, o anticorpo de acordo com a presente invenção compreende, em particular, além de uma porção Fc como descrito acima, todas as outras partes das regiões constantes, em particular todas as outras partes das regiões constantes de IgG, preferivelmente todas as outras partes das regiões constantes de IgG1, mais preferivelmente todas as outras partes das regiões constantes de IgG1 humana.

[00163] Sequências particularmente preferidas de regiões constantes são as sequências de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NOs: 3, 4 ou 7. De preferência, a região constante da cadeia pesada compreende ou consiste em IgG1 CH1-CH2-CH3, em particular compreendendo ou consistindo na sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 3 ou uma sua variante de sequência funcional, como aqui descrito. De preferência, a região constante da cadeia leve compreende ou consiste em IgG1 CL, em particular compreendendo ou consistindo na sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 4 ou uma variante de sequência funcional do mesmo, como descrito neste documento.

[00164] Também é preferido que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não compreenda uma região Fc ou uma porção Fc. Em particular, os domínios constantes requeridos para o cotovelo (CH1 e CL) não estão tipicamente envolvidos na porção Fc ou na região Fc. Portanto, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, preferivelmente não compreende uma região

Fc ou uma porção Fc. Exemplos de tais anticorpos (ou fragmentos de anticorpos) incluem aqueles baseados em Fab ou F(ab)<sub>2</sub> (IEI-Fab ou IEI-F(ab)<sub>2</sub>).

[00165] De preferência, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreende um ou mais ligantes. Por exemplo, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ligantes. Mais preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreende um ligante ou dois ligantes. Também é preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreenda três ou quatro ligantes. Em geral, um ligante pode fornecer mais flexibilidade à cadeia de polipeptídeo. Preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um ligante entre a região constante e o domínio funcional (adicional). Alternativamente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem não compreender um ligante entre a região constante e o domínio funcional (adicional). Se o segundo polipeptídeo não compreender um domínio funcional (adicional), a segunda cadeia de polipeptídeo pode compreender um ligante entre a região constante e a região variável. Alternativamente, a segunda cadeia de polipeptídeo pode não compreender um ligante entre a região constante e a região variável. Preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um ligante entre o domínio funcional (adicional) e o domínio variável, em particular o domínio

variável mais C-terminal. Alternativamente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem não compreender um ligante entre o domínio funcional (adicional) e o domínio variável, em particular o domínio variável mais C-terminal. Se a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende mais de um domínio variável, também é preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreenda um ou mais ligantes entre os domínios variáveis. Alternativamente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem não compreender um ou mais ligantes entre os domínios variáveis. Mais preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um ligante entre a região constante e o domínio funcional (adicional) e um ligante entre o domínio funcional (adicional) e o domínio variável, em particular o domínio variável mais C-terminal. Alternativamente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem não compreender um ligante entre a região constante e o domínio funcional (adicional) nem um ligante entre o domínio funcional (adicional) e o domínio variável, em particular o domínio variável mais C-terminal. Além disso, a primeira cadeia de polipeptídeo pode compreender um ligante entre a região constante e o domínio funcional (adicional) e um ligante entre o domínio funcional (adicional) e o domínio variável, em particular o domínio variável mais C-terminal, enquanto a segunda cadeia de polipeptídeo pode não compreender um domínio funcional (adicional) nem um ligante entre a região constante e a região variável. Também é preferido - se a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreender mais de um domínio variável - que a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreenda um ligante entre a região constante e o domínio funcional (adicional); um ligante entre o domínio funcional

(adicional) e o domínio variável, em particular o domínio variável mais C-terminal; e um ou mais ligantes entre os domínios variáveis.

[00166] Se a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreenderem mais de um ligante, os ligantes podem ser iguais ou diferentes.

[00167] De preferência, um ligante consiste em até 20 aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos, mais preferivelmente de até 15 aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos, ainda mais preferivelmente até 10 aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos e ainda mais preferivelmente até 5 aminoácidos, como 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos. O ligante pode ser derivado de sequências de aminoácidos que ocorrem naturalmente, como regiões flanqueadoras ou de sequências de aminoácidos não naturais. De preferência, o domínio funcional (adicional) corresponde a um único éxon ou a mais de um éxon e a sequência de aminoácidos do ligante é recuperada das sequências intrônicas que flanqueiam esse único éxon ou a mais de um éxon. Por exemplo, (i) o ligante entre uma região variável e um domínio funcional (adicional) (que é codificado por um éxon ou por uma variante de sequência) pode ser codificado pela sequência intrônica de flanqueamento imediatamente antes (na direção 5'-3') o éxon ou sua variante de sequência a ser usada como "domínio funcional (adicional)" e/ou (ii) o ligante entre um domínio funcional (adicional) (que é codificado por um éxon ou uma variante de sequência) e uma região constante pode ser codificado pela sequência intrônica de flanqueamento imediatamente após (na direção 5'-3') o éxon ou sua variante de sequência a ser usada como "domínio funcional (adicional)". Preferivelmente, o ligante não contém quaisquer resíduos de Cys (C). De preferência, o ligante comprehende ou consiste em um ou mais resíduos de Glicina (Gly) e/ou um ou mais resíduos de Serina (Ser)

("ligante GS"). Exemplos preferidos de ligantes GS incluem as sequências de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NOs 43 - 48, mais preferivelmente o ligante está de acordo com a SEQ ID NO: 45. Exemplos preferidos de ligantes de sequência intrônica incluem as sequências de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NOs 49 - 52. Mais preferivelmente, o ligante compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 43 - 52.

[00168] Por exemplo, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender (na direção N a C-terminal) um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 49, ou uma variante de sequência funcional do mesmo, diretamente seguida por um domínio funcional (adicional), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 14, ou uma variante de sequência funcional do mesmo. Além disso, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender (na direção N a C-terminal) um domínio funcional (adicional) conforme estabelecido na SEQ ID NO: 14, ou uma variante de sequência funcional do mesmo, diretamente seguido por um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 50, ou uma variante de sequência funcional do mesmo. Mais preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender (na direção N a C-terminal) (um domínio variável, diretamente seguido por) um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 49, ou um variante de sequência funcional do mesmo, seguida diretamente por um domínio funcional (adicional) conforme estabelecido na SEQ ID NO: 14, ou uma variante de sequência funcional do mesmo, seguida diretamente por um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 50 ou uma variante de sequência funcional do mesmo (seguida diretamente por um domínio constante).

[00169] Por exemplo, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a

segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender (na direção N a C-terminal) um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 51, ou uma variante de sequência funcional do mesmo, diretamente seguida por um domínio funcional (adicional), como estabelecido na SEQ ID NO: 15, ou uma sua variante de sequência funcional. Além disso, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender (na direção N a C-terminal) um domínio funcional (adicional) conforme estabelecido na SEQ ID NO: 15, ou uma variante de sequência funcional do mesmo, diretamente seguido por um ligante, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 52, ou uma variante de sequência funcional do mesmo. Mais preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo podem compreender (na direção N a C-terminal) (um domínio variável, diretamente seguido por) um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 51 ou uma variante de sequência funcional do mesmo, seguida diretamente por um domínio funcional (adicional) conforme estabelecido na SEQ ID NO: 15, ou uma variante de sequência funcional do mesmo, seguida diretamente por um ligante conforme estabelecido na SEQ ID NO: 52 ou uma variante de sequência funcional do mesmo (seguida diretamente por um domínio constante).

[00170] Alternativamente, é também preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo e/ou o segundo polipeptídeo não compreendam quaisquer ligantes.

[00171] De preferência, a primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em (na direção N a C-terminal): V-D-CH1, em que

V é um domínio variável (i);

D é um domínio funcional (adicional) (ii); e

CH1 é um domínio constante CH1 (iii).

V e D e/ou D e CH1 podem ser ligados através de um ligante como descrito acima ou podem ser diretamente ligados um ao outro.

[00172] Mais preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em (na direção N a C-terminal): V-D-CH1-CH2-CH3, em que

V-D-CH1 é como descrito acima; e

CH2 e CH3 são um domínio constante CH2 e um domínio constante CH3, respectivamente.

[00173] Também é preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreenda ou consista em (na direção N a C-terminal): (V) A-D-CH1, em que

V-D-CH1 é como descrito acima;

A é um número inteiro de 1 a 5, preferivelmente de 1 a 4, mais preferivelmente de 1 a 3 e ainda mais preferivelmente de 1 a 2; e os domínios variáveis V podem ser acoplados entre si diretamente ou através de um ligante.

[00174] Preferivelmente, a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em (na direção N a C-terminal): V-CL, em que

V é um domínio variável (iv); e

CL é um domínio constante (vi).

V e CL podem ser ligados por meio de um ligante como descrito acima ou podem ser diretamente ligados um ao outro.

[00175] Também é preferido que a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreenda ou consista em (na direção N a C-terminal): (V)A-CL, em que

V-CL é como descrito acima;

[00176] Sendo um número inteiro de 1 a 5, preferivelmente de 1 a 4, mais preferivelmente de 1 a 3 e ainda mais preferivelmente de 1 a 2; e os domínios variáveis V podem ser acoplados entre si diretamente ou através de um ligante.

[00177] Por exemplo, o domínio variável (i) da primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 1, 5 , 8 ou 10, ou uma variante de sequência funcional da mesma possuindo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

[00178] Por exemplo, o domínio variável (iv) da segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 2, 6, 9 ou 11, ou uma variante de sequência funcional do mesmo tendo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

[00179] Preferivelmente, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreende uma única ou duas primeiras cadeias de polipeptídeos e uma única ou duas segundas cadeias de polipeptídeos. Exemplos de tais anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno são mostrados nas Fig. 1B e 1C. Também é preferido que a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo estejam ligadas por uma ligação

dissulfeto, formando assim um par. Em particular, a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, podem ser ligados por uma ligação dissulfeto, formando assim um par. Além disso, também é preferido que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreenda duas primeiras cadeias de polipeptídeos e duas segundas cadeias de polipeptídeos e que as duas primeiras cadeias de polipeptídeos e/ou as duas segundas cadeias de polipeptídeos estejam ligadas por uma ou mais, tal como duas, ligações dissulfeto. Em particular, as duas cadeias pesadas do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, podem ser ligadas por uma ou mais, tal como duas, ligações dissulfeto.

[00180] Preferivelmente, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, é bivalente para cada especificidade/antígeno. Em particular, é preferível que o(s) domínio(s) funcional(ais) compreenda(m) ou consista(m) em um(uns) sítio(s) de ligação (independente) e (1) o(s) sítio(s) de ligação(ões) e (2) os sítios de ligação ao antígeno formado pelos um ou mais domínios variáveis do primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos correspondem a (1) sítios (independentes) de ligação e (2) a ligação ao antígeno sítio(s) formado(s) pelos um ou mais domínios variáveis do segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos. Alternativamente, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, pode ser monovalente para cada especificidade (antígeno).

[00181] Por conseguinte, é preferido que os sítios de ligação ao antígeno formados pelos um ou mais domínios variáveis do primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos e os sítios de ligação ao antígeno formados pelos um ou mais domínios variáveis do segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos são iguais ou

distintas.

[00182] Além disso, é preferido que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreenda pelo menos dois domínios funcionais (adicionais), que podem ser iguais ou distintos. Por exemplo, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, pode compreender 2 ou 4 domínios funcionais (adicionais), que podem ser iguais ou distintos.

[00183] Se o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção compreender mais de um domínio funcional (adicional), por exemplo, na mesma ou em cadeias de polipeptídeos distintas, os domínios funcionais (adicionais) podem ser iguais ou distintos. Preferivelmente, eles podem pertencer ao mesmo grupo ou distinto de domínios funcionais. Por exemplo, pelo menos dois ou todos os domínios funcionais (adicionais) podem compreender ou consistir em sítios de ligação (independentes). Por exemplo, pelo menos dois ou todos os domínios funcionais (adicionais) podem compreender ou consistir em domínios de veículos. Por exemplo, pelo menos dois ou todos os domínios funcionais (adicionais) podem compreender ou consistir em domínios-repórteres. Por exemplo, pelo menos dois ou todos os domínios funcionais (adicionais) podem compreender ou consistir em marcadores. Por exemplo, pelo menos dois ou todos os domínios funcionais (adicionais) podem compreender ou consistir em domínios de localização. Mesmo que os domínios funcionais (adicionais) pertençam ao mesmo grupo de domínios funcionais, o subgrupo e, em particular, sua sequência de aminoácidos, ainda pode ser o mesmo ou distinto. Por exemplo, pelo menos dois ou todos os domínios funcionais (adicionais) podem compreender ou consistir nas mesmas sequências de aminoácidos. Alternativamente, também é preferido que os domínios funcionais (adicionais) pertençam a um grupo

distinto de domínios funcionais. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um sítio de ligação (independente), enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um domínio veículo. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um sítio de ligação (independente), enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um domínio-repórter. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um sítio de ligação (independente), enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um marcador. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um sítio de ligação (independente), enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um domínio de localização. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um domínio veículo, enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um domínio-repórter. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um domínio veículo, enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um marcador. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um domínio veículo, enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um domínio de localização. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um domínio- repórter, enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou

fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um marcador. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um domínio-repórter, enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um domínio de localização. Por exemplo, um domínio funcional (adicional) pode compreender ou consistir em um domínio de localização, enquanto outro domínio funcional (adicional) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode compreender ou consistir em um marcador.

[00184] Além disso, é preferido que o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreenda duas primeiras cadeias de polipeptídeos e duas segundas cadeias de polipeptídeos, formando um primeiro e um segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos e em que o primeiro par das primeira e segunda cadeias de polipeptídeos compreende pelo menos um domínio funcional e/ou o segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos compreende pelo menos um domínio funcional. Por exemplo, o primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos pode compreender pelo menos um domínio funcional, enquanto o segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeo pode não compreender um domínio funcional (adicional). Por exemplo, o primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeo pode não compreender um domínio funcional (adicional), enquanto o segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeo pode compreender pelo menos um(uns) domínio(s) funcional(ais). Mais preferivelmente, ambos, o primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos compreendem pelo menos um domínio(s) funcional(ais) e o segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeo compreende pelo menos um domínio funcional (adicional).

[00185] Preferivelmente, o anticorpo ou o fragmento de ligação a

antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, é derivado de um anticorpo semelhante a IgG, um Fab ou um F(ab)<sub>2</sub>. Por outras palavras, o anticorpo, ou o seu fragmento de ligação a antígeno, compreende todas as regiões variáveis e constantes de um anticorpo semelhante a IgG, um Fab ou um F(ab)<sub>2</sub>. Em particular, um anticorpo semelhante a IgG, um Fab ou um F(ab)<sub>2</sub> pode ser usado como anticorpos de “estrutura”, em cuja região do cotovelo um domínio funcional (adicional) é inserido.

[00186] De preferência, os dois ou mais domínios variáveis (i) e (iv) do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, são derivados de um anticorpo monoclonal. Em particular, os dois ou mais domínios variáveis (i) e (iv) do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, são (correspondem a) os dois ou mais domínios variáveis de um anticorpo monoclonal.

[00187] Também é preferido que os domínios variáveis e/ou os domínios constantes do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, sejam humanos ou humanizados. Em particular, os domínios variáveis e/ou os domínios constantes do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, correspondem aos domínios variáveis e/ou os domínios constantes do anticorpo humano ou humanizado, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[00188] De preferência, o(s) domínio(s) funcional(is) do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende(m) ou consiste(m) de uma sequência de aminoácidos, que é humana ou humanizada.

[00189] Preferivelmente, a primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção compreende ou consiste em uma sequência

de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 69 ou 70, ou uma variante de sequência funcional com pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência, e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 54, 57, 63 ou 67, ou uma variante de sequência funcional da mesma tendo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de sequência identidade.

[00190] De preferência, a primeira e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 75 a 92. Também é preferido que a primeira e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não compreenda ou consista em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 96 a 112. Mais preferivelmente, a primeira e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não podem compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 75 - 95. Ainda mais preferivelmente, o domínio funcional (adicional) compreendido pela primeira e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou o fragmento de ligação

a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 113 a 130. Ainda mais preferivelmente, o domínio funcional (adicional) compreendido pela primeira e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 113 a 133. Mais preferivelmente, a primeira e/ou a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, não pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 75 - 133. Opcionalmente, o domínio funcional (adicional) compreendido pela primeira e/ou pela segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, pode não compreender ou consistir em um fragmento LAIR1 (mutado).

### **Molécula de ácido nucleico**

[00191] Em outro aspecto, a presente invenção também fornece uma molécula de ácido nucleico compreendendo um primeiro polinucleotídeo que codifica a primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção e/ou um segundo polipeptídeo codificando a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção.

[00192] Uma molécula de ácido nucleico é uma molécula que compreende, preferivelmente, consistir em componentes de ácido nucleico. O termo molécula de ácido nucleico refere-se preferivelmente a uma molécula de DNA ou RNA. Em particular, é usado sinônimo do termo "polinucleotídeo". De preferência, uma molécula de ácido nucleico

é um polímero que compreende ou consiste em monômeros de nucleotídeos que são covalentemente ligados entre si por ligações de fosfodiéster de uma cadeia principal de açúcar/fosfato. O termo "molécula de ácido nucleico" também abrange moléculas de ácido nucleico modificadas, como moléculas de DNA ou RNA modificadas com base, modificadas com açúcar ou com estrutura principal, etc.

[00193] De preferência, a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA. Exemplos de moléculas de ácido nucleico e/ou polinucleotídeos incluem, por exemplo, um polinucleotídeo recombinante, um vetor, um oligonucleotídeo, uma molécula de RNA como um rRNA, um mRNA, um miRNA, um siRNA ou um tRNA ou uma molécula de DNA tal como um cDNA. As sequências de ácido nucleico que codificam parte ou todas da primeira e/ou segunda cadeias de polipeptídeos são preferidas. Preferivelmente, são fornecidas neste documento sequências de ácidos nucleicos que codificam parte ou todas as cadeias leves e pesadas, em particular sequências VH e VL e/ou domínios funcionais (adicionais) dos exemplos de anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno da invenção.

[00194] Prefere-se também que a molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção inclua uma sequência de ácido nucleico possuindo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 88%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o ácido nucleico que codifica um domínio funcional (adicional), uma sequência VH e/ou uma sequência VL usada em um anticorpo (exemplar) ou seu fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção.

[00195] Em geral, a molécula de ácido nucleico pode ser manipulada para inserir, excluir ou alterar certas sequências de ácidos nucleicos. As alterações dessa manipulação incluem, entre outras, alterações para

introduzir sítios de restrição, alterar o uso de códons, adicionar ou otimizar sequências reguladoras de transcrição e/ou tradução, etc. É também possível alterar o ácido nucleico para alterar os aminoácidos codificados. Por exemplo, pode ser útil introduzir uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos na sequência de aminoácidos dos anticorpos. Tais mutações pontuais podem modificar funções efetoras, afinidade de ligação ao antígeno, modificações pós-translacionais, imunogenicidade, etc., podem introduzir aminoácidos para a ligação de grupos covalentes (por exemplo, marcadores (labels)) ou podem introduzir marcadores (tags) (por exemplo, para fins de purificação). As mutações podem ser introduzidas em sítios específicos ou podem ser introduzidas aleatoriamente, seguidas de seleção (por exemplo, evolução molecular). Por exemplo, um ou mais ácidos nucleicos que codificam qualquer um dos domínios funcionais (adicionais), uma sequência VH e/ou uma sequência VL de um anticorpo (exemplar) da invenção podem ser mutados aleatoriamente ou diretamente para introduzir diferentes propriedades nos aminoácidos codificados. Tais alterações podem ser o resultado de um processo iterativo em que as alterações iniciais são retidas e novas alterações em outras posições de nucleotídeos são introduzidas. Além disso, as alterações alcançadas em etapas independentes podem ser combinadas. Diferentes propriedades introduzidas nos aminoácidos codificados podem incluir, mas não estão limitadas a, afinidade aprimorada.

