



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112017002422-5 B1

(22) Data do Depósito: 05/08/2015

(45) Data de Concessão: 20/02/2024

(54) Título: DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A CD3

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; C07K 16/30; C07K 16/46.

(30) Prioridade Unionista: 07/08/2014 EP PCT/EP2014/002177; 11/02/2015 EP 15154772.6.

(73) Titular(es): AFFIMED GMBH.

(72) Inventor(es): EUGENE ZHUKOVSKY; MELVYN LITTLE; STEFAN KNACKMUSS; UWE REUSCH; KRISTINA ELLWANGER; IVICA FUCEK; MICHAEL WEICHEL; MARKUS ESER; FIONNUALA MCALEESE-ESER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2015068070 de 05/08/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/020444 de 11/02/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 06/02/2017

(57) Resumo: DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A CD3. A presente invenção se refere a um local de ligação de CD3 humanizado, que compreende (a) um domínio variável de cadeia pesada (VH) como representado na SEQ ID NO: 8 e um domínio variável de cadeia leve (VL) como representado na SEQ ID NO: 3; ou (b) um domínio variável da cadeia pesada (VH) como representado na SEQ ID NO: 9 e um domínio variável da cadeia leve (VL), tal como definido na SEQ ID NO: 4. Os locais de ligação de CD3 têm uma estabilidade aumentada, enquanto a afinidade de ligação foi retida devido a mutações nas posições VH111 e VL49.

DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A CD3

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A invenção se refere a proteínas de ligação ao antígeno, que compreendem um novo local de ligação a CD3. Em particular, a invenção se refere a proteínas de ligação ao antígeno multiespecífico. O novo local de ligação CD3 compreende domínios VH e VL humanizadas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O antígeno CD3 está associado com o complexo receptor de células T nas células T. As proteínas de ligação ao antígeno possuindo especificidade para multiespecíficos CD3 e um antígeno de uma célula alvo pode desencadear a atividade citotóxica de células T em células alvo. Nomeadamente, por ligação multiespecífica da proteína de ligação a CD3 e a um antígeno de células alvo, por exemplo, uma célula tumoral, a lise celular da célula alvo pode ser induzida. As proteínas de ligação ao antígeno, com um local de ligação de CD3 e a sua produção são conhecidos no estado da técnica (e descritos, por exemplo, em Kipriyanov et al, 1999, *Journal of Molecular Biology* 293: 41 - 56, Le Gall et al, 2004, *Protein Engineering, Design & Selection*, 17/4: 357 - 366).

[003] Além de anticorpos derivados de quadroma, uma variedade de formatos de fragmentos de anticorpos recombinantes multiespecíficos foi concebida. Um formato particular polivalente, e, opcionalmente, fragmentos de anticorpos multiespecíficos são nomeados "diacorpos em tandem" (TandAb®), já que seu design é baseado no emparelhamento intermolecular de domínios variáveis VH e VL de dois polipeptídeos diferentes como descrito para diacorpos (Holliger et al., 1993. *Proc Natl Acad Sci EUA*, 90:6444 -

6448). Os anticorpos descritos são biespecíficos para um antígeno tumoral e CD3. Em contraste tandem scFv-scFv(scFv)2 bivalente em diacorpos também são tetravalente, porque eles têm quatro locais de ligação ao antígeno. Os diacorpos em tandem são desprovidos de domínios constantes de imunoglobulina. Foi relatado que os diacorpos em tandem têm vantagens, tais como uma elevada afinidade, uma avidez mais elevada, taxas de eliminação mais baixas e exibem uma eficiência favorável *in vitro* e *in vivo*, (Kipriyanov et al, J. Mol Biol (1999) 293, 41 – 56 e Kipriyanov Meth. Mol. Biol. (2009) 562, 177- 193).

[004] Tais diacorpos biespecíficos em tandem podem fazer uma ponte entre uma célula de tumor (por exemplo, células B-CLL) e uma CD3⁺ de células T do sistema imune humano, permitindo, assim, a morte da célula tumoral. A forte ligação das células tumorais e a célula T induz a destruição da célula tumoral. Embora tais diacorpos em tandem provaram ser favorável para aplicações terapêuticas, por exemplo, para os conceitos terapêuticos para o tratamento de tumores, permanece uma necessidade de melhorar as moléculas de ligação ao antígeno.

[005] Para facilitar a avaliação toxicologia de fragmentos de anticorpos multiespecíficos d recrutamento de células T em primatas não humanos (NHP) durante o desenvolvimento pré-clínico, um CDS de reatividade cruzada de domínio de ligação é desejável.

[006] O clone SP34 IgG murino (EMBO J. 1985. 4 (2): 337-344; J. Immunol 1986, 1 7 (4): i 097- 100; J. Exp Med 991 1, 174:319 – 326; J. Immunol 1991, 147 (9): 3047-52) liga-se a εCD3 humano e cinomolgo foi selecionado para humanização.

[007] Enquanto humanização por enxerto de CDRs de VH

de murideo para a estrutura VH humana mais homóloga (VH3 72 humano) resultou em uma molécula função de retentor, enxerto das CDR de murino VL para a estrutura de VL humano com a maior homologia (V λ 7_7a humano) resultou surpreendentemente em ambos diacorpos em tandem mal expressados ou diacorpos em tandem, que não conseguiram reconhecer CD3.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] Por conseguinte, é matéria da presente invenção proporciona domínios de ligação de CD3 com emparelhamento VL / VH funcional, boa estabilidade, boa expressão e outras propriedades biofísicas.

[009] Este problema foi resolvido pela matéria das reivindicações.

[0010] Verificou-se que o emparelhamento funcional VL / VH pode ser alcançado por um outro enquadramento VL humano. Surpreendentemente, a mudança de uma estrutura de murino VL da cadeia λ para um quadro de VL humano da cadeia (V humano 1 39) resultou em proteínas que mostram superiores de ligação de afinidade, expressability e citotóxica potência CD3 na lise das células alvo de ligação induzido por diacorpos em tandem biespecíficos. Mas tais moléculas foram mais fracas na estabilidade e outras propriedades biofísicas. Em uma outra etapa, verificou-se que os aminoácidos em posições VH111 e VL49 (que contactam directamente um ao outro de acordo com o modelo) são cruciais para as propriedades de ligação e estabilidade deste sítio de ligação de CD3, por exemplo, um anticorpo biespecífico molécula, em especial proteínas de ligação ao antígeno multiméricas, tais como, por exemplo, diacorpos ou diacorpos em tandem. As mutações de o VH 111 a Y ou H, bem como, além disso, a mutação de VL49 de G para A domínios de ligação surpreendentemente cria com melhores

propriedades de estabilidade, ao passo que as afinidades e / ou citotoxicidade de ligação originais são retidos. Uma estabilidade melhorada 7 dias a 40 ° C pode ser observado para estas proteínas, em particular, quando eles são expressos como diacorpos em tandem diméricas. Além disso, os clones demonstram aumento do conteúdo de diacorpos em tandem corretamente dimerizados, bem como uma melhor recuperação.

[0011] Assim, em um aspecto, a presente invenção proporciona uma proteína de ligação ao antígeno compreendendo, pelo menos, um local de ligação de CD3, em que o local de ligação de CD3 compreende:

(a) um domínio variável de cadeia pesada (VH) selecionado a partir do VH como descrito na SEQ ID NO: 6, 7, 8 ou 9 e um domínio variável de cadeia leve (VL) selecionado a partir do VL, conforme ilustrado na SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4; ou

(b) um domínio variável de cadeia pesada (VH), que tem identidade de sequência de pelo menos 95% em comparação com o VH como descrito na SEQ ID NO: 8, em que o resíduo de aminoácido na posição 111 é Y ou H, e um de domínio variável de cadeia leve (VL) com identidade de sequência de pelo menos 95% em comparação com o VL, conforme ilustrado na SEQ ID NO: 3, em que o resíduo de aminoácido na posição 49 é G ou A; ou

(c) um domínio variável de cadeia pesada (VH) incorporando 1 a 5 substituições conservadas de aminoácidos em comparação com a VH como descrito na SEQ ID NO: 8, em que o resíduo de aminoácido na posição 111 é Y ou H, e um de domínio variável de cadeia leve (VL) incorporando 1 a 5 substituições conservadas de aminoácidos em relação a VL, conforme ilustrado na SEQ ID nO: 3, em que o resíduo de aminoácido na posição 49 é G ou A.

[0012] Em certas concretizações, a proteína de ligação a antígeno compreendendo pelo menos um local de ligação de CD3 como definido acima não é uma proteína de ligação biespecífica que se liga especificamente a CD33 humano e CD3 humano, em que o local de ligação de CD3 comprehende pelo menos um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo e pelo menos um domínio variável de cadeia leve que forma um local de ligação ao atígeno para o CD3 humano e o domínio variável da cadeia leve anti-CD3 selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 1-3 e o domínio variável da cadeia pesada anti-CD3 selecionado do grupo consistindo das SEQ ID NOS: 6-8. Em concretizações particulares, a proteína de ligação ao antígeno não é um diacorpo em tandem biespecífico que se liga a CD33 e CD3, em que o domínio variável da cadeia leve anti-CD3 é selecionado do grupo consistindo das SEQ ID NOS: 1 - 3 e em que o domínio variável da cadeia leve ésada anti-CD3 é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 6-8. Tais proteínas de ligação CD33 e CD3 biespecíficas são reveladas no documento PCT/US2015/038666. depositado em 30 de junho de 2015 e no pedido US 14/642 497 depositado a 9 de março de 2015, que reivindica a prioridade dos pedidos US 62/019 795, depositado em 1 de julho de 2014; US 62/111,470, depositado em 3 de fevereiro de 2015.