### **Vetor**

[00196] Ainda incluídos no escopo da invenção são vetores, por exemplo, vetores de expressão, compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Preferivelmente, um vetor compreende uma molécula de ácido nucleico como descrito acima.

[00197] O termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico, de preferência a uma molécula de ácido nucleico recombinante, isto é, uma molécula de ácido nucleico que não ocorre na natureza. Um vetor no contexto da presente invenção é adequado para incorporar ou abrigar uma sequência de ácido nucleico desejada. Tais vetores podem ser vetores de armazenamento, vetores de expressão, vetores de clonagem, vetores de transferência etc. Um vetor de armazenamento é um vetor que permite o armazenamento conveniente de uma molécula de ácido nucleico. Assim, o vetor pode compreender uma sequência correspondente, por exemplo, a um anticorpo ou fragmento de anticorpo desejado de acordo com a presente invenção. Um vetor de expressão pode ser usado para a produção de produtos de expressão, como RNA, por exemplo, mRNA, ou peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Por exemplo, um vetor de expressão pode compreender sequências necessárias para a transcrição de um trecho de sequência do vetor, como uma sequência promotora. Um vetor de clonagem é tipicamente um vetor que contém um sítio de clonagem, que pode ser usado para incorporar sequências de ácidos nucleicos no vetor. Um vetor de clonagem pode ser, por exemplo, um vetor plasmídeo ou um vetor bacteriófago. Um vetor de transferência pode ser um vetor que é adequado para transferir moléculas de ácido nucleico para células ou organismos, por exemplo, vetores virais. Um vetor no contexto da presente invenção pode ser, por exemplo, um vetor de RNA ou um vetor de DNA. Preferivelmente, um vetor é uma molécula de DNA. Por exemplo, um vetor no sentido do presente pedido compreende um sítio de clonagem, uma marca de seleção, tal como um fator de resistência a antibióticos e uma sequência adequada para multiplicação do vetor, como uma origem de replicação. De preferência, um vetor no contexto do presente pedido é um vetor plasmídico.

## **Células**

[00198] Em um aspecto adicional, a presente invenção também fornece células que expressam o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção e/ou compreendendo a molécula de ácido nucleico ou o vetor de acordo com a presente invenção.

[00199] Exemplos de tais células incluem, mas não estão limitados a, células eucarióticas, por exemplo, células de levedura, células animais ou células vegetais. Preferivelmente, as células são células de mamífero, mais preferivelmente uma linhagem celular de mamífero. Exemplos preferidos incluem células humanas, células CHO, células HEK293T, células PER.C6, células NS0, células hepáticas humanas, células de mieloma ou células de hibridoma.

[00200] Em particular, a célula pode ser transfectada com um vetor de acordo com a presente invenção, preferivelmente com um vetor de expressão. O termo "transfecção" refere-se à introdução de moléculas de ácido nucleico, como moléculas de DNA ou RNA (por exemplo, mRNA), nas células, preferivelmente nas células eucarióticas. No contexto da presente invenção, o termo "transfecção" abrange qualquer método conhecido por alguém versado na introdução de moléculas de ácido nucleico nas células, preferivelmente nas células eucarióticas, como nas células de mamíferos. Tais métodos abrangem, por exemplo, eletroporação, lipofecção, por exemplo, com base em lipídios catiônicos e/ou lipossomos, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção baseada em nanopartículas, transfecção baseada em vírus ou transfecção baseada em polímeros catiônicos, como DEAE-dextrano ou polietilenimina e etc. Preferivelmente, a introdução não é viral.

[00201] Além disso, as células da presente invenção podem ser transfectadas de forma estável ou transitória com o vetor de acordo com a presente invenção, por exemplo, para expressar o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente

invenção. De preferência, as células são transfectadas de forma estável com o vetor de acordo com a presente invenção que codifica o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção. Alternativamente, é também preferido que as células sejam transfectadas transitoriamente com o vetor de acordo com a presente invenção que codifica o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção.

### **Composição**

[00202] A presente invenção também fornece uma composição compreendendo um ou mais de:

- (i) o anticorpo, ou o fragmento de anticorpo do mesmo, de acordo com a presente invenção;
- (ii) a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção;
- (iii) o vetor compreendendo o ácido nucleico de acordo com a presente invenção; e/ou
- (iv) a célula que expressa o anticorpo de acordo com a presente invenção e/ou compreende o vetor ou a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[00203] Em outras palavras, a presente invenção também fornece uma composição compreendendo o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção, o vetor de acordo com a presente invenção e/ou a célula de acordo com para a presente invenção.

[00204] Preferivelmente, a composição é uma composição farmacêutica. A composição farmacêutica pode preferivelmente também conter um veículo, diluente e/ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Embora o veículo ou excipiente possa facilitar a administração, ele próprio não deve induzir a produção de anticorpos

prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição. Nem deve ser tóxico. Os veículos adequados podem ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, como proteínas, polipeptídeos, lipossomas, polissacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e partículas de vírus inativas. Em geral, veículos farmaceuticamente aceitáveis em uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção podem ser componentes ativos ou componentes inativos.

[00205] Podem ser utilizados sais farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, sais de ácidos minerais, tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos e sulfatos, ou sais de ácidos orgânicos, tais como acetatos, propionatos, malonatos e benzoatos.

[00206] Os veículos farmaceuticamente aceitáveis em uma composição farmacêutica podem conter adicionalmente líquidos como água, solução salina, glicerol e etanol. Além disso, substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes ou substâncias tampão de pH, podem estar presentes nessas composições. Tais veículos permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas e suspensões para ingestão pelo sujeito.

[00207] As composições farmacêuticas da invenção podem ser preparadas de várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, como soluções líquidas ou suspensões. Também podem ser preparadas formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção (por exemplo, uma composição liofilizada, similar ao Synagis™ e Herceptin™, para reconstituição com água estéril contendo um conservante). A composição pode ser preparada, por exemplo, como uma pomada, creme ou pó. A composição pode ser preparada para, por exemplo,

como um comprimido ou cápsula, como um spray ou como um xarope (opcionalmente aromatizado). A composição pode ser preparada, por exemplo, como um inalador, usando um pó fino ou um spray. A composição pode ser preparada, por exemplo, como gotas. A composição pode estar na forma de kit, projetada de modo que uma composição combinada possa ser reconstituída, por exemplo, imediatamente antes da administração. Por exemplo, um anticorpo liofilizado pode ser fornecido na forma de kit com água estéril ou um tampão estéril.

[00208] É preferido que o ingrediente ativo na composição seja uma molécula de anticorpo, um fragmento de anticorpo ou variantes e derivados do mesmo, em particular o ingrediente ativo na composição seja um anticorpo, um fragmento de anticorpo ou variantes e derivados do mesmo, de acordo com a presente invenção. A composição pode conter agentes que protegem o anticorpo da degradação no trato gastrointestinal, mas que liberam o anticorpo uma vez absorvido pelo trato gastrointestinal.

[00209] Uma descrição minuciosa dos veículos farmaceuticamente aceitáveis está disponível em Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> edição, ISBN: 0683306472.

[00210] As composições farmacêuticas da invenção geralmente têm um pH entre 5,5 e 8,5, em algumas modalidades isso pode estar entre 6 e 8 e em outras modalidades cerca de 7. O pH pode ser mantido pelo uso de um tampão. A composição pode ser estéril e/ou livre de pirogênio. A composição pode ser isotônica em relação aos seres humanos. Em uma modalidade, as composições farmacêuticas da invenção são fornecidas em recipientes hermeticamente fechados.

[00211] A composição pode assumir a forma de uma suspensão, solução ou emulsão em um veículo oleoso ou aquoso e, em particular, pode conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão,

conservantes, estabilizadores e/ou dispersantes. Alternativamente, a molécula de anticorpo pode estar na forma seca, para reconstituição antes do uso com um líquido estéril apropriado.

[00212] A composição pode compreender um veículo, como água ou solução salina. Um veículo é tipicamente entendido como um material que é adequado para armazenar, transportar e/ou administrar um composto, tal como um composto farmaceuticamente ativo, em particular os anticorpos de acordo com a presente invenção. Por exemplo, o veículo pode ser um líquido fisiologicamente aceitável, adequado para armazenar, transportar e/ou administrar um composto farmaceuticamente ativo, em particular os anticorpos de acordo com a presente invenção.

[00213] A composição pode ser uma solução aquosa que é livre de pirogênio e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Aqueles versados na matéria são bem capazes de preparar soluções adequadas usando, por exemplo, veículos isotônicos, como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de Ringer lactada. Conservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser incluídos, conforme necessário. A composição de acordo com a presente invenção pode ser fornecida, por exemplo, em uma seringa pré-carregada.

[00214] A composição como definida acima também pode estar em uma forma de dosagem incluindo, mas não se limitando a, cápsulas, comprimidos, suspensões ou soluções aquosas. No caso de comprimidos, os veículos comumente usados incluem lactose e amido de milho. Agentes lubrificantes, como estearato de magnésio, também são normalmente adicionados. Para a forma de cápsula, diluentes úteis incluem lactose e amido de milho seco. Quando são necessárias suspensões aquosas, o ingrediente ativo pode ser combinado com agentes emulsificantes e de suspensão. Se desejado, certos agentes

adoçantes, aromatizantes ou corantes também podem ser adicionados.

[00215] Outros exemplos de veículos compreendidos pela composição incluem, mas não estão limitados a, óleo mineral, petrolato líquido, petrolato branco, propileno glicol, polioxietileno, composto de polioxipropileno, cera emulsificante e água. Alternativamente, a composição pode ser formulada em uma loção ou creme adequado. No contexto da presente invenção, veículos adequados incluem, mas não estão limitados a, óleo mineral, monoestearato de sorbitano, polissorbato 60, cera de ésteres cetílicos, álcool cetearílico, 2-octildodecanol, álcool benzílico e água.

[00216] Em uma modalidade, uma composição da invenção pode incluir anticorpos da invenção, em que os anticorpos podem representar pelo menos 50% em peso (por exemplo, 60%, 70%, 75%, 80%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais) da proteína total na composição. Em tal composição, os anticorpos estão preferivelmente na forma purificada.

[00217] As composições farmacêuticas podem incluir um antimicrobiano, particularmente se embalado em um formato de doses múltiplas. Eles podem compreender detergente, por exemplo, um Tween (polissorbato), como o Tween 80. Os detergentes estão geralmente presentes em níveis baixos, por exemplo, inferiores a 0,01%. As composições também podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para dar tonicidade. Por exemplo, uma concentração de  $10 \pm 2$  mg/ml de NaCl é típica.

[00218] Além disso, as composições farmacêuticas podem compreender um álcool de açúcar (por exemplo, manitol) ou um dissacarídeo (por exemplo, sacarose ou trealose), por exemplo, em torno de 15 a 30 mg/ml (por exemplo, 25 mg/ml), particularmente se forem para liofilizar ou se incluírem material que foi reconstituído de material liofilizado. O pH de uma composição para liofilização pode ser

ajustado entre 5 e 8, ou entre 5,5 e 7 ou cerca de 6,1 antes da liofilização.

[00219] As composições da invenção também podem compreender um ou mais agentes imunorreguladores. Em uma modalidade, um ou mais dos agentes imunorreguladores incluem um adjuvante.

### **Produção de Anticorpos**

[00220] Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, um anticorpo de estrutura pode ser fornecido e modificado geneticamente na(s) região(ões) do cotovelo. Para obter um anticorpo de estrutura, por exemplo, a metodologia geral para produzir anticorpos monoclonais usando a tecnologia de hibridoma é bem conhecida (Kohler, G. e Milstein, C, 1975; Kozbar *et al.* 1983). Em particular, o método alternativo de imortalização por EBV descrito em WO 2004/076677 pode ser usado.

[00221] Um método preferido é descrito em WO 2004/076677. Neste método, as células B que produzem o anticorpo da invenção são transformadas com EBV e um ativador de células B policlonais. Estimulantes adicionais de crescimento e diferenciação celular podem opcionalmente ser adicionados durante a etapa de transformação para aumentar ainda mais a eficiência. Esses estimulantes podem ser citocinas como IL-2 e IL-15. Em um aspecto, a IL-2 é adicionada durante a etapa de imortalização para melhorar ainda mais a eficiência da imortalização, mas seu uso não é essencial. As células B imortalizadas produzidas utilizando estes métodos podem então ser cultivadas utilizando métodos conhecidos na técnica e anticorpos isolados das mesmas.

[00222] Outro método preferido é descrito em WO 2010/046775. Neste método, as células plasmáticas são cultivadas em número limitado ou como células plasmáticas únicas em placas de cultura de

microcavidades. Os anticorpos podem ser isolados a partir das culturas de células plasmáticas. Além disso, a partir das culturas de células plasmáticas, o RNA pode ser extraído e a PCR pode ser realizada usando métodos conhecidos na técnica. As regiões VH e VL dos anticorpos podem ser amplificadas por RT-PCR (PCR de transcriptase reversa), sequenciadas e clonadas em um vetor de expressão que é então transfetado para células HEK293T ou outras células hospedeiras. A clonagem de ácido nucleico em vetores de expressão, a transfecção de células hospedeiras, a cultura das células hospedeiras transfetadas e o isolamento do anticorpo produzido podem ser feitos usando quaisquer métodos conhecidos por alguém versado na técnica.

[00223] Fragmentos dos anticorpos da invenção podem ser obtidos de anticorpos por métodos que incluem digestão com enzimas, tal como pepsina ou papaína, e/ou por clivagem de ligações dissulfeto por redução química. Alternativamente, os fragmentos dos anticorpos podem ser obtidos por clonagem e expressão de parte das sequências das cadeias pesada ou leve. Os "fragmentos" de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub>.

[00224] Por exemplo, a presente invenção também fornece um processo para a produção de um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antígeno, de acordo com a presente invenção, caracterizado pelo fato de que compreende:

- Transformar uma célula hospedeira eucariótica por (por exemplo, como descrito acima) incorporação de uma ou mais moléculas de ácido nucleico, como descrito acima, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo, por exemplo, um vetor de acordo com a presente invenção como descrito acima;

- cultivar a célula hospedeira sob condições adequadas para que as referidas moléculas de ácido nucleico sejam expressas;

- causar ou permitir que as referidas primeira e segunda cadeias de polipeptídeos se combinem para formar o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo; e
- opcionalmente, purificar o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, do meio de cultura.

[00225] Técnicas padrão de biologia molecular podem ser usadas para preparar sequências de DNA que codificam os anticorpos ou fragmentos de anticorpo da presente invenção. As sequências de DNA desejadas podem ser sintetizadas completamente ou em parte usando técnicas de síntese de oligonucleotídeos. As técnicas de mutagênese direcionada ao sítio e reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser usadas conforme apropriado.

[00226] Qualquer célula hospedeira/sistema vetorial adequado podem ser utilizados para expressão das sequências de DNA que codificam as moléculas de anticorpo da presente invenção ou fragmentos das mesmas. Bactérias, por exemplo, *E. coli*, e outros sistemas microbianos podem ser utilizados, em parte, para a expressão de fragmentos de anticorpos, tais como fragmentos Fab e F(ab')<sub>2</sub>, e especialmente fragmentos Fv e fragmentos de anticorpos de cadeia única, por exemplo, cadeia Fvs. Os sistemas de expressão de células hospedeiras de mamíferos eucarióticos podem ser utilizados para a produção de moléculas de anticorpo maiores, incluindo moléculas de anticorpo completas. Células hospedeiras de mamífero adequadas incluem, mas não estão limitadas a, células CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, mieloma ou hibridoma.

[00227] Por exemplo, a linhagem celular pode ser transfectada com dois vetores, um primeiro vetor que codifica a primeira cadeia de polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo de cadeia pesada e um segundo vetor que codifica a segunda cadeia de polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo de cadeia leve. Alternativamente, um único

vetor pode ser usado, o vetor incluindo sequências que codificam a primeira e a segunda cadeia de polipeptídeo, por exemplo, polipeptídeos de cadeia leve e cadeia pesada.

[00228] Os anticorpos podem ser ainda purificados, se desejado, utilizando filtração, centrifugação e vários métodos cromatográficos, tal como HPLC ou cromatografia por afinidade. Técnicas para purificação de anticorpos, por exemplo, anticorpos monoclonais, incluindo técnicas para a produção de anticorpos de grau farmacêutico, são bem conhecidos na técnica.

### **Métodos e Usos**

[00229] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece a utilização do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção, o vetor de acordo com a presente invenção, a célula de acordo com a presente invenção ou a composição (farmacêutica) de acordo com a presente invenção para uso em medicina.

[00230] Por conseguinte, a presente invenção também fornece um método de prevenção ou tratamento de uma doença ou distúrbio em um indivíduo compreendendo a etapa de administração do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção, o vetor de acordo com a presente invenção, a célula de acordo com a presente invenção ou a composição (farmacêutica) de acordo com a presente invenção ao indivíduo.

[00231] Entende-se que a uma ou mais especificidades do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, podem ser selecionadas de acordo com a doença ou distúrbio a ser prevenido e / ou tratado. Por exemplo, para prevenção e / ou tratamento da malária, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo pode compreender uma especificidade contra um

antígeno da malária, por exemplo, um sítio de ligação ao antígeno (formado por domínios variáveis) e / ou um (adicional) domínio funcional na região do cotovelo, que se liga especificamente a um antígeno da malária. Um exemplo do mesmo é um fragmento LAIR1 mutado como aqui descrito, em particular um fragmento LAIR1 mutado como descrito no documento WO 2016/207402 A1, por exemplo, compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 13 ou uma sua variante de sequência tendo pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente 90%, particularmente preferível 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência. Um anticorpo compreendendo essa especificidade (tal sítio de ligação (antígeno)) pode ser particularmente útil para fornecer imunidade a parasitas da malária no estágio sanguíneo (em particular o *Plasmodium falciparum*).

[00232] Doenças a serem tratadas e / ou prevenidas pelo uso do anticorpo / fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção; a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção; o vetor de acordo com a presente invenção; a célula de acordo com a presente invenção; ou a composição de acordo com a presente invenção inclui câncer, doenças infecciosas e distúrbios de auto-imunidade. Desse modo, o tratamento e / ou prevenção de câncer e / ou doenças infecciosas é preferido.

[00233] De preferência, o anticorpo / fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção; a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção; o vetor de acordo com a presente invenção; a célula de acordo com a presente invenção; ou a composição de acordo com a presente invenção pode ser utilizada para (a preparação de um medicamento) a profilaxia, tratamento e / ou melhoria de doenças cancerígenas ou tumorais. Em geral, o termo "câncer" inclui

tumores sólidos, em particular tumores sólidos malignos, como sarcomas, carcinomas e linfomas e câncer de sangue, como leucemias. Os cânceres incluem carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemias, tumores de células germinativas e blastomas.

[00234] De preferência, o anticorpo / fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção; a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção; o vetor de acordo com a presente invenção; a célula de acordo com a presente invenção; ou a composição de acordo com a presente invenção pode ser utilizada para (a preparação de um medicamento) para a profilaxia, tratamento e / ou melhoria de uma doença infecciosa. As doenças infecciosas incluem doenças infecciosas virais, retrovirais, bacterianas e protozoológicas.