[0013] A "proteína de ligação a antígeno" refere-se a um derivado de imunoglobulina com propriedades de ligação ao antígeno, isto é, polipeptídeos de imunoglobulina ou fragmentos destas que contêm um local de ligação ao antígeno. A proteína de ligação compreende os domínios variáveis de um anticorpo ou seus fragmentos. Cada local de ligação ao antígeno é formado por um anticorpo, isto é, imunoglobulina,

um anticorpo de domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) de ligação para o mesmo epítopo, ao passo que o domínio variável de cadeia pesada (VH) compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (CDR): CDR1, CDR2 e CDR3; e o domínio variável de cadeia leve (VL) compreende três regiões determinantes de complementares de cadeia leve (CDR): CD1, CDR2 e CDR3. Em alguns casos, a proteína de ligação, de acordo com algumas concretizações aqui é desprovida de domínios constantes de imunoglobulina. Em alguns casos, os domínios variáveis da cadeia leve e pesada que formam o local de ligação do antígeno está ligado de forma covalente um com o outro, por exemplo, por um ligante peptídico, ou em outros casos, os domínios variáveis da cadeia leve e pesada associado de forma não covalente um com o outro para formar o local de ligação ao antígeno. A "proteína de ligação a antígeno" refere-se também a anticorpos monoclonais das classes IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM e fragmentos de anticorpos ou derivados de anticorpos, incluindo, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')2, fragmentos Fv, Fv de cadeia simples, em tandem de cadeia simples Fv ((ScFv) 2, diacorpo, flexicorpo (WO 03/025018) e diacorpo em tandem (TandAb ») (ipriyanov et al), 1999, J. Mol Biol, 293: 41-56; Cochlovius et ai, 2000, Cancer Res., 60: 4336 - 4341; Reuscli et ai, 2004, Int J. Cancer, 12 1:509 - 518, ipriyanov, 2009, Methods Mol Biol, 562: 177 - 93; McAleese e Eser, 2012, Futuro Oncol. 8: 687-95) "TandAb" é uma marca registrada da Affimed Therapeutics utilizada para designar um diacorpo em tandem. No contexto da presente invenção "TandAb" e "diacorpos em tandem" são usados como sinônimos.

[0014] Em certas concretizações do local de ligação

de CD3 compreende uma VH, em que a estrutura de VH é derivada de um quadro 72 VH3 humana e um VL, em que a estrutura de VL é derivada de VK humana 139. Em uma concretização particular, o sítio de ligação de CD3 compreende uma VH selecionado a partir do VH como descrito na SEQ ID nO: 8 ou 9 e uma VL seleccionada de entre o VL, conforme ilustrado na SEQ ID nO: 3 ou 4. em certos casos, o local de ligação de CD3 compreende (i) uma VH como representadas nas SEQ ID nO: 8 e uma VL como descrita na SEQ ID nO: 3, ou (ii) uma VH como descrito na SEQ ID nO: 9 e uma VL como descrito na SEQ ID nO: 4. Em concretizações alternativas, os domínios de cadeia pesada e leve incorporar homólogos ou variantes das sequências aqui descritas e de ligação especificamente a CD3. Por conseguinte, em algumas concretizações, uma sequência de VL ou VH de CD3 é similar, mas não idêntico, a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 3 ou 8, em que (i) o resíduo de aminoácido na posição VI II11 é F, Y ou H, ou (ii) o resíduo de aminoácido na posição LL VHL é F, Y ou H e o resíduo de aminoácido na posição VL49 é G ou A. Em certas concretizações, uma sequência variante de VH ou VL tem uma sequência de Identidade de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, ou 80% em comparação com a sequência tal como representada na SEQ ID nO: 3 ou 8 e que se liga especificamente a CD3, em que (i) o resíduo de aminoácido na posição VH1 11 é F, Y ou H ou (ii) o resíduo de aminoácido na posição VH1 11 é F, Y ou H e o resíduo de aminoácido na posição VL49 é G ou A.

[0015] Em outras concretizações, a variante VH e / ou VL incorpora 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 substituições conservadas de aminoácidos. As substituições conservadoras incluem, entre os aminoácidos alifáticos intercâmbio de

alanina, valina, leucina e isoleucina; intercâmbio do hidroxi) resíduos de serina e treonina, troca dos resíduos acídicos aspartato e glutamato, substituição entre a amida de resíduos de asparagina e glutamina, a troca de resíduos básicos de lisina e arginina, e substituições entre os resíduos de fenilalanina e tirosina aromático. Em certos casos, uma variante de VH e / ou variante de VL incorpora tais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou substituições de aminoácidos conservadas sob a condição de que (i) o resíduo de aminoácido na posição VH1 1 1 é M, Y ou H, ou (ii) o resíduo de aminoácido na posição VH1 1 1 é F, Y ou H e o resíduo de aminoácido na posição VL49 é G ou A. Em certos casos, tais substituições não estão dentro das CDRs.

[0016] Em ainda outras concretizações, uma variante VH ou VL incorpora substituições que melhoram as propriedades do CDR, tais como aumento da estabilidade, expressão, de recuperação, a afinidade de ligação de CD3 e / ou potência citotóxica.

[0017] Além disso, em certas concretizações, a proteína de ligação a antígeno é multivalente, isto é, tem duas, três ou mais locais de ligação para CD3.

[0018] Em certas concretizações, a proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a invenção é multifuncional. O termo multifuncional, tal como aqui utilizado, significa que uma proteína de ligação da invenção exibe duas, três ou mais diferentes funções biológicas, em que uma função é a ligação de CD3. Por exemplo, as diferentes funções biológicas são diferentes especificidades para diferentes抗ígenos. Em certos casos, a proteína multifuncional de ligação ao antígeno é multiespecífico, ou seja, tem especificidade de ligação para CD3 e um, dois ou

mais antígenos adicionais. Tais proteínas de ligação a antígeno multiespecífico incluem, por exemplo, multiespecífico F(ab')2, fragmentos Fv, Fv de cadeia simples, em tandem de cadeia simples Fv ((scFv) 2), diacorpo, flexibody (WO 03/025018) e diacorpo em tandem.

[0019] Em certas concretizações, a proteína de ligação ao antígeno compreende pelo menos um local de ligação de CD3 e adicionalmente pelo menos um local de ligação ao antígeno específico para uma substância bacteriana, proteína virai, marcador auto-imune ou a um antígeno presente em uma célula particular, tal como uma proteína da superfície celular de uma célula B, célula T, células assassinas naturais (NK), células mieloides, células fagocíticas ou célula de tumor. Tais moléculas de ligação ao antígeno são capazes de ligação cruzada duas células e pode ser utilizada para dirigir as células T a um alvo específico.

[0020] Exemplos de tais objetivos podem ser células tumorais ou agentes infecciosos, tais como agentes patogênicos virais ou bacterianas, por exemplo, vírus da dengue, herpes simplex, vírus da gripe, VIH ou células portadoras de alvos autoimunes, tais como IL-2, um marcador autoimune ou a um antígeno autoimune.

[0021] Em certas concretizações o pelo menos um outro local de ligação ao antígeno é específico para um antígeno de uma célula tumoral. Os antígenos para as células tumorais podem ser antígenos de tumores e antígenos da superfície celular sobre a respectiva célula de tumor, por exemplo, marcadores tumorais específicas. Tal Proteína de ligação ao antígeno multiespecífica se liga a ambas a células de tumor e o CD3 nas células T, despoletando, assim, a resposta citotóxica induzida pela célula T. O termo "antígeno tumoral"

tal como aqui utilizado comprehende o antígeno associado a tumor (TAA) e antígeno específico de tumores (TSA). Um "antígeno associado a tumor" (TAA), tal como aqui utilizado refere-se a uma proteína que está presente em células tumorais, e em células normais durante a vida fetal (antígenos uma vez fetal), e após o nascimento, em órgãos selecionados, mas a concentração muito mais baixa do que sobre as células tumorais. Um TAA pode também estar presente no estroma na vizinhança da célula tumoral, mas expresso em menores quantidades no estroma em outras partes do corpo. Em contraste, o termo "antígeno específico de tumor" (TSA) refere-se a uma proteína expressa por células tumorais. O termo "antígeno de superfície celular" refere-se a qualquer antígeno ou um seu fragmento capaz de ser reconhecida por um anticorpo na superfície de uma célula.

[0022] Exemplos de antígenos de células de tumor incluem, mas não estão limitados a CD 19, CD20, CD30, a proteína precursora do receptor de laminina, EGFR1, EGFR2, EGFR3, EGFRvIII, EP-C ' AM, FLAP, Thomsen-Friedenreich (TF) antígeno, MUC -1 (mucina), IGFR, CDS, IL4 R-alfa, IL13-R, Fc ε RI e IgE, tal como descrito no estado da técnica.

[0023] Em outras concretizações, a proteína de ligação ao antígeno pode compreender, pelo menos, um local de ligação de CD3 e adicionalmente pelo menos um local de ligação ao antígeno específico para uma molécula selecionada a partir do grupo que consiste em um fármaco, toxina, radionucleotídeo, enzima, albumina, por exemplo, albumina de soro e lipoproteínas, que ocorre naturalmente ligados, tais como citoquinas ou quimioquinas. Se a molécula alvo é a albumina, a albumina ou albumina de soro pode ser selecionado a partir do grupo consistindo de origens de origem humana,

bovina, de coelho, rato e canino.

[0024] Em certas concretizações, a proteína de ligação é multiespecífica com uma primeira especificidade de CD3 e uma segunda especificidade para CD19, CD30, EGFRvIII ou HSA. Em uma concretização particular, a proteína de ligação com uma primeira especificidade para CDS multiespecífico não tem uma segunda especificidade para CD33.