[00235] Além disso, o anticorpo / fragmento de ligação a antígeno de acordo com a presente invenção; a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção; o vetor de acordo com a presente invenção; a célula de acordo com a presente invenção; ou a composição de acordo com a presente invenção pode ser utilizada para (a preparação de um medicamento) para a profilaxia, tratamento e / ou melhoria de distúrbios autoimunes. Tipicamente, doenças autoimunes surgem de uma resposta imune anormal do corpo contra substâncias e tecidos normalmente presentes no corpo (autoimunidade). Isso pode ser restrito a certos órgãos ou pode envolver um tecido específico em sítios diferentes. As doenças autoimunes podem ser classificadas pelo tipo correspondente de hipersensibilidade: tipo I (isto é, urticária induzida por soro autólogo), tipo II, tipo III ou tipo IV.

[00236] Além disso, o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção, o vetor de acordo com a presente invenção, a célula de acordo com a presente invenção ou a composição (farmacêutica) de acordo com a presente invenção para a

presente invenção também pode ser útil para diagnóstico (in vitro). Os métodos de diagnóstico podem incluir o contato de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo com uma amostra. Tais amostras podem ser isoladas de um indivíduo, por exemplo, uma amostra de tecido isolada coletada de, por exemplo, passagens nasais, cavidades sinusais, glândulas salivares, pulmão, fígado, pâncreas, rim, ouvido, olho, placenta, trato alimentar, coração, ovários, pituitária, adrenais, tireoide, cérebro, pele ou sangue, preferivelmente plasma ou soro. Os métodos de diagnóstico podem também incluir a detecção de um complexo de antígeno / anticorpo, em particular após o contato de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo com uma amostra. Tal etapa de detecção é tipicamente realizada na bancada, isto é, sem qualquer contato com o corpo humano ou animal. Exemplos de métodos de detecção são bem conhecidos do especialista na técnica e incluem, por exemplo, ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima).

[00237] Também para diagnóstico, entende-se que a uma ou mais especificidades do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, podem ser escolhidas de acordo com a doença ou distúrbio a ser prevenido e / ou tratado, essencialmente como descrito acima para prevenção e / ou tratamento de doenças.

[00238] Além disso, a presente invenção também fornece um ensaio para detectar um antígeno ou para quantificar a ligação ao antígeno, compreendendo:

- incubar um antígeno com o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção sob condições que permitem a ligação do antígeno ao anticorpo polivalente; e

- detectar a ligação antígeno-anticorpo.

[00239] Por exemplo, esse ensaio pode ser útil no contexto do

diagnóstico como acima descrito.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[00240] A seguir, será apresentada uma breve descrição das figuras em anexo. As figuras destinam-se a ilustrar a presente invenção em maiores detalhes. No entanto, não se destinam a limitar o objetivo da invenção de forma alguma.

[00241] **Figura 1** (A) anticorpo monoespecífico clássico compreendendo duas cadeias pesadas (cinza), cada uma com um único domínio variável VH e três domínios constantes CH1, CH2 e CH3 e duas cadeias leves (brancas), cada uma com um único domínio variável VL e um domínio constante único CL. A região do cotovelo é indicada por setas.

(B) Exemplos preferidos de anticorpos de acordo com a presente invenção (moléculas de Ig de inserção no cotovelo; IEI Ig) derivados do anticorpo monoespecífico clássico mostrado em (A): anticorpo compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve; anticorpo compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia leve, porém nenhum inserto de cotovelo na cadeia pesada; anticorpo compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada e de cada cadeia leve; anticorpo compreendendo dois domínios funcionais (adicionais) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhum inserção de cotovelo na cadeia leve; e anticorpo compreendendo dois domínios funcionais (adicionais) na região do cotovelo de cada cadeia leve, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia pesada.

(C) Exemplos preferidos de fragmentos de ligação a antígeno e anticorpos de acordo com a presente invenção (moléculas de Ig de inserção no cotovelo; IEI Ig) derivados de fragmentos de

anticorpo ou de anticorpos biespecíficos: fragmento F (ab) 2 compreendendo um único (adicional) funcional domínio na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve; Fragmento F(ab)<sub>2</sub> compreendendo um domínio funcional (adicional) único na região do cotovelo de cada cadeia leve, porém nenhum inserto de cotovelo na cadeia pesada; Fragmento Fab compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhum inserto de cotovelo na cadeia leve; Fragmento Fab compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia leve, porém nenhum inserto de cotovelo na cadeia pesada; Anticorpos de troca de braço de CrossMab/Puxadores em orifícios/Fab ortogonal/Fab, compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de uma única cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo nas cadeias leves e na outra cadeia pesada; scFv-(H)IgG compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve; IgG (H) -scFv compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve; scFv-(L)IgG compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve; IgG(L)-scFv compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve; e DVD-Ig compreendendo um único domínio funcional (adicional) na região do cotovelo de cada cadeia pesada, porém nenhuma inserção de cotovelo na cadeia leve.

[00242] **Figura 2** mostra para o Exemplo 1 um esquema das sete construções de anticorpos de acordo com a presente invenção (C2 a

C8) em comparação com os anticorpos estrutura (GCE536, C1).

[00243] **Figura 3** mostra para o Exemplo 2 os valores de EC50 determinados por análise de regressão não linear dos valores de ligação (DO) e concentrações relativas de anticorpos nos testes ELISA feitos usando um conjunto de抗ígenos ou anticorpos anti-domínio. As construções também foram testadas quanto à ligação a IEs (isolado 9215) e valores de ligação (%) em uma concentração de 1 µg / ml são mostrados.

[00244] **Figura 4** mostra para o Exemplo 3 as curvas de ligação de SPR de C4 e diferentes controles para GM-CSF e colágeno. C4 e C5 que usam GCE536 como estrutura ligam-se ao GM-CSF, porém somente C4 é então ligado por colágeno. Os anticorpos FI174 não específicos e MGD<sup>UCA</sup> específicos de colágeno não mostram qualquer sinal de ligação específico.

[00245] **Figura 5** mostra para o Exemplo 3 as curvas de ligação a SPR de C4 e diferentes controles para GM-CSF e colágeno. C4 e GCE536 se ligam ao GM-CSF, porém somente C4 é então reconhecido por colágeno. O anticorpo MGD<sup>UCA</sup> específico de colágeno liga-se apenas ao colágeno. O anticorpo de controle TT107 é um anticorpo monoclonal específico do TT, que não mostra qualquer sinal de ligação específico no experimento SPR.

[00246] **Figura 6** mostra para o Exemplo 4 as curvas de ligação a ELISA das construções C5, C5b, C6 e C6b ao GM-CSF ou por anticorpos anti-PD1 ou anti-SLAM, em comparação com o anticorpo estrutura (GCE536). As construções C5 e C5b contendo PD1 e as construções C6 e C6b contendo SLAM são reconhecidas por anticorpos anti-PD1 ou anti-SLAM, respectivamente. Todas as construções se ligam ao GM-CSF como GCE536. A presença de ligantes em C5b e C6 não afeta a ligação.

[00247] **Figura 7** mostra para o Exemplo 6 a curva de ligação a

ELISA de um anticorpo Strep-tactina para a construção C9 em comparação com a estrutura C1b. O marcador Twin Strep inserido no cotovelo da construção C9 é especificamente reconhecida pelo anticorpo Strep-tactina.

[00248] **Figura 8** mostra para o Exemplo 7 um esquema das quatro construções de anticorpos adicionais (C9 a C12) em comparação com o anticorpo estrutura (FI174).

[00249] **Figura 9** mostra para o Exemplo 8 as curvas de ligação SPR de C9 e C10 e diferentes controles para H1 e TT. C9 e C10 mostram ligação dupla a H1 e TT. TT107 é um anticorpo monoclonal específico de TT.

[00250] **Figura 10** mostra para o Exemplo 8 as curvas de ligação de SPR de C11 e C12 e diferentes controles à proteína H1 e RSV. C11 e C12 mostram ligação dual a H1 e à proteína RSV F. MPE8 é um anticorpo monoclonal específico da proteína RSV F.

## **EXEMPLOS**

[00251] A seguir, são apresentados exemplos particulares que ilustram várias modalidades e aspectos da invenção. No entanto, a presente invenção não deve ser limitada em escopo pelas modalidades específicas aqui descritas. As preparações e exemplos a seguir são dados para permitir aos versados na técnica entender e praticar mais claramente a presente invenção. A presente invenção, no entanto, não é limitada em escopo pelas modalidades exemplificadas, que são pretendidas como ilustrações de aspectos únicos da invenção, e métodos que são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. De facto, várias modificações da invenção para além das aqui descritas tornar-se-ão facilmente evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição anterior, figuras acompanhantes e exemplos abaixo. Todas essas modificações se enquadram no escopo das reivindicações anexas.

**Exemplo 1: Projeto e construção de variantes de anticorpo que inserem diferentes domínios funcionais similares a Ig na região do cotovelo dos anticorpos estrutura.**

[00252] Para investigar o efeito de domínios funcionais distintos (adicionalis) inseridos na região do cotovelo de um anticorpo na especificidade do anticorpo, foram projetadas sete construções diferentes (denominadas “C2 - C8”), nas quais o LAIR1 não mutado (SEQ ID NO: 12) LAIR 1 mutado (SEQ ID NO: 13) ou outros domínios similares a Ig foram inseridos na região do cotovelo de um anticorpo que foi usado como andaime. As construções C2 - C3 têm a mesma região constante completa de cadeia pesada que a construção C1 (VH: SEQ ID NO: 5, VL: SEQ ID NO: 6, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 7). As construções C4 - C6 têm a mesma região constante completa de cadeia pesada que o anticorpo GCE536 (VH: SEQ ID NO: 1, VL: SEQ ID NO: 2, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, constante da cadeia kappa leve região: SEQ ID NO: 4; Piccoli, L., *et al.* Neutralização e depuração de GM-CSF por autoanticorpos em proteinose alveolar pulmonar. *Nature Communications* 6, 7375 (2015)). As construções C7 - C8 têm a mesma região constante completa de cadeia pesada que a construção C1b (VH: SEQ ID NO: 8, VL: SEQ ID NO: 9, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante de cadeia leve: SEQ ID NO: 4). A cadeia leve das construções não foi modificada em comparação com os anticorpos estrutura. Todas as construções foram finalmente expressas como anticorpos monoclonais (cadeias pesadas e leves).

[00253] As seguintes construções foram produzidas e são mostradas esquematicamente na Figura 2:

1. "C1" (VH: SEQ ID NO: 5, VL: SEQ ID NO: 6, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia

leve lambda: SEQ ID NO: 7) é um anticorpo monoespecífico recombinante para fins de controle. C1 é formado por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto da expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada ("VH3-30"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada ("JH6"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante *lambda* de cadeia leve.

2. "C1b" (VH: SEQ ID NO: 8, VL: SEQ ID NO: 9, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante *kappa* da cadeia leve: SEQ ID NO: 4) é um anticorpo monoespecífico recombinante para fins de controle. C1 é formado por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto da expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada ("VH3-20"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada ("JH3"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve; o produto de expressão de um

segmento de gene C (constante) de uma região constante *kappa* de cadeia leve.

3. Na construção "C2", um fragmento LAIR-1 mutado ("LAIR1<sup>mut</sup>"; SEQ ID NO: 13) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo monoespecífico recombinante "C1" (ver acima). No fragmento LAIR1 mutado, a ligação de LAIR1 ao colágeno é abolida, porém o fragmento LAIR1 mutado liga-se fortemente aos eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Tan, J., Pieper, K., Piccoli, L., et al., Uma inserção de LAIR1 gera anticorpos amplamente reativos contra antígenos variantes da malária. *Nature* 529, 105-109 (2016); WO 2016/207402 A1). A construção "C2" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 53, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 54) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de C1 ("VH3-30"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de C1 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de C1 ("JH6"); o produto de expressão do fragmento LAIR-1 mutado de MGD21 ("LAIR1<sup>D21</sup>"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de C1 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de C1; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

4. Na construção "C3", um fragmento LAIR-1 não mutado ("LAIR1<sup>gen</sup>"; SEQ ID NO: 12) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo monoespecífico recombinante "C1" (ver acima). A construção "C3" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 55, cadeia leve completa:

SEQ ID NO: 54) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de C1 ("VH3-30"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de C1 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de C1 ("JH6"); o produto de expressão do fragmento LAIR-1 não mutado ("LAIR1<sup>gen</sup>"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de C1 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de C1; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

5. Na construção "C4", um fragmento LAIR-1 não mutado ("LAIR1<sup>gen</sup>"; SEQ ID NO: 13) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo GCE536. A construção "C4" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 56, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 57) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("VH1-46"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("JH6"); o produto de expressão do fragmento LAIR-1 não mutado ("LAIR1<sup>gen</sup>"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536 e o produto de

expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

6. Na construção "C5", um domínio extracelular similar a Ig da molécula PD1 ("PD1"; SEQ ID NO: 14) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo GCE536. A construção "C5" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 58, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 57) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("VH1-46"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("JH6"); o produto de expressão de um domínio extracelular similar a Ig da molécula PD1 ("PD1"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

7. Na construção "C5b", um domínio extracelular similar a Ig da molécula PD1 ("PD1"; SEQ ID NO: 14) com sequências intrônicas de flanqueamento ("JH-PD1 de 15-mer"; SEQ ID NO: 49 e ligantes "PD1-CH1 de 15-mer"; SEQ ID NO: 50) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo GCE536. A construção "C5" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 59, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 57) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de

gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("VH1-46"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("JH6"); o produto de expressão de um ligante ("JH-PD1 de 15-mer"); o produto de expressão de um domínio similar a Ig extracelular da molécula PD1 ("PD1"); o produto de expressão de um ligante ("PD1-CH de 15-mer"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante *kappa* de cadeia leve.

8. Na construção "C6", um domínio extracelular similar a Ig da molécula SLAM ("SLAM"; SEQ ID NO: 15) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo GCE536. A construção "C6" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 60, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 57) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("VH1-46"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("JH6"); o produto de expressão de um domínio extracelular similar a Ig da molécula SLAM ("SLAM"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de

expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

9. Na construção "C6b", um domínio extracelular similar a Ig da molécula SLAM ("SLAM"; SEQ ID NO: 15) com sequências intrônicas de flanqueamento ("JH-SLAM de 15-mer"; SEQ ID NO: 51 e "15-mer SLAM-CH1" ligantes"; SEQ ID NO: 52) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo GCE536. Construção "C6" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 61, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 57) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("VH1-46"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de GCE536 ("JH6"); o produto de expressão de um ligante ("JH-SLAM de 15-mer"); o produto de expressão de um domínio extracelular similar a Ig da molécula SLAM ("SLAM"); o produto de expressão de um ligante ("15-mer SLAM-CH"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de GCE536; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante *kappa* de cadeia leve.

10. Na construção "C7", um domínio extracelular similar a Ig da molécula PD1 ("PD1"; SEQ ID NO: 14) foi inserido na região do

cotovelo do anticorpo monoespecífico recombinante "C1b" (ver acima). A construção "C7" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 62, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 63) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada ("VH3-20"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada ("JH3"); o produto de expressão de um domínio extracelular similar a Ig da molécula PD1 ("PD1"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

11. Na construção "C8", um domínio extracelular similar a Ig da molécula SLAM ("SLAM"; SEQ ID NO: 15) foi inserido na região do cotovelo do anticorpo monoespecífico recombinante "C1b" (ver acima). A construção "C8" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 64, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 63) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada ("VH3-20"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada ("JH3"); o produto de expressão de um domínio extracelular similar a Ig da molécula SLAM ("SLAM"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região

constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

**Exemplo 2: Domínios similares a Ig podem ser inseridos na região do cotovelo de anticorpos, resultando em anticorpos funcionais**

[00254] As oito construções de anticorpos descritas no Exemplo 1 foram produzidas de forma recombinante por transfecção transitória. Para este fim, as cadeias pesada e leve do anticorpo foram clonadas nos vetores de expressão de IgG1, Igκ e Igλ humana e expressas por transfecção transitória de células Expi293F (ThermoFisher Scientific) usando polietilenimina (PEI). As linhagens celulares foram rotineiramente testadas quanto à contaminação por micoplasma.

[00255] Em seguida, as construções de anticorpo C1 - C8 e o anticorpo de controle GCE536 (ver Exemplo 1) foram testadas para a coloração de 9215 IEs (eritrócitos infectados) e os valores de ligação (%) na concentração de 1 µg / ml de anticorpos foram calculados por interpolação de curvas de ligação ajustadas a um modelo de curva sigmoidal (Graphpad Prism 6). Além disso, a ligação ao colágeno humano recombinante, anticorpo LAIR1 anti-humano, GM-CSF humano recombinante, um anticorpo anti-PD1 e anti-SLAM foi testada por ELISA. Em síntese, as IgGs totais foram quantificadas usando placas MaxiSorp de 96 cavidades (Nunc) revestidas com IgG anti-humana de cabra (SouthernBiotech, 2040-01) usando o Material de Referência Certificado 470 (ERMs-DA470, Sigma-Aldrich) como padrão. Para testar a ligação específica das construções de anticorpos, as placas ELISA foram revestidas com 2 µg ml<sup>-1</sup> de colágeno humano recombinante tipo I (Millipore, CC050), 2 µg ml<sup>-1</sup> de um anticorpo anti-

LAIR1 anti-humano (clone DX26, BD Biosciences 550810), 1 µg ml<sup>-1</sup> de GM-CSF humano recombinante (Gentaur), 2 µg ml<sup>-1</sup> de um anticorpo anti-PD1 ou anti-SLAM (R&D Systems, AF1086 e AF164). As placas foram bloqueadas com albumina de soro bovina a 1% (BSA) e incubadas com anticorpos titulados, seguidos por IgG anti-humana de cabra conjugada com AP, Fragmento Fcγ específico (Jackson Immuno Research, 109-056-098). As placas foram então lavadas, o substrato (p-NPP, Sigma) foi adicionado e as placas foram lidas a 405 nm.

[00256] Os resultados dos diferentes estudos de ligação são mostrados na Figura 3. Construções de anticorpos que transportam IEs manchados com LAIR1 foram reconhecidas por um anticorpo anti-LAIR1. A inserção de domínios similares a Ig LAIR1, PD1 ou SLAM Ig na região do cotovelo de um anticorpo anti-GM-CSF não afetou a ligação a GM-CSF (construções C4 - C6), indicando que este sítio é permissivo para inserções de diferentes domínios sem afetar a especificidade do anticorpo original. Ao contrário, a inserção de LAIR1 no CDR3 aboliu a ligação a GM-CSF (dados não mostrados). Por conseguinte, a região de cotovelo é permissiva para inserções de diferentes domínios, sem afetar a especificidade do anticorpo original.

**Exemplo 3: Construções que contêm um domínio similar a Ig no cotovelo podem se ligar simultaneamente a dois抗ígenos diferentes**

[00257] Para testar se as construções biespecíficas portadoras de um sítio de ligação na região do cotovelo são capazes de se ligar simultaneamente com as especificidades, a ligação simultânea foi investigada por ressonância de plasmônio de superfície (SPR). Para esse fim, a construção biespecífica C4, que possui uma região V(D)J específica para GM-CSF e transporta LAIR1 não-mutado (sítio de ligação ao colágeno) no cotovelo, foi testada quanto à ligação simultânea ao GM-CSF e ao colágeno por ressonância de plasmônio de

superfície (SPR).

[00258] Em um experimento, o GM-CSF foi imobilizado na superfície de um *chip* sensor e as construções foram injetadas, seguidas pela injeção de colágeno. Os anticorpos C5 e GCE536 (cf. acima), anticorpo MGD<sup>UCA</sup> (contém LAIR1 não-mutado e são, portanto, capazes de se ligar ao colágeno; Tan, J., Pieper, K., Piccoli, L., *et al.* Uma inserção de LAIR1 gera anticorpos amplamente reativos contra antígenos variantes da malária. *Nature* 529, 105-109 (2016); VH: SEQ ID NO: 71, VL: SEQ ID NO: 72, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 4) e anticorpo FI174 (específico para a hemaglutinina influenza H1; Pappas, L., *et al.* Desenvolvimento rápido de anticorpos neutralizantes da influenza amplamente por meio de mutações redundantes. *Nature* 516, 418-422 (2014); (VH: SEQ ID NO: 10, VL: SEQ ID NO: 11, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 4) foram utilizadas como controles. Em síntese, GM-CSF (200 nM) foi estabilizado em tampão acetato a 10 mM, pH 4,5 e imobilizado em um *chip* ProteOnsensor (Bio-Rad) de etil (dimetilaminopropil)carbodiimida / N-hidroxissuccinimida (EDC / NHS) pré-ativado através de acoplamento de amina; grupos não reagidos foram bloqueados por injeção de HCl de etanolamina a 1M. salina tamponada HEPES (HBS) (HEPES a 10 mM, pH 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 3 mM, tensoativo Tween-20 a 0,005%) foi utilizado como tampão de execução. Todas as injeções foram feitas com uma taxa vazão de 100 µl / min. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em HBS a 10 nM e injetados por 240 s no *chip* revestido com GM-CSF, seguido por injeção de colágeno (50 nM) por 120 s. Um canal do *chip* foi injetado com HBS e usado como referência para a análise. Cada interação de ligação dos anticorpos monoclonais a GM-CSF e ao colágeno foi avaliada usando um instrumento ProteONXPR36 (Bio-Rad) e os dados foram processados com o software ProteOn Manager.

[00259] Os resultados são mostrados na Figura 4. Ambas as construções C4 e C5, que usam GCE536 como estrutura (veja o Exemplo 1), ligam-se a GM-CSF. De C4 e C5, apenas C4 (que transporta LAIR1 na região do cotovelo - enquanto C5 transporta um domínio similar a Ig de PD1 na região do cotovelo) é então ligado por colágeno. O anticorpo monoespecífico anti-GM-CSF GCE536 liga-se apenas a GM-CSF, porém não ao colágeno. O anticorpo anti-H1 FI174 e o anticorpo MGD<sup>UCA</sup> específico de colágeno não mostram qualquer sinal de ligação específico. Em resumo, esses dados mostram que a construção biespecífica C4 liga-se a GM-CSF e em seguida o colágeno liga-se ao domínio LAIR1 de C4.

[00260] Em um segundo experimento, a proteína A foi utilizada para capturar a construção seguida de coinjeção dos analitos (GM-CSF seguido de colágeno). Neste experimento, os anticorpos GCE536 e MGD<sup>UCA</sup> (todos descritos nos Exemplos 1 e 2) e o anticorpo TT107 (específico para o toxoide tetânico (TT); VH: SEQ ID NO: 73, VL: SEQ ID NO: 74, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia leve: SEQ ID NO: 4) foram utilizados como controles. Em síntese, a proteína A (25 µg / ml) foi estabilizada em tampão acetato a 10 mM, pH 4,5 e imobilizada em um *chip* ProteOnsensor (Bio-Rad) pré-ativado, de etil (dimetilaminopropil) carbodiimida / N-hidroxissuccinimida (EDC / NHS) através de acoplamento de amina; os grupos não reagidos foram bloqueados por injeção de HCl de etanolamina a 1M. Salina tamponada por HEPES (HBS) (HEPES a 10 mM, pH 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 3 mM, tensoativo Tween-20 a 0,005%) como tampão de execução. Todas as injeções foram feitas com uma taxa de vazão de 100 µl / min. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em HBS a 10 nM e injetados por 240 s no *chip* revestido com Proteína A para captura, seguido por coinjeção de colágeno GM-CSF (50 nM) imediatamente seguido por

colágeno (50 nM) por um total de 110 s. Um canal do *chip* foi injetado com HBS e usado como referência para a análise. Cada interação de ligação dos anticorpos monoclonais a GM-CSF e colágeno foi avaliada usando um instrumento ProteONXPR36 (Bio-Rad) e os dados foram processados com o software ProteOn Manager.

[00261] Os resultados são mostrados na Figura 5. A construção C4 e GCE536 ligam-se a GM-CSF. No entanto, apenas C4 é então reconhecido pelo colágeno. O anticorpo MGD<sup>UCA</sup> específico de colágeno liga-se apenas ao colágeno. O anticorpo de controle TT107 é um anticorpo monoclonal específico para TT (toxoide tetânico), que não mostra qualquer sinal de ligação específico neste experimento de SPR. Em resumo, esses resultados mostram que construções contendo um domínio funcional (adicional), tal como um domínio similar a Ig, na região do cotovelo podem simultaneamente se ligar a (i) parceiro de ligação do sítio de ligação do cotovelo e (ii) o antígeno reconhecido pelos domínios variáveis do anticorpo estrutura.

**Exemplo 4: Domínios similares a Ig podem ser inseridos juntamente com ligantes de flanqueamento na região do cotovelo de anticorpos, resultando em anticorpos funcionais.**

[00262] As construções de anticorpo C5b e C6b contêm o mesmo domínio (PD1 ou SLAM) inserido no cotovelo nas construções C5 e C6, respectivamente, com dois ligantes de aminoácidos adicionais de 15-mers inseridos entre JH e o domínio e entre o domínio e CH1. As construções foram testadas quanto à ligação a GM-CSF humano recombinante, um anticorpo anti-PD1 e anti-SLAM por ELISA. Em síntese, as IgGs totais foram quantificadas usando placas MaxiSorp de 96 cavidades (Nunc) revestidas com IgG anti-humana de cabra (SouthernBiotech, 2040-01) usando o Material de Referência Certificado 470 (ERMs-DA470, Sigma-Aldrich) como um padrão. Para testar a ligação específica das construções de anticorpos, as placas ELISA

foram revestidas com 1 µg ml<sup>-1</sup> de GM-CSF humano recombinante (Gentaur), 2 µg ml<sup>-1</sup> de um anticorpo anti-PD1 ou anti-SLAM (R&D Systems, AF1086 e AF164). As placas foram bloqueadas com albumina de soro bovino a 1% (BSA) e incubadas com anticorpos titulados, seguidos por IgG anti-humana de cabra conjugada com AP, específica do fragmento Fcγ (Jackson Immuno Research, 109-056-098). As placas foram então lavadas, o substrato (p-NPP, Sigma) foi adicionado e as placas foram lidas a 405 nm.

[00263] Os resultados dos diferentes estudos de ligação são mostrados na Figura 6. A inserção de domínios similares a Ig PD1 ou SLAM com ligantes de flanqueamento na região do cotovelo de um anticorpo anti-GM-CSF não afetou a ligação a GM-CSF, indicando que este sítio é permissivo para inserções também de domínios diferentes com ligantes de flanqueamento sem afetar a especificidade do anticorpo original. Além disso, a presença dos ligantes não alterou o domínio do similar a Ig, uma vez que C5 e C5b foram igualmente reconhecidos por um anticorpo anti-PD1. Resultados similares foram obtidos para C6 e C6b reconhecidos por um anticorpo anti-SLAM. Tomadas em conjunto, estas descobertas sugerem que os domínios podem ser inseridos no cotovelo com ligantes adicionais que distanciam tais domínios da principal estrutura de anticorpos. Sem estar vinculado a qualquer teoria, supõe-se que os ligantes possam fornecer flexibilidade realçada da inserção.

#### **Exemplo 5: Projeto de um anticorpo contendo um marcador molecular inserido na região do cotovelo**

[00264] Para investigar a possibilidade de usar um marcador inserido na região do cotovelo de um anticorpo para detecção de anticorpos, foi projetada uma construção (denominada "C9"), na qual um marcador Strep duplo foi inserida na região do cotovelo de cadeia pesada do andaime anticorpo C1b (cf. Exemplo 1). A cadeia leve da construção

não foi modificada em comparação com o anticorpo estrutura. A construção foi finalmente expressa como anticorpo monoclonal (cadeias pesadas e leves).

[00265] A construção "C9" é mostrada esquematicamente na Figura 2. Na construção "C9", um marcador Strep duplo ("2XST"; SEQ ID NO: 20) foi inserido na região do cotovelo de um anticorpo monoespecífico recombinante "C1b" (veja acima). A construção "C9" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 65, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 63) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada ("VH3-20"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada ("JH3"); o produto de expressão de um marcador Strep duplo ("2XST"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante *kappa* de cadeia leve.

**Exemplo 6: Marcadores moleculares podem ser inseridos na região do cotovelo de anticorpos, resultando em anticorpos funcionais.**

[00266] A construção de anticorpo "C9" descrita no Exemplo 5 foi produzida de forma recombinante por transfecção transitória. Para este fim, as cadeias pesada e leve de anticorpos foram clonadas nos vetores de expressão de IgG1 e Igκ humanas e expressas por transfecção transitória de células Expi293F (ThermoFisher Scientific) usando polietilenimina (PEI). As linhagens celulares foram rotineiramente

testadas quanto à contaminação por micoplasma.

[00267] Em seguida, a construção de anticorpo C9 e o anticorpo de controle C1b (ver Exemplo 1) foram testados quanto ao reconhecimento pela molécula de Strep-tactina específica de marcador de Strep por ELISA. Em síntese, as IgGs totais foram quantificadas usando placas MaxiSorp de 96 cavidades (Nunc) revestidas com IgG anti-humana de cabra (SouthernBiotech, 2040-01) usando o Material de Referência Certificado 470 (ERMs-DA470, Sigma-Aldrich) como padrão. Para testar o reconhecimento específico da construção do anticorpo, as placas ELISA foram revestidas com  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de um anticorpo IgG anti-humano (SouthernBiotech), as placas foram bloqueadas com albumina de soro bovina (BSA) a 1% e incubadas com anticorpos titulados, seguidos por Strep-Tactina conjugada com AP (Iba Lifesciences). As placas foram então lavadas, substrato (p-NPP, Sigma) foi adicionado e as placas foram lidas a 405 nm.

[00268] Os resultados são mostrados na Figura 7. A construção de anticorpo “C9” transportando um marcador de Strep foi eficiente e especificamente reconhecida por Strep-tactina específica de marcador de Strep, enquanto o anticorpo “C1b” de controle que não transporta o marcador de Strep não foi reconhecido. Estes resultados sugerem que o cotovelo é permissivo para inserção de marcadores moleculares que permitem o reconhecimento e o rastreamento de um anticorpo.

**Exemplo 7: Projeto de anticorpos contendo um domínio variável de anticorpo de cadeia única (VHH) ou um fragmento variável de cadeia única (ScFv) inserido na região do cotovelo**

[00269] Para investigar se a inserção de domínios funcionais (adicionais) que não sejam domínios similares a Ig na região do cotovelo resulta em anticorpos multiespecíficos funcionais, quatro novas construções foram projetadas (C9 a C12). Nas quatro novas construções C9 a C12, um domínio variável de anticorpo de cadeia

única (VHH) ou um fragmento variável de cadeia única (ScFv), específico para o toxoide tetânico (TT) ou para a proteína de fusão (F) do vírus sincicial respiratórios (RSV), respectivamente, foi inserido na região do cotovelo de um anticorpo específico para a hemaglutinina influenza H1 (FI174; Pappas, L., *et al.* Desenvolvimento rápido de anticorpos neutralizantes da influenza amplamente por meio de mutações redundantes. *Nature* 516, 418-422 (2014); VH: SEQ ID NO: 10, VL: SEQ ID NO: 11, região constante de cadeia pesada: SEQ ID NO: 3, região constante da cadeia *kappa* leve: SEQ ID NO: 12 / SEQ ID NO: 4). A cadeia leve das construções não foi modificada em comparação com o anticorpo estrutura FI174. Todas as construções foram finalmente expressas como anticorpos monoclonais (cadeias pesadas e leves).

[00270] As seguintes variantes foram produzidas e são mostradas esquematicamente na Figura 8:

1. Na construção "C10", um VHH anti-TT ("T3-VHH"; Rossotti, MA, *et al.* Aumentando a potência de neutralizar anticorpos de domínio único por funcionalização com um domínio de ligação a CD11b / CD18. mAbs 7, 820-828 (2015); SEQ ID NO: 16) foi inserida na região do cotovelo de FI174. A construção "C10" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 66, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 67) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("VH"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("JH"); o produto de expressão de um VHH anti-TT ("T3-VHH"; Rossotti, MA, *et al.* Aumentando a potência de neutralizar anticorpos de domínio único por funcionalização com um domínio de ligação a CD11b / CD18. mAbs

7, 820-828 (2015 )); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de FI174 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de FI174; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

2. Na construção "C11", um ScFv anti-TT ("TT39.7-ScFv"; SEQ ID NO: 17) foi inserido na região do cotovelo de FI174. A construção "C11" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 68, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 67) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("VH"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("JH"); o produto de expressão de um ScFv anti-TT ("TT39.7-ScFv"); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de FI174 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de FI174; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

3. Na construção "C12", uma proteína F anti-RSV VHH ("F4-VHH"; Rossey, I. *et al.* Anticorpos potentes de domínio único que prendem a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório em seu estado de pré-fusão. *Nature Communications* 8, 14158 (2017); SEQ ID

NO: 18) foi inserida na região do cotovelo de FI174. A construção "C12" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 69, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 67) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("VH"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("D"); o produto de expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("JH"); o produto de expressão de um VHH de proteína F anti-RSV ("F4-VHH"; Rossey, I., *et al.* Anticorpos potentes de domínio único que prendem a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório em seu estado de pré-fusão. *Nature Communications* 8, 14158 (2017)); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de FI174 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de FI174; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

4. Na construção "C13", uma ScFv de proteína F anti-RSV ("MPE8-ScFv"; Corti, D., *et al.* Neutralização cruzada de quatro paramixoviroses por um anticorpo monoclonal humano. *Nature* 501, 439-443 (2013); SEQ ID NO: 19) foi inserida na região do cotovelo do FI174. A construção "C13" (cadeia pesada completa: SEQ ID NO: 70, cadeia leve completa: SEQ ID NO: 67) é formada por (nesta ordem do terminal N ao C): o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("VH"); o produto de expressão de um segmento de gene D (diversidade) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("D"); o produto de

expressão de um elemento do segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia pesada de FI174 ("JH"); o produto de expressão de uma ScFv de proteína F anti-RSV ("MPE8-ScFv"; Corti, D., *et al.* Neutralização cruzada de quatro paramixoviroses por um anticorpo monoclonal humano. *Nature* 501, 439-443 (2013)); o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante de cadeia pesada (isótipo IgG1); e em uma cadeia separada: o produto de expressão de um segmento de gene V (variável) de um domínio variável de cadeia leve de FI174 e o produto de expressão de um elemento de segmento de gene J (União) de um domínio variável de cadeia leve de FI174; o produto de expressão de um segmento de gene C (constante) de uma região constante da cadeia leve.

**Exemplo 8: VHH e ScFv podem ser inseridos na região do cotovelo, resultando em anticorpos biespecíficos funcionais**

[00271] As quatro novas construções de anticorpos descritas no Exemplo 4 foram produzidas de forma recombinante por transfecção transitória. Para este fim, as cadeias pesada e leve do anticorpo foram clonadas nos vetores de expressão de IgG1, Igκ e Igλ humana e expressas por transfecção transitória de células Expi293F (ThermoFisher Scientific) usando polietilenimina (PEI). As construções foram testadas quanto à ligação dupla a (i) H1 e (ii) ou proteína TT ou RSV F por ressonância plasmônica de superfície (SPR).

[00272] Em um primeiro experimento, as construções C10 e C11 (com VHH ou scFv específico para TT na região do cotovelo de FI174) foram analisadas. Para este fim, a proteína A foi utilizada para capturar as construções seguidas por coinjeção dos analitos (H1 como primeiro analito imediatamente seguido por TT). Como controle, o anticorpo TT107 específico para TT e o anticorpo FI174 específico para H1. Em síntese, a proteína A (25 µg / ml) foi estabilizada em tampão de acetato a 10 mM, pH 4,5 e imobilizada em um *chip* ProteOnsensor (Bio-Rad) de

etil (dimetilaminopropil)carbodiimida / N-hidroxissucinimida (EDC/NHS) pré-ativado através de acoplamento de amina; os grupos não reagidos foram bloqueados por injeção de HCl de etanolamina a 1M. Salina tamponada por HEPES (HBS) (HEPES a 10 mM, pH 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 3 mM, tensoativo Tween-20 a 0,005%) como tampão de execução. Todas as injeções foram feitas com uma taxa de vazão de 100 µl / min. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em HBS a 10 nM e injetados por 240 s no *chip* revestido com Proteína A para captura, seguido pela coinjeção de hemaglutinina H1 California (50 nM) imediatamente seguida pelo toxoide tetânico (50 nM) por um total de 110 s. Um canal do *chip* foi injetado com HBS e usado como referência para a análise. Cada interação de ligação dos anticorpos monoclonais a H1 e TT foi avaliada usando um instrumento ProteONXPR36 (Bio-Rad) e os dados foram processados com o software ProteOn Manager. Os resultados são mostrados na Figura 9. As construções C10 e C11 (portando um domínio específico de TT (VHH ou ScFv)) ligam H1 e TT, enquanto os anticorpos de controle FI174 e TT107 reconhecem apenas H1 ou apenas TT, respectivamente.

[00273] Em um segundo experimento, foram analisadas as construções C12 e C13 (com VHH ou scFv específico para proteína F de RSV na região do cotovelo de FI174). Para tanto, foi utilizada a proteína A para capturar as construções seguidas por coinjeção dos analitos (H1 como primeiro analito imediatamente seguido pela proteína F do RSV). Como controles, anticorpo MPE8 específico da proteína F de RSV e o anticorpo FI174 específico de H1. Em síntese, a proteína A (25 µg / ml) foi estabilizada em tampão de acetato a 10 mM, pH 4,5 e immobilizada em um *chip* ProteOnsensor (Bio-Rad) de etil (dimetilaminopropil)carbodiimida / N-hidroxissucinimida (EDC / NHS) pré-ativado através de acoplamento de amina; os grupos não reagidos foram bloqueados por injeção de HCl de etanolamina a 1M. Salina

tamponada por HEPES (HBS) (HEPES a 10 mM, pH 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 3 mM, tensoativo Tween-20 a 0,005%) como tampão de execução. Todas as injeções foram feitas com uma taxa de vazão de 100 µl / min. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em HBS a 10 nM e injetados por 240 s no *chip* revestido com Proteína A para captura, seguido pela coinjeção de hemaglutinina H1 California (50 nM) imediatamente seguida pela proteína F do RSV (50 nM) para um total de 110 s. Um canal do *chip* foi injetado com HBS e usado como referência para a análise. Cada interação de ligação dos anticorpos monoclonais a H1 e proteína F de RSV foi avaliada usando um instrumento ProteONXPR36 (Bio-Rad) e os dados foram processados com o software ProteOn Manager. Os resultados são mostrados na Figura 10. As construções C12 e C13 (portadoras de um domínio específico da proteína F de RSV (VHH ou ScFv)) ligam H1 e proteína F de RSV, enquanto os anticorpos de controle FI174 e MPE8 reconhecem apenas H1 ou apenas a proteína F de RSV, respectivamente.