[0025] Em outro aspecto, um antígeno de proteínas de ligação de acordo com a invenção é um multímero, ou seja, composta por duas, três ou mais polipeptídeos que formam local de ligação ao antígeno, pelo menos, um de CDS. Tal como aqui utilizado, "multímero" refere-se a um complexo de dois ou mais polipeptídeos. Em certas concretizações, os polipeptídeos de um multímero estão associados de forma não covalente um com o outro, em particular, com a condição de que não há nenhuma ligação covalente entre os polipeptídeos. Em certas concretizações, o multímero é homomérico, ou seja, compreende polipeptídeos idênticos. O termo "polipeptídeo" refere-se a um polímero de resíduos de aminoácido ligados por ligações amida. O polipeptídeo é, em certas concretizações, uma proteína de fusão de cadeia única, que não é ramificado. No polipeptídeo os domínios variáveis de anticorpo são ligados um após o outro. O polipeptídeo, em outras concretizações, podem ter resíduos de aminoácido contíguos, além do domínio variável N-terminal e / ou C-terminal de resíduos. Por exemplo, tais resíduos de aminoácidos contíguos pode compreender uma sequência de marcador, em algumas concretizações no terminal C, que está contemplado para ser útil para a purificação e detecção do polipeptídeo. Em certas concretizações o multímero é dimérico, isto é, é composto por dois polipeptídeos. Exemplos de um multímero englobados pela

presente invenção são diacorpo, diacorpo tandem e flexicorpo.

[0026] Em certas concretizações o multímero é uma proteína de ligação, no formato de um diacorpo em tandem antígeno. Tais diacorpos em tandem são constituídas ligando quatro domínios de ligação variáveis de anticorpos, por exemplo, duas VH e VL de duas, em uma construção de um único gene que permite uma dimerização não covalente. Em tais diacorpos em tandem o comprimento do ligante é tal que impede o emparelhamento intramolecular dos domínios variáveis de modo a que a molécula não se pode dobrar para trás sobre si mesma para formar um diacorpo de cadeia simples, mas ao invés é forçado a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia. Os domínios são também dispostos de tal modo que o VH e VL correspondentes domínios par durante este dimerização. Após a expressão da construção de gene, duas cadeias polipeptídicas dobrar cabeça-de-cauda formando um dimcr não covalente funcional de aproximadamente 105 kDa (Kipriyanov Meth. Mol. Biol. (2009) 562, 177 – 193, McAleese e Eser, 2012, Futuro Oncol. 8: 687 – 95). Apesar da ausência de ligações covalentes intcmoleeular, o dimcr é altamente estável uma vez formado, permanece intacta e não reverter para a forma monomérica.

[0027] Os diacorpos em Tandem têm um número de propriedades que proporcionam vantagens sobre os anticorpos monoclonais tradicionais e outras moléculas Fv menores. diacorpos em Tandem contem apenas domínios variáveis de anticorpo e, portanto, não possuem qualquer um dos efeitos secundários que podem estar associados com a unidade Fc. Porque diacorpos em tandem são multivalentes e permitem a ligação de CD3 bivalente, a avidez é a mesma que a de uma IgG. O tamanho de um diacorpo em tandem, em certas

concretizações em, aproximadamente, 105 kDa, é menor do que a de uma IgG, o que pode permitir a penetração do tumor melhorada. No entanto, este tamanho é bem acima do limiar renal para a depuração de primeira passagem, oferecendo uma vantagem farmacocinética em comparação com formatos de anticorpo pequenos com base em sítios de ligação de anticorpos ou andaimes não anticorpos. Os diacorpos em tandem são bem expressos em células hospedeiras, por exemplo, células CHO de mamífero. É contemplado que robusto processo de fabrico a montante e a jusante está disponível para diacorpos em tandem (por exemplo, Kipriyanov, Mcth. Mol. Biol. (2009) 562, 177-193).

[0028] Em certos casos, a proteína de ligação, por exemplo, antígeno multiespecífico, diacorpo em tandem, aqui descrito foram concebidos para permitir que direcionamento específico das células tumorais através do recrutamento de células T citotóxicas. Isto melhora ADCC (citotoxicidade mediada por células dependente) em comparação com anticorpos convencionais. Os anticorpos não são capazes de recrutar directamente células T citotóxicas.

[0029] Em contraste, acoplando moléculas CD3 especificamente expressa nestas células, a proteína de ligação a antígeno multiespecífico, por exemplo, o diacorpo em tandem pode reticular uma célula T citotóxica com células tumorais de uma forma altamente específica, aumentando assim significativamente o potencial citotóxico de tais moléculas.

[0030] Em um aspecto, o multímero é um diacorpo biespecífico em tandem, em que cada polipeptídeo do diacorpo biespecífico conjunto compreende quatro domínios variáveis, um VL e VH de um dos CD3 possuindo uma segunda especificidade diferente de CD3. Em certas concretizações, quatro domínios

variáveis são ligados por ligantes peptídicos L1, L2 e L3 e em alguns casos, dispostos a partir do N- para o C-terminal como se segue:

[0031] (i) VL (CD3)-L1-VH (segundo local de ligação ao antígeno) -L2-VL (local de ligação do segundo antígeno) -L3-VH (CD3); ou

[0032] (ii) VH (CD3) -L1-VL (segundo local de ligação ao antígeno) -L2-VH (segundo local de ligação ao antígeno) L3-VL (CD3); ou

[0033] (iii) VL (segundo local de ligação ao antígeno) -L1-VH (CD3) -L2-VL (CD3) L3-Vi { (local de ligação ao segundo antígeno); ou

[0034] (Iv) VH (segundo local de ligação ao antígeno se sente e) - L1 - VL (CD3) - L2- V11 (C1) 3) - L3 - V .. (segundo local de ligação ao antígeno).

[0035] Em certas concretizações, o "outro local de ligação ao antígeno" é específico para um antígeno tumoral, por exemplo, CD19, CD30 ou EGFRVIL. Em uma concretização particular, o antígeno tumoral não é CD33.

[0036] O comprimento dos elementos de ligação influencia a flexibilidade do diacorpo em tandem. Por conseguinte, em algumas concretizações, o comprimento dos ligantes peptídicos L1, L2 e L3 é tal que os domínios de um polipeptídeo pode associar intermolecularmente com os domínios de outro polipeptídeo para formar o dimérico diacorpo em tandem de ligação ao antígeno. Em certas concretizações, tais ligantes são "curtos", ou seja, constituído por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 resíduos de aminoácidos. Assim, em certos casos, os ligantes consistem nos resíduos de cerca de 12 ou menos aminoácidos. No caso de 0 resíduos de aminoácidos do ligador é uma ligação peptídica. Esses

ligantes curtos favorecem a dimerização interna dos dois polipeptídeos de ligação e formação de locais de ligação ao antígeno correctas entre os domínios variáveis de cadeia leve de anticorpo e os domínios variáveis de anticorpo de cadeia pesada de diferentes polipeptídeos. O encurtamento do ligante para os resíduos de cerca de 12 ou menos aminoácidos, geralmente impede domínios adjacentes da mesma cadeia polipeptídica da interacção intramolecular entre si. Em algumas concretizações, estes ligantes consistem de cerca de 3 a cerca de 12, em particular cerca de 3 a cerca de 10, por exemplo 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 resíduos de aminoácidos contíguos.

[0037] Em relação à composição de aminoácidos dos ligantes, os peptídeos são selecionados que não interferem com a dimerização dos dois polipeptídeos. Por exemplo, ligantes que compreendem os resíduos de glicina e serina geralmente proporcionam resistência a proteases. A sequência de aminoácidos dos ligantes pode ser optimizado, por exemplo, por métodos de apresentação em fagos para melhorar a ligação ao antígeno e um rendimento de produção do dímero de polipeptídeo de ligação a antígeno. Exemplos de ligantes peptídicos adequados para um diacorpo em tandem, acordo com a invenção são GGSGGS (SEQ ID NO: 16), GGSG (SEQ ID NO: 17), ou (SEQ ID NO: 8) GGSGG.

[0038] A proteína de ligação a antígeno multimérica aqui descrito é produzida, em algumas concretizações, por expressar polinucleótidos que codificam o polipeptídeo do diacorpo em tandem que se associa com outro polipeptídeo idêntico para formar o diacorpo em tandem de ligação ao antígeno. Portanto, outro aspecto é um polinucleótido, por exemplo, DNA ou RNA, que codifica o polipeptídeo de uma proteína de ligação ao antígeno multimérico aqui descrito,

por exemplo, um diacorpo em tandem.

[0039] O polinucleotídeo é construído por métodos conhecidos, tais como através da combinação de genes que codificam para os domínios variáveis de anticorpo, quer separadas por ligantes peptídicos, ou em outras concretizações, diretamente ligados por uma ligação peptídica, em uma única construção genética operativamente ligada a um promotor adequado e, opcionalmente, um terminador de transcrição adequado e expressando-a em bactérias ou outro sistema de expressão apropriado tal como, por exemplo, células CHO. Dependendo do sistema de vetor e hospedeiro utilizado, qualquer número de elementos de transcrição e tradução adequados, incluindo promotores constitutivos e indutíveis, pode ser utilizado. O promotor é selecionado de tal modo que dirige a expressão do polinucleótido na respectiva célula hospedeira.

[0040] Em algumas concretizações, o polinucleótido é inserido em um vetor, preferivelmente um vetor de expressão, o que representa uma outra concretização da invenção. Esse vetor recombinante pode ser construído de acordo com métodos conhecidos.

[0041] Uma variedade de sistemas de vetor de expressão / hospedeiro pode ser utilizada para conter e expressar o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo, por exemplo, do diacorpo em tandem descrito.

[0042] Exemplos de vetores de expressão para a expressão em *E. coli* são pSK (Le Gall et al, J. Immunol Methods (2004) 285 (1):111-27) ou pcDNAS (Invitrogen) para expressão em células de mamífero.