[00274] Em resumo, os dados mostram que a inserção de domínios VHH ou ScFv na região do cotovelo do FI174 não afetou a ligação à hemaglutina H1, indicando que este sítio é permissivo para inserções de domínios diferentes sem afetar a especificidade original do anticorpo, como já mostrado acima para os domínios similares a Ig. O reconhecimento simultâneo duplo dos dois抗ígenos específicos diferentes pela região VDJ da estrutura de anticorpo e os domínios VHH ou ScFv inseridos no cotovelo indica que é possível gerar anticorpos funcionais e biespecíficos que transportam diferentes tipos de inserções no cotovelo.

**TABELA DE SEQUÊNCIAS E NÚMEROS DE SEQ ID (LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS):**

SEQ ID NO	Sequência	Comentários
SEQ ID NO: 1	QLQLVQSGTEVKPGASVKVCKSSGYVFTSYY LVWVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQ GRVTVTTDASTNTVDMELRSLRSEDTAVYYCAR GPRSKPPYLYFALDWGQGTAVTVSS	GCE536 VH aa
SEQ ID NO: 2	EIVLTQSPGTLSLSPGETAILSCRASQS VSSLLA WYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIRGRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFVLYYCQHYGSRVTFGQGT KLEIK	GCE536 VL aa
SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVT VSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF N WYV DGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWE SNGQ PEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRW QQGN VF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Região aa constante de IgG1 HC humana
SEQ ID NO: 4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFY PR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STY SL SSTL TL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	Região aa constante kappa LC humana
SEQ ID NO: 5	QVQLAQYGGGA VQPGGSLRLSCV VSGFR FSL YG IH WVRQAPGK GLEWL SLIENHGRKI YYAESVKGRI TVSRDNFKNVAYLEM YRLSTEDTAI YYCARNDGL GRYTDAGGTHRTAYLDYWG RGT LTVSS	C1 VH aa
SEQ ID NO: 6	SYEV TQPPSVS VSPGQAARITCSGDEL PRTDISW YQQTSGQAPVLVIYEGTKRPSGIPERFSGVSGA MATLMISEA QLEDEGDYYCFSIDTSGNHGGAF GT GTKLTVL	C1 VL aa
SEQ ID NO: 7	GQP KAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV A PTECS	Região aa constante lambda LC humana

SEQ ID NO: 8	DVQLVESGGVVRPGVSLRLSCVASGFSFKNYD MAWVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVK GRFLISRDHAKDSLQLQMSRLRAEDTALYYCARD PGYNTGRDHPYDLWGQGTMVTVSS	C1b VH aa
SEQ ID NO: 9	DIQMTQSPTLSASVGDRVITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLGSGVPSRFGSGS GTQFTLTSSLQPDDFATYYCQQYNNYPYTFGQG TKLEIK	C1b VL aa
SEQ ID NO: 10	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYAL SWVRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGR VTINADESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYY ESRFDYWGQGTLTVSS	FI174 VH aa
SEQ ID NO: 11	EIVLTQSPGTLSLSPGARATLSCRASQSVSSSLA WYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGDSRKTFGQG TKVEIK	FI174 VL aa
SEQ ID NO: 12	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERERSRSTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	Fragmneto aa de LAIR1 não mutado
SEQ ID NO: 13	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERERNYLYSDTEDVSQTSPSEARFRIDSVN AGNAGLFRCIYYKSRKWSEQSDYLELVVK	Fragmneto aa de LAIR1 mutado
SEQ ID NO: 14	DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPPEDRSQPGQD CRFRVTQLPNRDFHMSVVRARRNDSGYLCGA ISLAPKAQIKESLRAELRVT	Fragmneto aa de PD-1
SEQ ID NO: 15	EQVSTPEIKVLNKIQENGCTLILGCTVEKGDHVA YSWSEKAGTHPLNPANSSHLLSLGPQHADNIYI CTVSNPISNNSQTFSPWPGCRTDPS	Fragmneto aa de SLAM
SEQ ID NO: 16	MAQVQLVESGGGLVQAGGSLTLSACAAGSTSRS YALGWFRQAPGKEREFAHVQTAEFAQGRFTI SRDFAKNTVSLQMNDLKSDDTAIYYCVASN RGW SPSRVSYWGQGTQTVSS	T3-VHH aa

SEQ ID NO: 17	QITLKESGPTLVKPTQTLTCTSGFSLSTSRVG VGWIRQPPGKALEWLSLIYWDDKEHYSPSLKNRV TISKDSSKNQVVLTDMDPVTGTYCAHRGV <b>TSGWGFDYWGQGALTVSSGGGSGGGSGG</b> <b>GGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCSGAGSDVG</b> GHNFVSWYQQYPGKAPKLMYDVKNRPSGVSYR FSGSKSGYTASLTISGLQAEDAEATYFCSSYSSSST LIIFGGGTRLTVL	TT39.7-scFv aa
SEQ ID NO: 18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYYI GWFRQAPGKEREAVSCISGSSGSTYYPDSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATIRSS SWGGCVHYGMDYWGKGTQTVSS	F4-VHH aa
SEQ ID NO: 19	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISASSSYSDYADSAKG RFTISRDNAKTSFLQMNSLRaedTAIYFCARARA TGYSITPYFDIWGQGTLTVSSGGGSGGGS <b>GGGGSQSVTQPPSVGAPQRVTISCTGSSSN</b> IGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNNRPSGVPD RFSASKSGTSASLAITGLQAEDAEADYYCQSYDRN LSGVFGTGTKVTVL	MPE8-scFv aa
SEQ ID NO: 20	SAWSHPQFEKGGGGGGGGSAWSHPQFEK	Marcador aa de Strep Duplo
SEQ ID NO: 21	GLNDIFEAQKIEWHE	AviTag
SEQ ID NO: 22	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	Marcador de Calmodulina
SEQ ID NO: 23	EEEEEE	Marcador de poliglutamato tag
SEQ ID NO: 24	GAPVPYPDPLEPR	Marcador E
SEQ ID NO: 25	DYKDDDDK	Marcador FLAG
SEQ ID NO: 26	YPYDVPDYA	Marcador HA
SEQ ID NO: 27	HHHHHH	Marcador His
SEQ ID NO: 28	EQKLISEEDL	Marcador Myc
SEQ ID NO: 29	TKENPRSNQEESYDDNES	Marcador NE

SEQ ID NO: 30	KETAAAKFERQHMDS	Marcador S
SEQ ID NO: 31	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHP QQQREP	Marcador SBP
SEQ ID NO: 32	SLAELLNAGLGGS	Marcador Soft 1
SEQ ID NO: 33	TQDPSRVG	Marcador Soft 3
SEQ ID NO: 34	WSHPQFEK	Marcador Strep
SEQ ID NO: 35	CCPGCC	Marcador TC
SEQ ID NO: 36	GKPIPPLLGLDST	Marcador V5
SEQ ID NO: 37	YTDIEMNRLGK	Marcador VSV
SEQ ID NO: 38	DLYDDDDK	Marcador Xpress
SEQ ID NO: 39	TDKDMTITFTNKKDAE	Marcador Isopep
SEQ ID NO: 40	AHIVMVDAYKPTK	Marcador Spy
SEQ ID NO: 41	KLGDIEFIKVNK	Marcador Snoop
SEQ ID NO: 42	EVHTNQDPLD	Marcador Ty1
SEQ ID NO: 43	GGGGS	Ligante
SEQ ID NO: 44	GGGGSGGGGS	Ligante
SEQ ID NO: 45	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	Ligante
SEQ ID NO: 46	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	Ligante
SEQ ID NO: 47	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	Ligante
SEQ ID NO: 48	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	Ligante
SEQ ID NO: 49	FVGPPSPFLTLSLHLS	Ligante
SEQ ID NO: 50	GAASEAPGQGLAEPV	Ligante
SEQ ID NO: 51	QGFTSVMAPFLPLLT	Ligante
SEQ ID NO: 52	GEYTGGSLCATLMSM	Ligante

SEQ ID NO: 53	QVQLAQYGGGAVQPGGSLRLSCVSGFRFSLYGIHWVRQAPGKGLEWLSLIENHGRKIYYAESVKGRTVSRDNFKNVAYLEMYRLSTEDTAIYYCARNDGLGRYTDAGGTHRTAYLDYWGRGTLTVSSEDLPRPSISAEPGTIVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERERNYLYSDTEDVSQTSPSESEARFRIDSVNAGNAGLFRCIYYKSRKWSEQSDYLELVVKASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C2
SEQ ID NO: 54	SYEVQTQPPSVSPGQAARITCSGDELPTDISWYQQTSGQAPVLVIYEGTKRPGSIPEFSGVSGAMATLMISEAQLEDEGDYYCFSIDTSGNHGGAFGTGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	Cadeia Leve aa de C2/C3

SEQ ID NO: 55	QVQLAQYGGAVQPGGSLRLSCVSGFRFSLY GIHWVRQAPGKGLEWLSLIENHGRKIYYAESVKG RITVSRDNFKNVAYLEMYRLSTEDTAIYYCARND GLGRYTDAGGTHRTAYLDYWGRGTLTVSSEDL PRPSISAEPGTIVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRL ERESRSTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVSE GNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVKASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C3
SEQ ID NO: 56	QLQLVQSGTEVKPGASVKVSCKSSGYVFTSYY LVWVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQ GRVTVTTDASTNTVDMELRSLRSEDTAVYYCAR GPRSKPPYLYFALDWGQGTAVTVSSEDLPRPSI SAEPMGTIVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERESR STYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVKASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C4

SEQ ID NO: 57	EIVLTQSPGTLSSLSPGETAILSCRASQSVSSLLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIRGRFSGSGSGTDFLTISRLPEDFVLYYCQHYGSRVTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Cadeia Leve aa de C4/C5/C6
SEQ ID NO: 58	QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYLVWVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVTVTTDASTNTVDMELRSLRSEDTAVYYCARGPRSKPPYLYFALDWGQGTAVTVSSDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C5

SEQ ID NO: 59	QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYL VVVRQAPGQGLEWMATISPQGDVNNTSYEQRFQG RVTVTTDASTNTVDMELRSLRSEDTAVYYCARGP RSKPPYLYFALDVWGQGTAVTVSSFGPPSPFLT SLHLSDSPDRPNPPTFSPALLVTEGDNATFTC SFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSG TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTA GLAEPVASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP RVEPKSCDKTHTCP KDTLMISRTPEVTCVV VEVHN NGKEY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG NGQPENNYKT QQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C5b
---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------

SEQ ID NO: 60	QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYL VVVRQAPGQGLEWMATISP GDVNNTSYEQRFQG RVT VTTDASTNTVDMELRSLRSEDTAVYYCARGP RSKPPYLYFALDVWGQGTAVTVSSFVGPPSPFLT SLHLSDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTC SFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNRDFHMSVVRARRNDSG TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTA GLAEPVASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP RVEPKSCDKTHTCP KDTLMISRTPEVTCVV VEVHN NGKEY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG NGQPENNYKT QQGNVFCS Cadeia Pesada aa de C6
---------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SEQ ID NO: 61	QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYY LVWVRQAPGQGLEWMATISPQGDVNNTSYEQRFQ GRVTVTTDASTNTVDMELRSLRSEDTAVYYCAR GPRSKPPYLYFALDWGQGTAVTVSSQGFTSVM APFLPLLTEQVSTPEIKVLNKTQENGTCCTLILGCT VEKGDHVAYSWSEKAGTHPLNPANSSHLLSLTL GPQHADNIYICTVSNPISNNSQTFSPWPGCRTDP SGEYTGGSLCATLMSMASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPCPAPEL LGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C6b
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------

SEQ ID NO: 62	DVQLVESGGVVPGVSLRLSCVASGFSFKNYD MAWVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVK GRFLISRDHAKDSLQLQMSRLRAEDTALYYCARD PGYNTGRDHPYDLWGQGTMVTVSSDSPDRPW NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVT QLPNNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPK AQIKESLRAELRVTAStKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C7
SEQ ID NO: 63	DIQMTQSPTLSASVGDRVITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLGGSGVPSRFSGSGS GTQFTLTISLQPDDFATYYCQQYNNPYTFGQQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	Cadeia Leve aa de C7/C8/C9

SEQ ID NO: 64	DVQLVESGGVVRPGVSLRLSCVASGFSFKNYD MAWVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVK GRFLISRDHAKDSLTLQMSRLRAEDTALYYCARD PGYNTGRDHPYDLWGQGTMVTVSSEQVSTPEIK VLNKTQENGTCCTLILGCTVEKGDHVAYSWSEKAG THPLNPANSSHLLSLTLPQHADNIYICTVSNPISN NSQTFSWPWGCRTDPSASTKGPSVFLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	Cadeia Pesada aa de C8
SEQ ID NO: 65	DVQLVESGGVVRPGVSLRLSCVASGFSFKNYD MAWVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVK GRFLISRDHAKDSLTLQMSRLRAEDTALYYCARD PGYNTGRDHPYDLWGQGTMVTSSAWSHPQF EKGGGSGGSGGSAWSHPQFEKASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C9

SEQ ID NO: 66	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYAL SWVRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGR VTINADESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATY YESRFDYWGGQGTLTVSSMAQVQLVESGGLV QAGGSCTLSCAASGSTSRSYALGWFRQAPGKE REFVAHVGQTAEFAQGRFTISRDFAKNTVSLQM NDLKSDDTAIYYCVASN RGWSPSRVSYWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWN SGALTSGVHTFP AVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPK PKDTLMISRTP EVC VV DVSHEDPEV KFNWYV DGVEVHN A KTKPREEQYN STYRVV S VLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPEN NYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	Cadeia Pesada aa de C10
SEQ ID NO: 67	EIVLTQSPGTLSSLPGARATLSCRASQSVSSSSL AWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGD SRKT FGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	Cadeia Leve aa de C10/C11/C12/ C13

SEQ ID NO: 68	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYAL SWVRQAPGQQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGR VTINADESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATY YESRFDYWGGQGTLTVSSQITLKESGPTLVKPTQ TLLTCTFSGFSLSTSRTVGVGWIRQPPGKALEWL SLIYWDDEKHYSPLKNRVTISKDSSKNQVVLTLT DMDPVDTGTYYCAHRGVDTSGWGFDYWQGA LTVSSGGGGSGGGGSQALTQPASVS GSPGQSITISCGAGSDVGGHNFVSWYQQYPGK APKLMIYDVKNRPSGVSYRFSGSKSGYTASLTIS GLQAEDEAATYFCSSYSSSTLIIFGGGTRLTVLAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVV TVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C11
---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------

SEQ ID NO: 69	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYAL SWVRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGR VTINADESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYY ESRFDYWGQGTLTVSSQVQLQESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTLDYYYIGWFRQAPGKEREAVS CISGSSGSTYYPDSDKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCATIRSSSWGGCVHYGMDYWG KGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C12
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------

SEQ ID NO: 70	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYAL SWVRQAPGQQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGR VTINADESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATY YESRFDYWGGQGTLTVSSEVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISASSSYSDYADSAKGRFTISRDNAKTSLF LQMNSLRAEDTAIYFCARARATGYSSITPYFDIW GQGTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGSQSVVTQ PPSVAAPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIYDNNNRPSGVPDFSASKSGTSA SLAITGLQAEDEADEADYYCQSYDRNLSGVFGTGTKV TVLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKD YFPEPVTVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKD TLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREGQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Cadeia Pesada aa de C13
SEQ ID NO: 71	QVQLQESGPLVKPSGTLSTCAVSGGSISSN WWSWVRQPPGKGLEWIGEIYHSGSTNYNPSLK SRVTISVDKSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARA SPLKSQRDTEDLPRPSISAEPGTIVIPLGSHVTFVC RGPGVGQTFRLERESRSTYNDTEDVSQASPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYL ELLVKGEDVTWALPQSQLDPRACCPQGELPISTD YYMDVWGKGTTVTVSS	MGD <sup>UCA</sup> VH aa
SEQ ID NO: 72	AIRMTQSPSSFSASTGDRVТИCRASQGISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASLQLSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISCLQSEDFAFYCCQQYYSYPPDFGQQ TRLEIK	MGD <sup>UCA</sup> VL aa

SEQ ID NO: 73	QVQLIQSGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MSWIRQVPGKGLEWISVISATTGYTDYADSVKGR FTISRDNAKNSVFLQMNSLRVDDMAVYYCAREV LGTAWFDYWQGQGTLVTISS	TT107 VH aa
SEQ ID NO: 74	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSNTSNYL AWYQQKPGQAPRLLIYGVSRRATGIPDRFSGSG SGTDFALTISRLEPEDFAVYYCQQYRSSPRTFGP GTKVEFK	TT107 VL aa
SEQ ID NO: 75	EVQLVESGGVVPRGESLRLSCAASGFIFNDFGM NWVRQPPGRGLEWVAGIKWRGGVALVPSVTG RFTISGDNDKNSLYLQMTRLDEDTAVYYCARDES GFRGGRGHAFDLWGQGTMTISAEDLPRPSISAE PGTVIPLGSHVTFCRGPVGVHTFRLERESRSTY NETEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAGPYRCI YYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ1 VH
SEQ ID NO: 76	EVQVVESGGRVARPQGGSLRLSCAASGFHLDYD MSWVRQPPGRGLEWVAGINWNGGRTGYADSVK GRLTISRDNAKKFLYLEMKSLRAEDTALYYCARDP GYSSGRRNALDIWGQGTMTVSLEDLPRPSISAE PGTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRFTY NDTEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAGPYRCI YYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ2 VH
SEQ ID NO: 77	EVQLVQSGGGVVPRGGFLRLSCAASGFTFENYA VAWVRQVAGKGLEWLCVINWDAGTTNYADSVKG RFTISRDIVKNSLVLEMSSLRAEDTALYYCARDPV YGSDRGDVFDMWGQGTVVTVSSDLPRPSISAE GTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRSTYN ETEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAGPYRCIY YKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ3 VH

SEQ ID NO: 78	DVQLVESGGVVRPGESLRLSCVASGFSFKNYD MAWVRQVPGKGLEWCGINWNGSLRGYADSVK GRFLISRDHAKDSLQLQMSRLRAEDTALYYCARD PGYNTGRDHPYDLWGQQGTMVTVSSEDLPRPSIS AEPGTIVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRS TYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYR CIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ5 VH
SEQ ID NO: 79	EVQLVESGGRVVRPGESLRLSCEVSGVSINDYDM SWVRQPLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVKGR FTISRDHAKNSLYLQMNSLTGDDTAFYCYCVRDPG ESSGRGHIFNIWGQQGTMVTVSLEDLPRPSISAEP GTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRSTYN ETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIY YKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ1 VH
SEQ ID NO: 80	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYD MSWVRQFLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDTSGRGHIFNVWGQQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTIVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ2 VH
SEQ ID NO: 81	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYD MSWVRQPLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDNNGKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDRSGRGHIFNIWGQQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTIVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ5 VH

SEQ ID NO: 82	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVSINDYD MSWVRQPLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDSSGRGQIFNIWGQQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ6 VH
SEQ ID NO: 83	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVSINDYD MSWVRQRLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGESSGRGHIFNIWGQQGTMVTISLEDLPRPSISAE PGTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRSTY NETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCI YYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ7 VH
SEQ ID NO: 84	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYD MSWVRQFLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDTSGRGHIFNVWGQQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ8 VH
SEQ ID NO: 85	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYD MSWVRQFLGKGLEWVSGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDTSGRGHIFNVWGQQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTVIPLGSHVTFCRGPVGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ10 VH