[0043] Assim, o diacorpo em tandem de ligação ao antígeno como aqui descrito, em algumas concretizações, é

produzida através da introdução de um vector que codifica o polipeptídeo, tal como descrito acima para uma célula hospedeira e a cultura da referida célula hospedeira em condições em que as cadeias polipeptídicas são expressas, podem ser isoladas e, opcionalmente, adicionalmente purificado. Para o isolamento e purificação dos polipeptídeos sem Taq s são necessárias, o que é uma vantagem para administração *in vivo*.

[0044] Em outros aspectos, proporcionam-se aqui composições farmacêuticas que compreendem a proteína de ligação de acordo com a invenção, o antígeno, por exemplo, um diacorpo em tandem, um vector que compreende o polinucleótido que codifica o polipeptídeo da proteína de ligação a antígeno ou uma célula hospedeira transformada por este vector e, pelo menos, um veículo farmaceuticamente aceitável. O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui, mas não está limitado a, qualquer veículo que não interfira com a eficácia da atividade biológica dos ingredientes e que não é tóxico para o doente a quem é administrado. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são bem conhecidos na arte e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, tais como emulsões óleo / água, vários tipos de agentes molhantes, soluções estéreis, etc. Tais veículos podem ser fornecidos por métodos convencionais e pode ser administrado ao sujeito em uma dose adequada. De preferência, as composições são estéreis. Estas composições podem também conter adjuvantes, tais como conservantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da acção de microorganismos pode ser assegurada pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos. A administração das composições adequadas pode ser efetuada por diferentes

maneiras, por exemplo, por via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. A via de administração, é claro, depende do tipo de tratamento e do tipo de composto contido na composição farmacêutica. O regime de dosagem será determinado pelo médico assistente e de outros fatores clínicos. Como é bem sabido nas técnicas médicas, as dosagens para qualquer doente depende de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, a área de superfície do corpo, a idade, o sexo, o composto em particular a ser administrado, o tempo e via de administração, o tipo de terapia, estado geral de saúde e outras arrasta a ser administrados concomitantemente.

[0045] A invenção proporciona ainda um uso médico ou um método em que a proteína de ligação ao antígeno, tal como descrito aqui acima é administrada em uma dose eficaz para um sujeito, por exemplo, do paciente, para o tratamento imunossupressor, por exemplo, no transplante, o tratamento de doença autoimune, doença inflamatória, doenças infecciosas, alergia ou câncer (linfoma de exemplo não-Hodgkin, leucemia linfocítica crônica; o linfoma de Hodgkin; tumores sólidos, por exemplo, aqueles que ocorrem no câncer de mama, câncer de ovário, câncer de cólon, câncer de rim, ou câncer do ducto biliar, doença residual mínima; tumores metastáticos, por exemplo, metástases nos pulmões, ossos, cérebro ou fígado). A proteína de ligação ao antígeno pode ser usada em configurações profiláticas ou terapêuticas, por si só ou em combinação com as terapias atuais.

[0046] Os cânceres que podem ser tratados utilizando a proteína de ligação ao antígeno multiespecífico da presente invenção incluem, mas não estão limitados a câncer primário e metastático adrenal cortical, câncer anal, anemia aplástica,

câncer do ducto biliar, câncer da bexiga, câncer dos ossos, metástases ósseas, tumores do SNC, câncer do SNC periférica, câncer de mama, a doença de s, o câncer do colo do útero, infância Non-Hodgkin 'Castleman câncer endometrial s linfoma, câncer do cólon e reto, câncer do esófago, "família de tumores (por exemplo, sarcoma de Ewing), câncer ocular, câncer de vesícula biliar, tumores gastrointestinais carcinóides, tumores estromais gastrointestinais, doença trofoblástica gestacional, leucemia de células pilosas, 'doença s, Kaposi' Hodgkin sarcoma s, câncer renal, câncer da laringe e hipofaringe, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielóide aguda, infantil leucemia, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielóide crônica, câncer do fígado, câncer do pulmão, tumor carcinóide de pulmão, linfoma não-Hodgkin, câncer da mama masculino, mesotelioma maligno, mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica, doenças reumáticas, cavidade nasal e câncer paranasais, nasofaringe câncer, neuroblastoma, câncer da cavidade oral e orofaríngea, osteossarcoma, câncer do ovário, câncer do pâncreas, câncer do pénis, tumor da pituitária, câncer da próstata, o retinoblastoma, rabdomiossarcoma, câncer da glândula salivar, sarcoma (câncer de tecidos moles adulto), o câncer de pele melanoma, câncer de pele não-melanoma, câncer de estômago, câncer testicular, câncer do timo, câncer da tireoide, câncer uterino (por exemplo, sarcoma uterino), câncer vaginal, câncer vulvar, e macroglobulinemia de Waldenstrom.