SEQ ID NO: 86	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYD MSWVRQFLGKGLEWVGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDTSGRGHIFNVWQQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLGK	MMJ16 VH
SEQ ID NO: 87	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYD MSWVRQPLGKGLEWVGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDNGKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRD PGDRSGRGHIFNIWGQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ23 VH
SEQ ID NO: 88	EVQLVESGGVVRPGESLRLSCEVSGVSINDYD MSWVRQPLGKGLEWVGIDRKGVGTGYADSVK GRFTISRDHAKNSLYLQMNSLRGADTALYYCVRD PGDSSGRGHIFNIWGQGTMVTVSLEDLPRPSISA EPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERESRST YNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRC IYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ25 VH
SEQ ID NO: 89	QVQLAQYGGGAVQPQGGSLRLSCVSGFRFSLYG IHWVRQAPGKGLEWLSLIENHGRKIYYAESVKGRI TVSRDNFKNVAYLEMYRLSTEDTAIYYCARNDGL GRYTDAGGTHRTAYLDYWGRGTLTVSSEDLPR PSISAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERE SRSTYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAG PYRCVYYKPPKWSEQSDYLDLLVK	MGM1 VH

SEQ ID NO: 90	QVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAVSGFKFNIYDI HWVRQAPGKGLEWVSFIRHDGNQYEADSVKG RFTISRDNFKNIIDLQMHSRLTEDTALYYCATNQG SGGSDDTWETNRSAFFPHWGQGTLTVSSDLPR PSISAEPGTIVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERE SRSIYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAG PYRCVYYKPPKWSEESDYLELLVK	MGM3 VH
SEQ ID NO: 91	QVQLVESGGVVQPGGSLRLSCEVSGFRFSTYGI HWARQAPGKGLEWVAFIRYDGNNKSYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRIEDTAVYYCAKNQAS GGYDDTWGTYRSAYLDYWGQGTLTVSSEDLPR PSISAEPGTIVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLERE SRSTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAG PYRCVYYKPPKWSEESDSLELLVK	MGM4 VH
SEQ ID NO: 92	QVQLVESGGVVQPGGSLRLSCMSGFKFSAFG IHWVRQAPGKGLEWVAFVRYDGGDKYYADSVKG RFTISRDNSKNTVHLQLNSLPADTA VYYCAKNQ PSGQSDDTWGTSLSAYLDYWGQGTQVS VS PEDL PRPSISAEPGTIVIPLGSHVTFCRGPGVQTFRLE RESRSTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVSEGN AGPYRCVYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGM5 VH
SEQ ID NO: 93	EAQVVDHGNRGRARDLED <span style="background-color: yellow;">IKRRARDLEYEDLPR</span> PSISAEPGTIVIPL PSISAEPGTIVIPLGSRVTFCRGPGVQTFRLERE SRSKYNETEDVSQASPSEARFRIDSVSEGNAG PYRCIYYKPPKWSEHSDFLELLVK	MGB2 VH
SEQ ID NO: 94	VAEVEEHINKRRARDLEYEDLPRPSISAEPGTIVIPL GSHVTFCRGPGVQTFRLERE RSRKYNETEDV SQTPSEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKTPK WSEQSDFLELLVK	MGB43 VH

SEQ ID NO: 95	EAEVVEHVNKRRALEAYEDLPRPSIAEPGTVIP LGSHTFVCRGPVGQTFRLERESRSRYTETEDV SQTSPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCLYYKPPK WSEQSDFLELLVK	MGB47 VH
SEQ ID NO: 96	DFQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQNVNTWLA WYQQAAGKAPKLLIYEASTLQSGVPSRFRGGGS GTEFTLTISLQPEDFATYYCHQYKSHPFTFGPGT KVDVR	MGJ1 VL
SEQ ID NO: 97	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQTISSWLA WYQQKPGKAPKFLIYKASFLENGVPSRFSGSESG TEFTLTINSLQPDDFATYYCQQYKSYPFTFGPGTK VEIK	MGJ2 VL
SEQ ID NO: 98	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITFCGASQSITDCLA WYQQKPGKDPKLLIYKASRLEAGVPARFSASGSG TEFTFTIRSMQPEDFATYYCQQCYSYPFTFGPGT KVDLK	MGJ3 VL
SEQ ID NO: 99	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLGSJVPSRFSGSGS GTQFTLTISLQPDDFATYYCQQYNNYPYTFGQG TKLEIK	MGJ5 VL
SEQ ID NO: 100	DIQMTQSPSTVSASIGDRVITCRASQIIERSLAWY QQKPGKSPKALIYKTSNLEDGVPSRFSGSGSGTD FTLTVSSLQPDDFANYYCQQYDTYPFTFGPGTTV TLR	MMJ1 VL

SEQ ID NO: 101	DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQVIDRSLAW FQQKPGKSPRPLIYKASTLEGGVPSRFSGSGSGT DFTLTВSSLQPDDFANYYCQQYDTYPFTFGPGTT VTLR	MMJ5 VL
SEQ ID NO: 102	DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQIIHRSLAWY QQKPGKSPRALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTD FTLTВSSLQPDDFAMYYCQQYDTYPFTFGPGTTV TLR	MMJ6 VL
SEQ ID NO: 103	DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQSIDRSLAW YQQKPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGT DFTLTВSSLQPDDFADYYCQQYDTYPFTFGPGTT VTLR	MMJ7 VL
SEQ ID NO: 104	DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQIIDRSLAWY QQKPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTD FTLTВSSLQPDDFANYYCQQYDTYPFTFGPGTTV TLR	MMJ8 VL
SEQ ID NO: 105	DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQIIDRSLAWY QQKPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTD FTLTВSSLQPDDFANYYCQQYDTYPFTFGPGTTV TLR	MMJ10 VL
SEQ ID NO: 106	DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQIIDRSLAWY QQKPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTD FTLTВSSLQPDDFANYYCQQYDTYPFTFGPGTTV TLR	MMJ16 VL

SEQ 107	ID NO: DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQVIDRSLAW FQQKPGKSPRPLIYKASTLEGGVPSRFSGSGSGT DFTLTВSSLQPDDFANYYCQQYDTYPFTFGPGTT VTLR	MMJ23 VL
SEQ 108	ID NO: DIQMTQSPSTLSASIGDRVТИCRASQNIDRSLAW YQQKPGKSPKALIYKASNLEDGVPSRFSGSGSGT DFTLTВSSLQPDDFALYYCQQYDTYPFTFGPGTT VTLR	MMJ25 VL
SEQ 109	ID NO: SYEVТQPPSVSVPQQAARITCSGDELPRTDISW YQQTSGQAPVLVIYEGTKRPSGIPERFSGSVSGA MATLMISEAQLEDEGDYYCFSIDTSGNHGGAFGT GTKLTVL	MGM1 VL
SEQ 110	ID NO: SYELIQPPSXSVSPGQTARITCSGEPLPRTSTS WY RQKSGQAPVLIIYEVSKRPSGIPERXSGSNTG TKA TLFIVGAQVEDEGDYYCYSTNTSGGSRGAFGTGT SLTVL	MGM3 VL
SEQ 111	ID NO: SYELTQPPSVSVPQQTARITCSGDAVPNTYTYW YQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGT MATFIISGAQVEDEADYYCYSTDTSDDHRGAFGT GTKVTVL	MGM4 VL
SEQ 112	ID NO: SYELTQPPSVSVPQQTARITCSGDALPRTFIYWY QQKSRQAPVVVIYEDVKRPSGIPERFSGSISGTQA TLIITGAQVEDEADYYCYSTDNNTHRGAFGTGT VTVL	MGM5 VL
SEQ 113	ID NO: EDLPRPSISAEPGTIVIPLGSHVTFCRGPGVHTF RLERESRSTYNETEDVSQASPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ1 LAIR1

SEQ ID NO: 114	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRFTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ2 LAIR1
SEQ ID NO: 115	DLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF LERESRSTYNATEDVSQASPSEARFRIDSVSE GNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ3 LAIR1
SEQ ID NO: 116	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNATEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ5 LAIR1
SEQ ID NO: 117	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNATEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ1 LAIR1
SEQ ID NO: 118	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNATEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ2 LAIR1
SEQ ID NO: 119	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNATEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ5 LAIR1
SEQ ID NO: 120	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNATEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ6 LAIR1
SEQ ID NO: 121	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNATEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ7 LAIR1

SEQ ID NO: 122	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNETEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ8 LAIR1
SEQ ID NO: 123	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNETEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ10 LAIR1
SEQ ID NO: 124	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNETEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLGK	MMJ16 LAIR1
SEQ ID NO: 125	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNETEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ23 LAIR1
SEQ ID NO: 126	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNETEDVSQVSPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ25 LAIR1
SEQ ID NO: 127	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCVYYKPPKWSEQSDYLDLLVK	MGM1 LAIR1
SEQ ID NO: 128	DLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF LERESRSIYNDTEDVSQASPSEARFRIDSSEG NAGPYRCVYYKPPKWSEESDYLELLVK	MGM3 LAIR1
SEQ ID NO: 129	EDLPRPSIAEPGTVIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNDTEDVSQASPSEARFRIDSVS EGNAGPYRCVYYKPPKWSEESDSLELLVK	MGM4 LAIR1

SEQ ID NO: 130	EDLPRPSISAEPGTIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSTYNDTEDVSQASPSEEARFRIDSVS EGNAGPYRCVYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGM5 LAIR1
SEQ ID NO: 131	EDLPRPSISAEPGTIPLGSRVTFCRGPVGQTF RLERESRSKYNETEDVSQASPSEEARFRIDSVS EGNAGPYRCIYYKPPKWSEHSDFLELLVK	MGB2 LAIR1
SEQ ID NO: 132	EDLPRPSISAEPGTIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSRYNETEDVSQTSPSEEARFRIDSVS EGNAGPYRCLYYKTPKWSEQSDFLELLVK	MGB43 LAIR1
SEQ ID NO: 133	EDLPRPSISAEPGTIPLGSHVTFCRGPGVQTF RLERESRSRYTETEDVSQTSPSEEARFRIDSVS EGNAGPYRCLYYKPPKWSEQSDFLELLVK	MGB47 LAIR1

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo,

em que a referida primeira cadeia de polipeptídeo compreende na direção terminal N a C

(i) um ou mais domínios variáveis;

(ii) um domínio funcional; e

(iii) um ou mais domínios constantes; e

em que a referida segunda cadeia de polipeptídeo compreende na direção terminal N a C

(iv) um ou mais domínios variáveis formando sítios de ligação ao antígeno com o um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo;

(v) opcionalmente, um domínio funcional; e

(vi) um ou mais domínios constantes,

e que o referido domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo não compreende um fragmento da segunda cadeia de polipeptídeo e o referido domínio funcional opcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo não compreende um fragmento da primeira cadeia de polipeptídeo.

2. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a segunda cadeia de polipeptídeo não compreende domínio funcional (v) e em que o C-terminal do domínio variável mais C-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo é diretamente acoplado à N-terminal do domínio constante mais N-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo.

3. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo,

em que a referida primeira cadeia de polipeptídeo compreende na direção terminal N a C

- (i) um ou mais domínios variáveis;
- (ii) um domínio funcional e
- (iii) um ou mais domínios constantes; e

em que a referida segunda cadeia de polipeptídeo compreende na direção terminal N a C

(iv) um ou mais domínios variáveis formando sítios de ligação ao antígeno com o um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo; e

- (v) um ou mais domínios constantes,

em que o C-terminal do domínio variável mais C-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo é diretamente acoplado à N-terminal do domínio constante mais N-terminal da segunda cadeia de polipeptídeo.

4. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que

(a) o um ou mais domínios constantes da primeira cadeia de polipeptídeo é / são domínios constantes de cadeia pesada compreendendo pelo menos um domínio constante CH1, o um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo é / são domínios variáveis de cadeia pesada VH, o domínio constante da segunda cadeia de polipeptídeo é um domínio constante da cadeia leve CL e o um ou mais domínios variáveis da segunda cadeia de polipeptídeo é / são domínios variáveis da cadeia leve VL; ou

(b) os domínios constantes da primeira cadeia de polipeptídeo são um domínio constante da cadeia leve CL, o um ou mais domínios variáveis da primeira cadeia de polipeptídeo é / são domínios variáveis da cadeia leve VL, o um ou mais domínios constantes da segunda cadeia de polipeptídeo é / são domínios constantes de cadeia

pesada compreendendo pelo menos um domínio constante CH1 e o um ou mais domínios variáveis da segunda cadeia de polipeptídeo é / são domínios variáveis de cadeia pesada VH.

5. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o domínio CH1 e, opcionalmente, qualquer outro domínio constante de cadeia pesada, é selecionado das seguintes classes:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$ ; de preferência, como IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

6. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o domínio CL é selecionado dentre as seguintes classes:  $\kappa$  e  $\lambda$ .

7. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é um anticorpo recombinante ou fragmento de ligação a antígeno.

8. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo não são um ligante, em particular um ligante não GS.

9. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um domínio similar a Ig.

10. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o domínio similar a Ig é selecionado do(s) domínio(s) similares a Ig de PD1, SLAM, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD33, CD80 ou

CD86, preferivelmente CD4.

11. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um domínio veículo, um domínio-repórter, um marcador, um domínio de localização, um sítio de ligação (independente), uma enzima ou um domínio enzimático, um receptor ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ligante ou um fragmento funcional do mesmo.

12. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um domínio veículo.

13. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o domínio veículo fornece conjugação do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo a um medicamento ou a um agente de imageamento.

14. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um domínio-repórter.

15. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o domínio-repórter compreende ou consiste em uma sequência de aminoácido que codifica GFP, YFP, RFP, CFP, luciferase, betagalactosidase ou peroxidase.

16. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um domínio de localização.

17. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em uma enzima ou domínio enzimático, tal como um domínio catalítico.

18. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um marcador.

19. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o marcador é um marcador de afinidade, um marcador de solubilização, um marcador de cromatografia, um marcador de epítopo ou um marcador de fluorescência.

20. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um receptor ou um fragmento funcional do mesmo, por exemplo, um domínio similar a Ig de um receptor.

21. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional compreende ou consiste em (i) um receptor

selecionado do grupo que consiste em PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS ou CD28, ou (ii) um fragmento funcional de um receptor, como um domínio similar a Ig, de qualquer um dos seguintes receptores: PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS ou CD28.

22. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um ligante ou um fragmento funcional do mesmo.

23. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante é uma citocina e / ou um ligante de PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS ou CD28.

24. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante é selecionado do grupo que consiste em PD-L1, PD-L2, B7-1, B7-2, B7-H4 (homólogo B7), galectina-9, receptor de poliovírus (PVR), glicoproteína de membrana OX-2, CD48, B7-H3 (homólogo de B7), MHCI, ICOS-L.

25. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante é selecionado do grupo que consiste na família de citocinas SIS, na família de citocinas SIG, na família de citocinas SCY, a superfamília de fator 4 de plaquetas e intercrinas, ligantes de quimiocina CC (CCL)-1 a -28, CXCL1 - CXCL17, XCL1 (linfotactina- $\alpha$ ) e XCL2 (linfotactina- $\beta$ ), fractalquina (ou CX<sub>3</sub>CL1); interferons, tais como IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III, em particular IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN-

ε, IFN-κ, IFN-ω, IL10R2 (também chamado de CRF2-4) e IFNLR1 (também chamado de CRF2-12); interleucinas, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35 e IL-36; linfocinas, tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF e Interferon-gama; fatores de necrose tumoral, tais como CD40LG (TNFSF5); CD70 (TNFSF7); EDA; FASLG (TNFSF6); LTA (TNFSF1); LTB (TNFSF3); TNF, TNFa, TNFSF4 (OX40L); TNFSF8 (CD153); TNFSF9; TNFSF10 (TRILHA); TNFSF11 (RANKL); TNFSF12 (TWEAK); TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15; e TNFSF18; e fatores estimuladores de colônias, tais como CSF1 (fator estimulador de colônias de macrófagos), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), bem como CSFs sintéticos, como Promegapoitina.

26. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional (ii) da primeira cadeia de polipeptídeo e / ou o domínio funcional (v) da segunda cadeia de polipeptídeo compreendem ou consistem em um sítio de ligação (independente).

27. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o sítio de ligação (independente) compreende ou consiste em um receptor ou um fragmento funcional do mesmo compreendendo um sítio de ligação, um ligante ou um fragmento funcional do mesmo compreendendo uma ligação local, uma molécula de CD ou um fragmento funcional do mesmo, um anticorpo de cadeia única ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, um antígeno ou um fragmento funcional do mesmo ou um marcador compreendendo um sítio de ligação.

28. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do

mesmo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o sítio de ligação (independente) compreende ou consiste em um anticorpo de cadeia única (como scFv ou VHH) ou um fragmento de ligação a antígeno, ou um antígeno ou um fragmento funcional do mesmo.

29. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional compreende ou consiste em um domínio similar a Ig, um scFv, um VHH ou um marcador de Strep.

30. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o domínio funcional compreende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 13 a 20, ou uma variante de sequência funcional do mesmo tendo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

31. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende um único domínio variável (i) terminal N do domínio funcional (ii) e a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um único domínio variável (iv) terminal N do domínio funcional opcional (v) ou terminal N do um ou mais domínios constantes (vi), o único domínio variável (iv) da segunda cadeia de polipeptídeo formando um antígeno sítio de ligação com o domínio variável (i) da primeira cadeia de polipeptídeo.

32. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30,

caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende dois ou mais domínios variáveis (i) terminal N do domínio funcional (ii) e a segunda cadeia de polipeptídeo compreende dois ou mais domínios variáveis (iv) terminal N do domínio funcional opcional (v) ou terminal N do um ou mais domínios constantes (vi), os dois ou mais domínios variáveis (iv) da segunda cadeia de polipeptídeo formando sítios de ligação ao antígeno com os dois ou mais domínios variáveis (i) da primeira cadeia de polipeptídeo.

33. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende um anticorpo de cadeia única, como um scFv ou um anticorpo de domínio único, por exemplo, um VHH, N-terminal do domínio variável mais N-terminal (i) e / ou terminal C do domínio constante mais C-terminal (iii).

34. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizado pelo fato de que a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um anticorpo de cadeia única, como um scFv ou um anticorpo de domínio único, por exemplo, um VHH, N-terminal do domínio variável mais N-terminal (i) e / ou terminal C do domínio constante mais C-terminal (vi).

35. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo compreendem um único domínio constante, em particular um domínio CL e um domínio CH1, respectivamente.

36. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35,

caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um único domínio constante, em particular um domínio CL; e a outra da primeira cadeia de polipeptídeo ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende um domínio CH1 e um ou mais domínios constantes adicionais, como um domínio CH2 e / ou CH3.

37. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende uma fração Fc ou uma região Fc.

38. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreendem um ou mais ligantes.

39. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo não compreendem qualquer ligante.

40. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em V-D-CH1, em que

V é um domínio variável (i);

D é um domínio funcional (ii); e

CH1 é um domínio constante CH1 (iii).

41. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em V-D-CH1-CH2-CH3, em que CH2 e CH3 são um domínio constante CH2 e um domínio constante CH3, respectivamente.

42. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 41, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo comprehende ou consiste em (V)A-D-CH1 com A sendo um número inteiro de 1 a 5, preferivelmente de 1 a 4, mais preferivelmente de 1 a 3 e ainda mais preferivelmente 1 ou 2 e em que os domínios variáveis V podem ser acoplados um ao outro diretamente ou através de um ligante.

43. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, caracterizado pelo fato de que a segunda cadeia de polipeptídeo comprehende ou consiste em V-CL, em que

V é um domínio variável (iv); e

CL é um domínio constante (vi).

44. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a segunda cadeia de polipeptídeo comprehende ou consiste em (V)A-CL com A sendo um número inteiro de 1 a 5, preferivelmente de 1 a 4, mais preferivelmente de 1 a 3 e ainda mais preferivelmente 1 ou 2 e em que os domínios variáveis V podem ser acoplados um ao outro diretamente ou através de um ligante.

45. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, caracterizado pelo fato de que o domínio variável (i) da primeira cadeia de polipeptídeo comprehende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 1, 5, 8 ou 10, ou uma sua variante de sequência funcional do mesmo com pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de sequência identidade.

46. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 45, caracterizado pelo fato de que o domínio variável (iv) da segunda cadeia de polipeptídeo comprehende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 2, 6, 9 ou 11, ou uma variante de sequência funcional da mesma com pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de sequência identidade.

47. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, comprehende uma única ou duas primeiras cadeias de polipeptídeos e uma única ou duas segundas cadeias de polipeptídeos.

48. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo estão ligadas por uma ligação dissulfeto, formando, assim, um par.

49. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo comprehende duas primeiras cadeias de polipeptídeos e duas segundas cadeias de polipeptídeos e em que as duas primeiras cadeias de polipeptídeos e / ou as duas segundas cadeias de polipeptídeos estão ligadas por uma ou mais, tal como duas, ligações dissulfeto.

50. Anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo é bivalente para cada especificidade / antígeno.

51. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo é monovalente para cada especificidade (antígeno).

52. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 50 ou 51, caracterizado pelo fato de que os sítios de ligação a antígeno formados por um ou mais domínios variáveis do primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos e o sítio de ligação ao antígeno(s) formado pelos um ou mais domínios variáveis do segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos são iguais ou distintos.

53. Anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 52, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo comprehende pelo menos dois domínios funcionais, que podem ser iguais ou distintos.

54. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 53, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo comprehende duas primeiras cadeias de polipeptídeos e duas segundas cadeias de polipeptídeos formando um primeiro e um segundo par da primeira e segunda cadeias de polipeptídeos, e em que o primeiro par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos comprehende pelo menos um domínio funcional e / ou o segundo par de primeira e segunda cadeias de polipeptídeos comprehende pelo menos um domínio funcional.

55. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é derivado de um anticorpo similar a IgG, um Fab ou um F(ab)<sub>2</sub>.

56. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, caracterizado pelo fato de que os dois ou mais domínios variáveis (i) e (iv) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo são derivados de um anticorpo monoclonal.

57. Anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, caracterizado pelo fato de que os domínios variáveis e / ou os domínios constantes do anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo são humanos ou humanizados.

58. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, caracterizado pelo fato de que o(s) domínio(s) funcional(ais) do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno dos mesmos compreende(m) ou consiste(m) de uma sequência de aminoácido, que é humana ou humanizada.

59. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 53, 55, 56 , 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 69 ou 70, ou uma variante de sequência funcional com pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo compreende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em

qualquer uma das SEQ ID NOs 54, 57, 63 ou 67, ou uma sua variante de sequência funcional possuindo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade de sequência.

60. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 59, caracterizado pelo fato de que a primeira e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo não compreendem ou consistem em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 75 a 92 ou 96 a 112, de preferência, a primeira e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo não compreende(m) ou consiste(m) em uma sequência de aminoácido, conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 75 a 95, mais preferivelmente, o domínio funcional da primeira e / ou da segunda cadeia de polipeptídeo não compreende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 113 a 130, ainda mais preferivelmente, o domínio funcional da primeira e / ou da segunda a cadeia de polipeptídeo não compreende ou consiste em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 113 a 133 e, mais preferivelmente, a primeira e / ou a segunda cadeia de polipeptídeo não compreendem ou consistem em uma sequência de aminoácido conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 75 a 133.

61. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro polinucleotídeo que codifica uma primeira cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60 e / ou um segundo polipeptídeo que codifica a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do

mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60.

62. Molécula de ácido nucleico caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo que codifica a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60.

63. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 61 ou 62, caracterizada pelo fato de que a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA.

64. Vetor caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações 61 a 63.

65. Célula hospedeira caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações 61 a 63 ou o vetor como definido na reivindicação 64.

66. Composição caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60, a molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações 61 a 63, o vetor como definido na reivindicação 64 ou a célula hospedeira como definida na reivindicação 65.

67. Processo para a produção do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) transformar uma célula hospedeira eucariótica através da incorporação de uma ou mais molécula(s) de ácido nucleico, como definida em qualquer uma das reivindicações 61 a 63, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo e uma segunda cadeia de polipeptídeo;

b) cultivar a célula hospedeira sob condições adequadas

para que as referidas moléculas de ácido nucleico sejam expressas;

c) causar ou permitir que as referidas primeira e segunda cadeias de polipeptídeos se combinem para formar o anticorpo, ou fragmento do mesmo de ligação ao antígeno; e

d) opcionalmente, purificar o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, do meio de cultura.

68. Anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, vetor de acordo com a reivindicação 64, célula hospedeira de acordo com a reivindicação 65, ou composição de acordo com a reivindicação 66, caracterizados pelo fato de serem para uso em medicina.

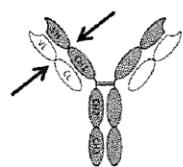
69. Método para prevenir ou tratar uma doença ou distúrbio em um sujeito caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administração do anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60, a molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações 61 a 63, o vetor como definido na reivindicação 64, a célula hospedeira como definida na reivindicação 65 ou a composição como definida na reivindicação 66 ao indivíduo.

70. Ensaio para detectar um antígeno ou para quantificação da ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende:

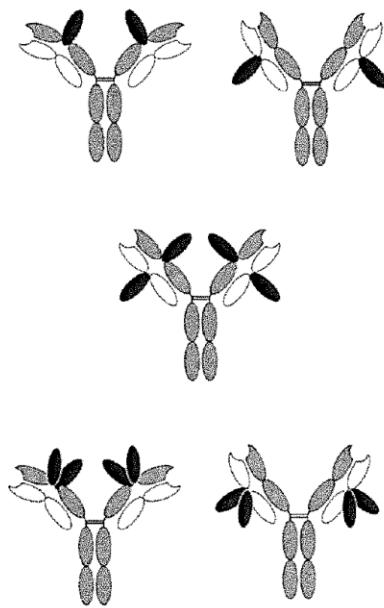
a) incubar um antígeno com o anticorpo, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 60, em condições que permitem a ligação do antígeno ao anticorpo polivalente; e

b) detecção da ligação antígeno-anticorpo.

A) Anticorpo Convencional



B) Novos formatos: IEI-Ig  
(moléculas Ig de inserção no cotovelo)



C) IEI combinado com formatos existentes

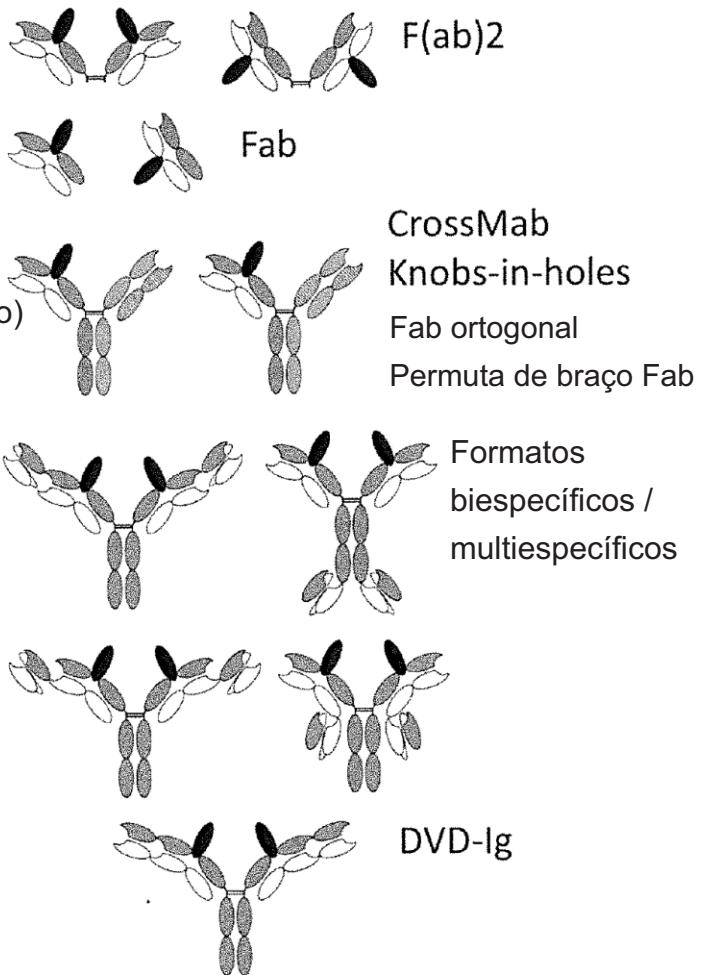


FIG. 1

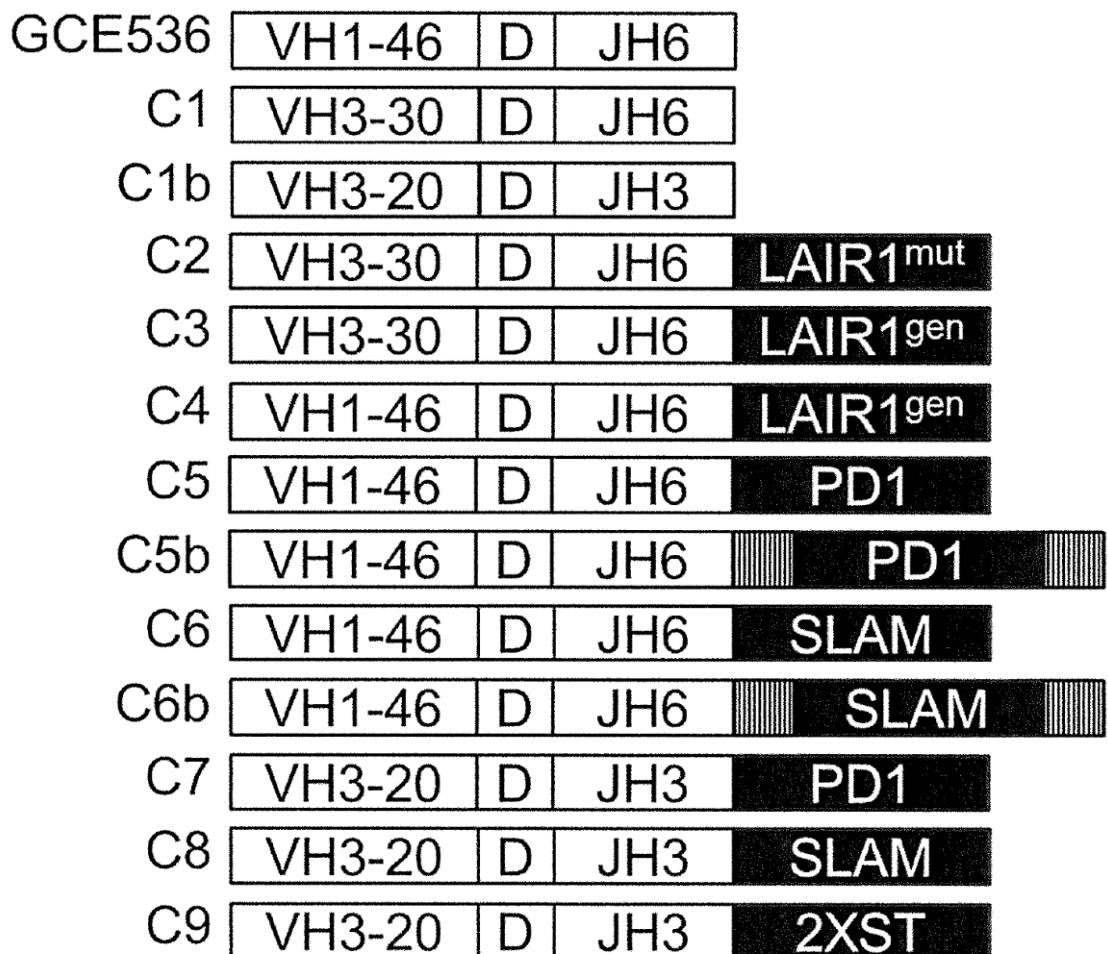


FIG. 2

3/10

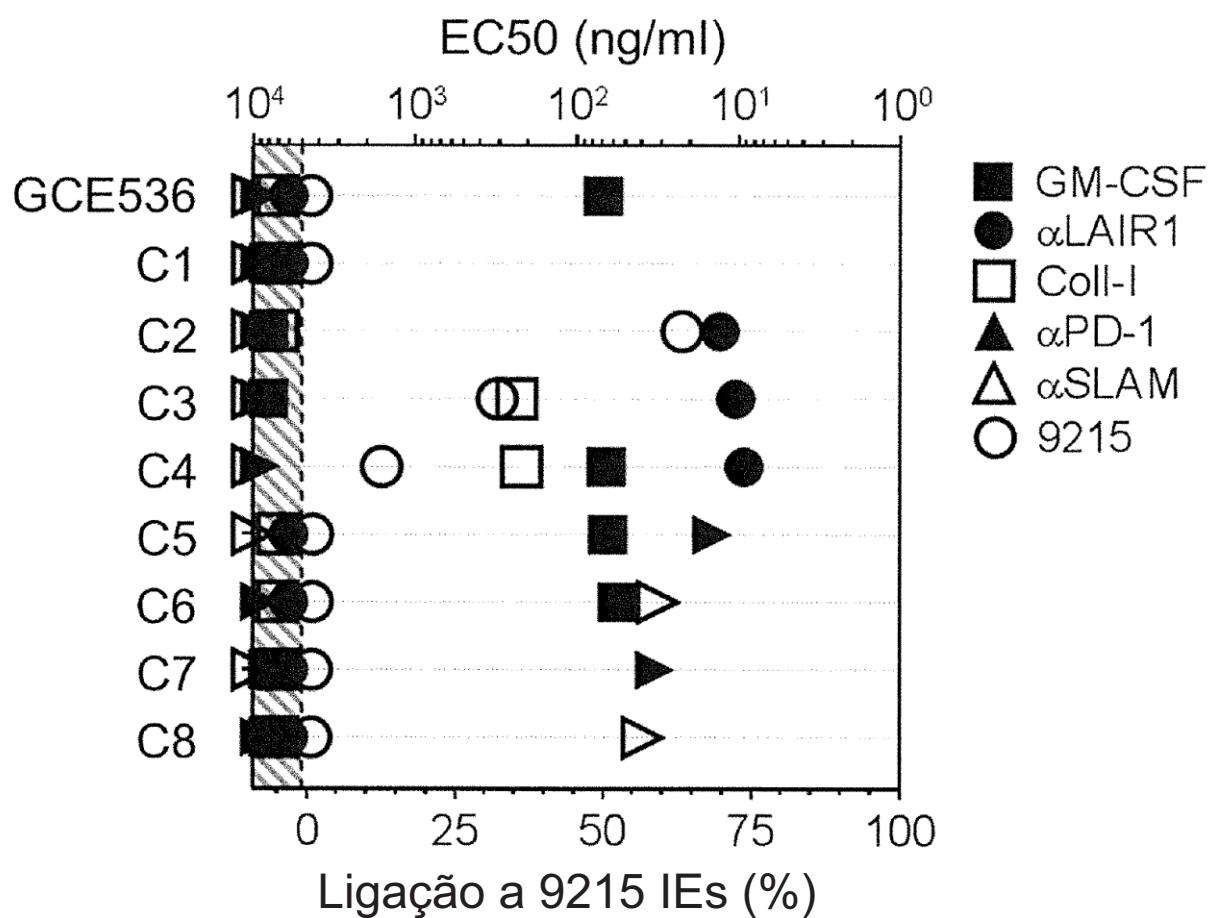


FIG. 3

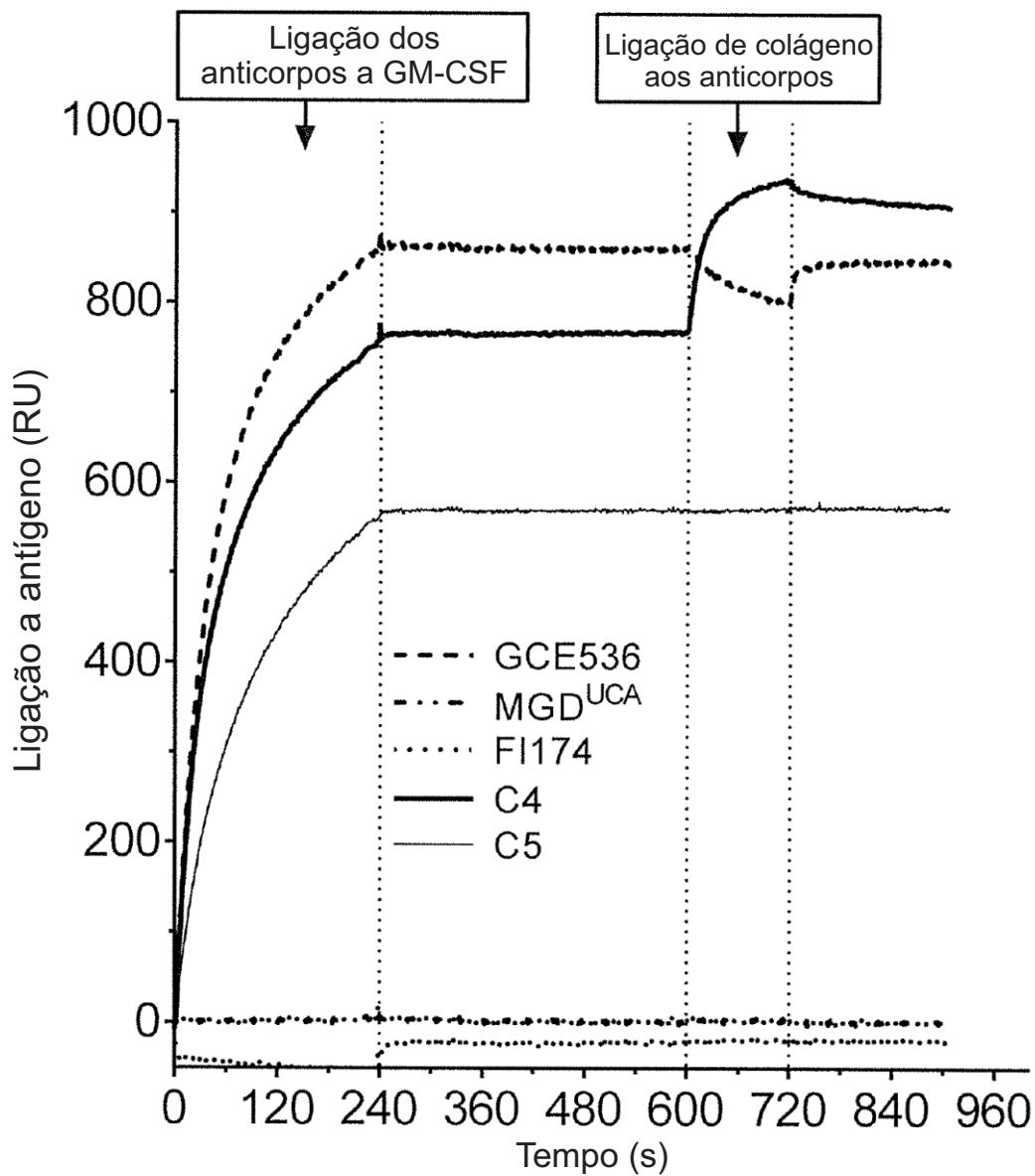


FIG. 4

5/10

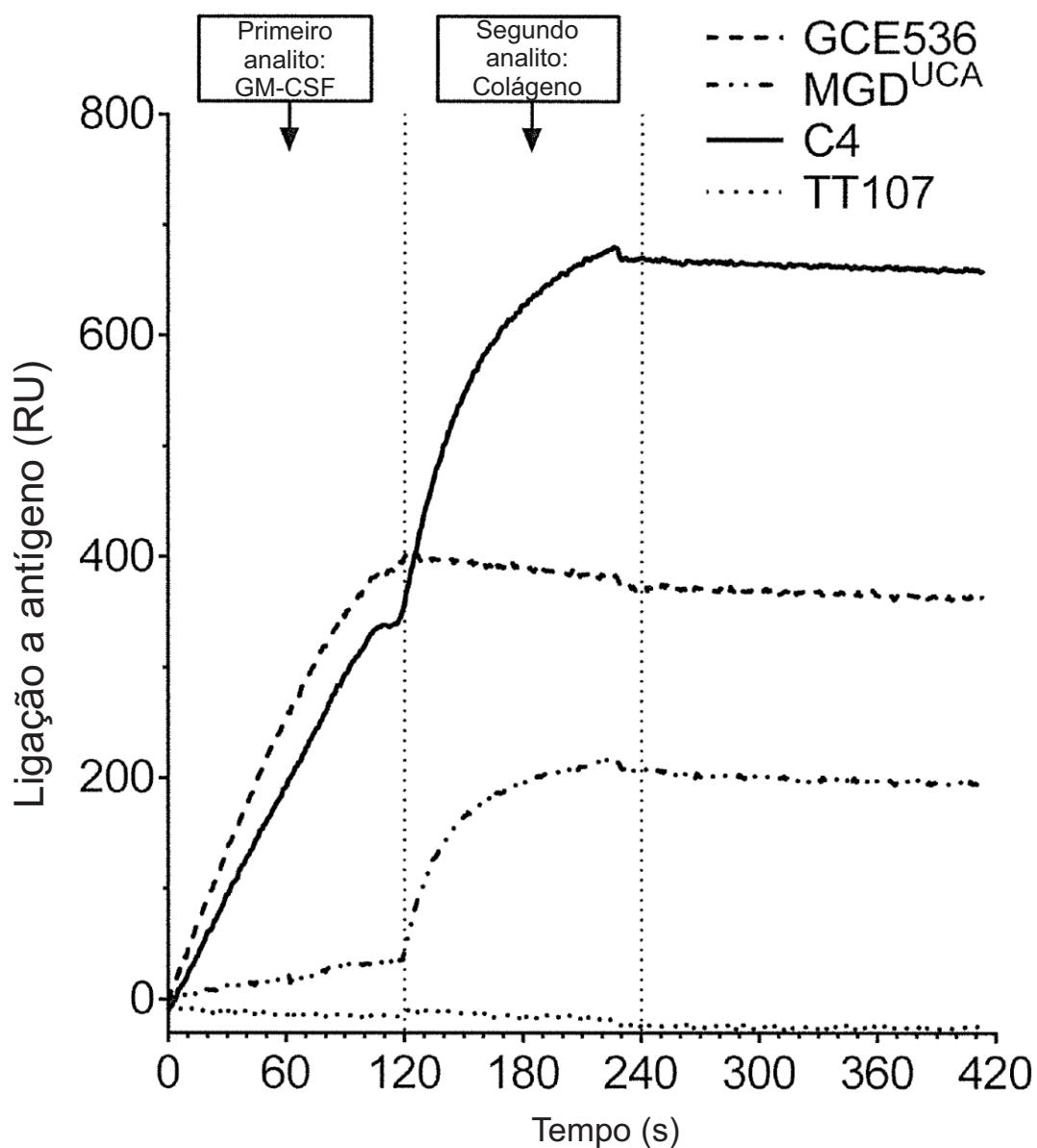


FIG. 5

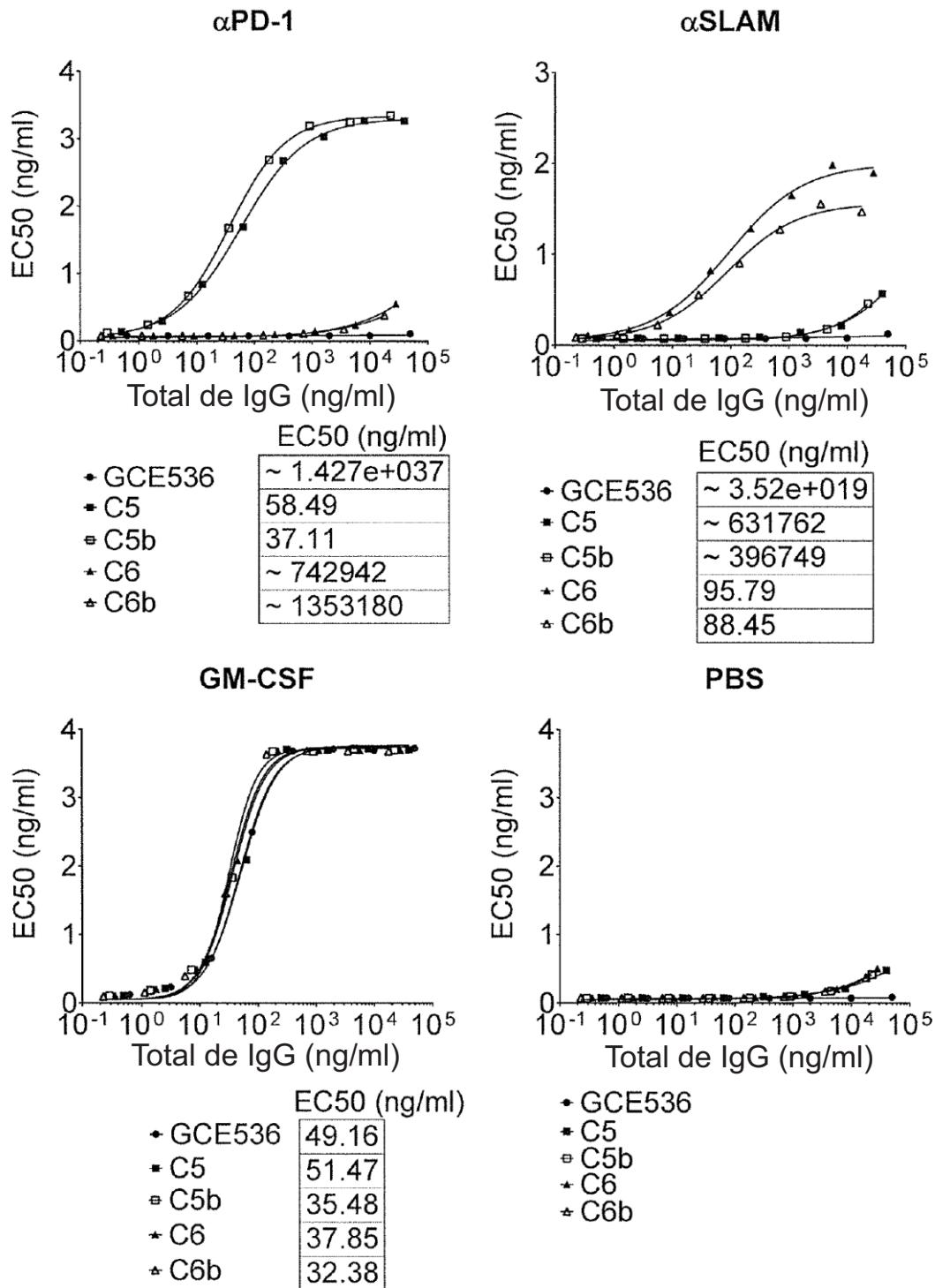


FIG. 6

7/10

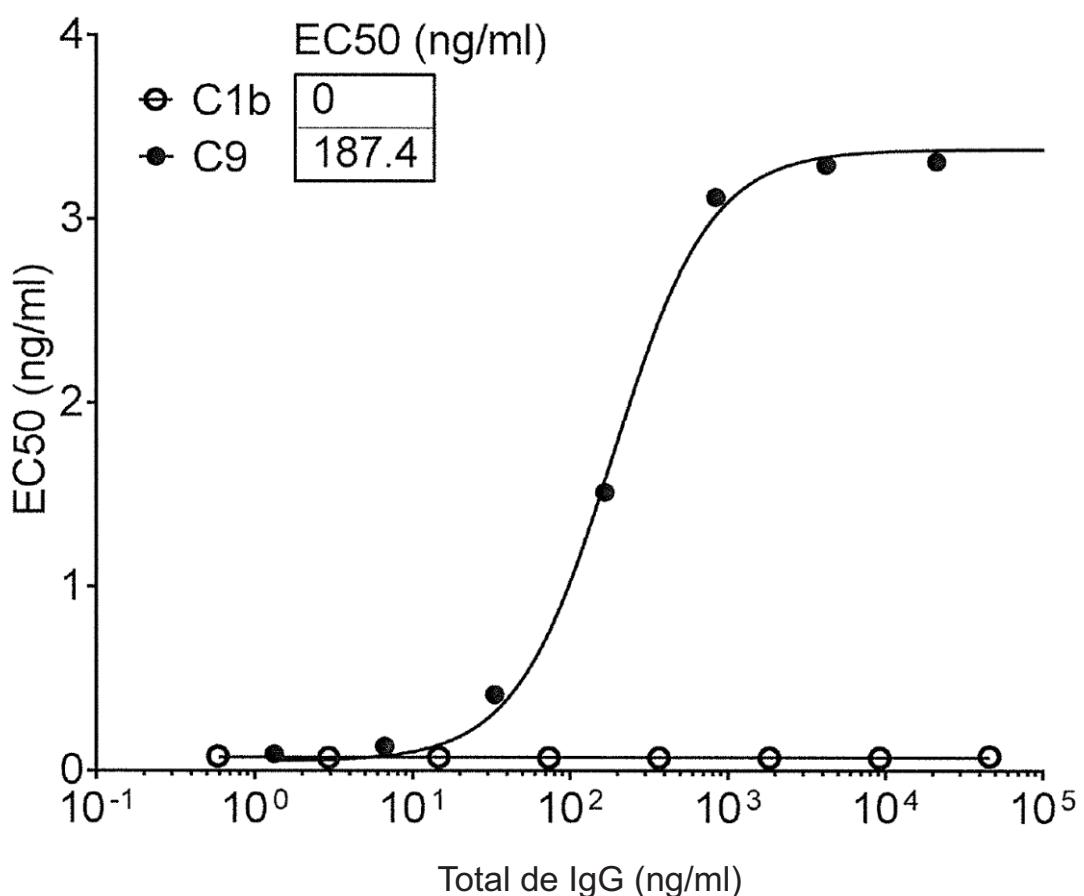


FIG. 7

FI174	VH1-69	D	JH4	
C10	VH1-69	D	JH4	T3-VHH
C11	VH1-69	D	JH4	TT39.7-ScFv
C12	VH1-69	D	JH4	F4-VHH
C13	VH1-69	D	JH4	MPE8-ScFv

FIG. 8

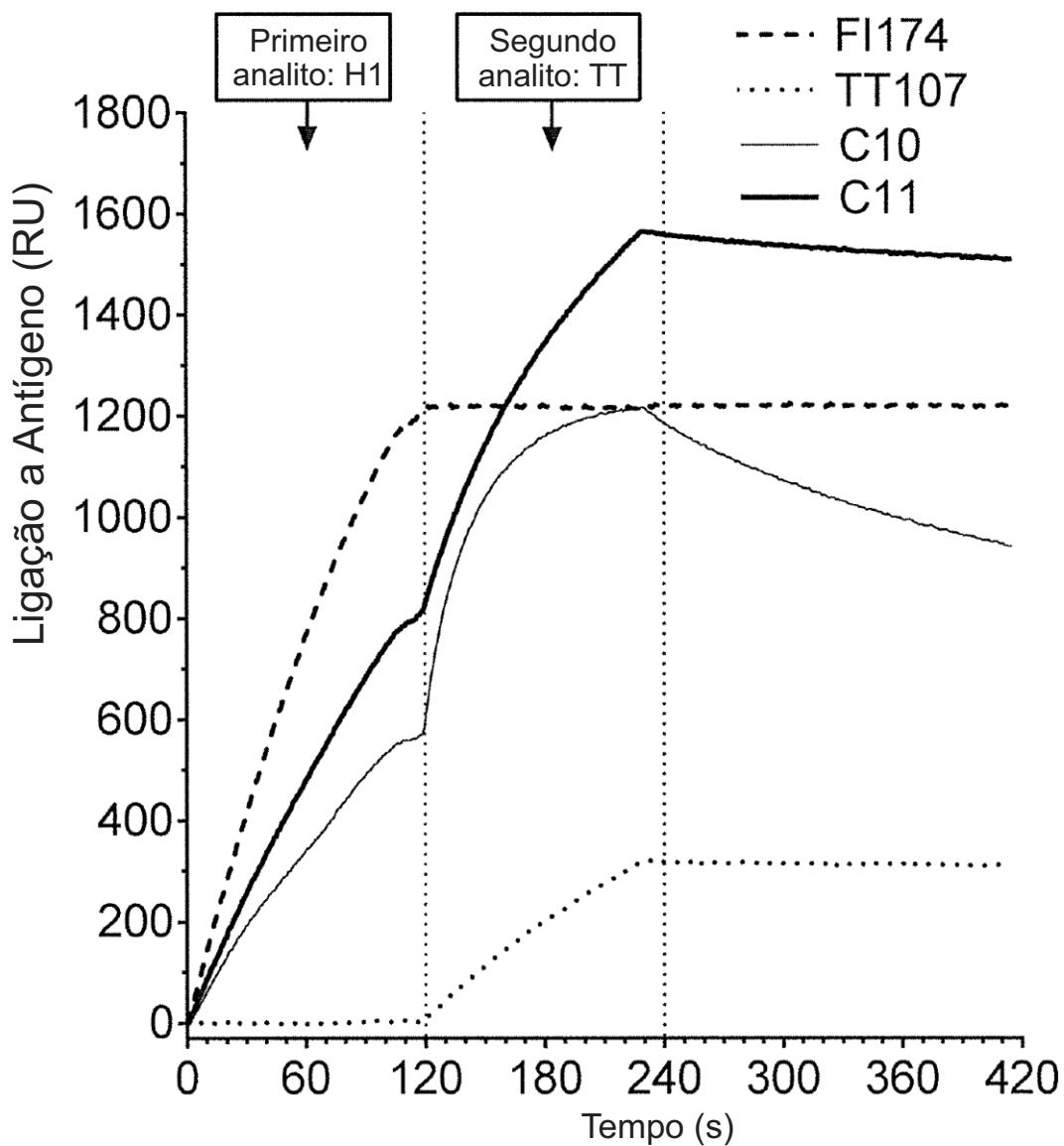


FIG. 9

10/10

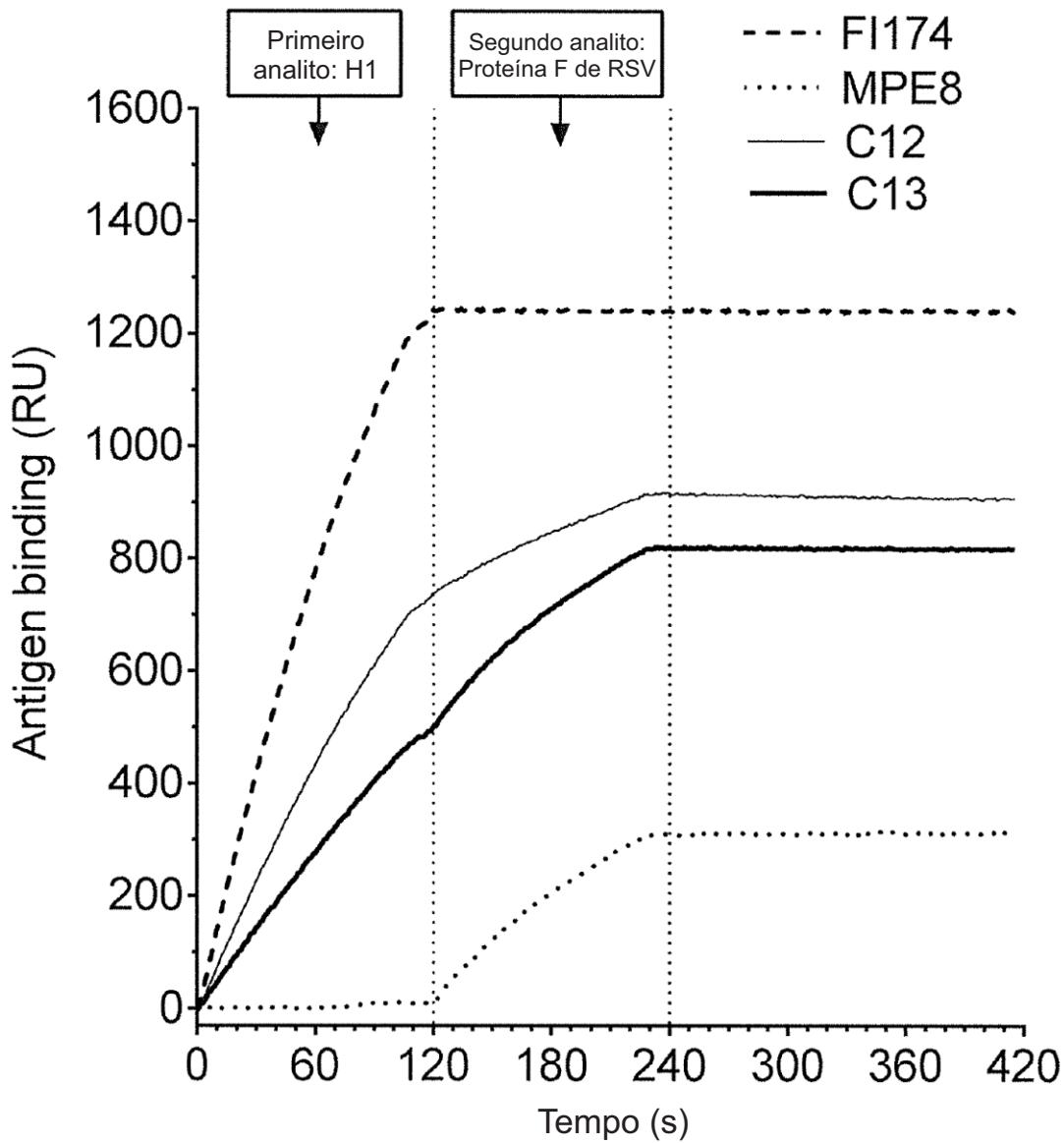


FIG. 10

## RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPOS COM DOMÍNIOS FUNCIONAIS NA REGIÃO DO COTOVELO ENTRE OS DOMÍNIOS VARIÁVEL E CONSTANTE**".

A presente invenção refere-se a anticorpos modificados e fragmentos de ligação ao antígeno, nos quais um domínio funcional adicional é inserido na região do cotovelo do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico, tais como vetores, que codificam tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, células hospedeiras e composições compreendendo tais anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno ou moléculas de ácido nucleico e suas utilizações. Por exemplo, é fornecido um formato de anticorpo multiespecífico, no qual um sítio de ligação adicional (especificidade) é inserido na região do cotovelo de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno.

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

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P243594.TXT
- Data de Geração do Código: 30/12/2019
- Hora de Geração do Código: 09:22:42
- Código de Controle:
  - Campo 1: A98275D249B78ADA
  - Campo 2: 7A4B12200DA79594