[0047] Uma "dose eficaz" refere-se a quantidades do ingrediente ativo que são suficientes para afectar o curso e a gravidade da doença, conduzindo à redução ou remissão de tal patologia. Uma "dose eficaz" útil para o tratamento e / ou prevenção dessas doenças ou desordens podem ser

determinadas utilizando métodos conhecidos de um técnico versado no assunto (ver, por exemplo, Fingl et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goddman e Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nova Iorque, pp. 1 - 46 (1975)).

[0048] Em um outro aspecto da invenção, a proteína de ligação a antígeno, tal como descrito aqui acima é utilizada na fabricação de um medicamento imunossupressor ou medicamento para o tratamento de doença autoimune, doença inflamatória, doenças infecciosas, alergias ou câncer (por exemplo, linfoma de não hodgkin; leucemia linfocítica crônica; tumores sólidos de Hodgkin, por exemplo, aquelas que ocorrem no câncer de mama, câncer de ovário, câncer de cólon, câncer de rim, ou câncer do ducto biliar, doença residual mínima, tumores metastáticos, por exemplo, as metástases nos pulmões, ossos, fígado ou o cérebro). Quando indicado, proteínas de ligação multiespecíficas foram descritas acima como tendo uma utilidade particular no tratamento de uma doença especificada, essas proteínas de ligação ao antígeno pode também ser utilizada na fabricação de um medicamento para doenças que especificado.

[0049] Os métodos para a preparação de composições farmacêuticas, ou seja, medicamentos, e a aplicação clínica de proteínas de ligação ao antígeno na prevenção e / ou tratamento de doenças, tais como, por exemplo, o câncer é conhecido dos técnicos versados no assunto.

[0050] Em um aspecto particular da invenção, a proteína de ligação a antígeno é multispecífica e utilizada para a terapia do câncer, porque tais proteínas de ligação ao antígeno multiespecífico pode ser utilizado para redirecionar células efectoras citotóxicas contra células tumorais. Este conceito terapêutico é bem conhecido no estado

da técnica. Por exemplo, estudos clínicos mostraram regressão do tumor em doentes tratados com um anti-tumor x o FIC anticorpo específico anti-CD3 (por exemplo, Canevari, S. et al, J. Natl Cancer Inst, 87:1463 – 1469, 1996), ou pacientes tratado com um 16 x de anticorpo anti-CD biespecífico anti-tumor (por exemplo, Hartmann et al; Clin Cancer Res 2001; 7 (7):. 1873 – 1881). Prova de Conceito também foi mostrado para diferentes moléculas bi específicos recombinantes de anticorpos que compreendem apenas domínios variáveis (Fv) (Cochlovius et al.; Cancer Research, 2000, 60: 4336 – 4341) ou recentemente em estudos clínicos com o único monomérica moléculas de anticorpos de cadeia Fv do formato BiTE®- (dois anticorpos de cadeia simples de diferentes especificidades ligadas entre si; Amgen Alemanha; Bargou R. et al, ciência, 2008, 321 (5891):. 974-977; Baeuerle PA e Reinhardt . C, Cancer Res 2009, 69 (12): 4941 – 4944). As proteínas de ligação ao antígeno diméricas aqui descritos podem ser utilizados como medicamentos e aplicada em métodos de tratamento de uma maneira semelhante à dos anticorpos biespecíficos da arte, uma vez que são capazes de redireccionar terapêutico, por exemplo, citotóxica, mecanismos usando as mesmas especificidades de anticorpos combinados. Além disso, os anticorpos monoespecíficos para imunossupressores, tais como CDS muromonab-CD3, são conhecidos para o tratamento da rejeição de transplante, rejeição aguda de transplantes renais (aloenxertos), hepática e transplante cardíaco. Assim, as proteínas de ligação de抗ígenos específicos para a albumina e CD3 pode ser utilizado nos mesmos métodos de tratamentos como os anticorpos anti-CD3 monoespecíficos conhecido.

[0051] A proteína de ligação ao antígeno e as suas

composições podem estar na forma de uma administração oral, intravenosa, intraperitoneal, ou outro produto farmacêutico de forma de dosagem aceitável. Em algumas concretizações, a composição é administrada oralmente, e a forma de dosagem é um comprimido, cápsula, comprimido ou outra forma oralmente disponível. Em algumas concretizações, a composição é parentérica, por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea, e é administrado por meio de uma solução contendo a molécula de ligação ao antígeno.

[0052] Um técnico versado no assunto será prontamente capaz, sem encargo indevido para construir e obter a proteínas aqui descritas, utilizando técnicas estabelecidas e os métodos padrão conhecidos no estado da técnica de ligação ao antígeno, ver por exemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) NOVA IORQUE; A proteína Protocols Handbook, editado por John M. Walker, Humana Press Inc. (2002); ou engenharia de anticorpos: métodos e protocolos / editado por Benny KC Lo; Benny KC II Série: Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ)).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0053] A Figura 1 mostra a ligação e a atividade citotóxica de diacorpos em tandem contendo diferentes domínios anti-CD3. 1 células Raji (A) CD humano, CD3 humano + células Jurkat e cynomolgus CD3 + células HSC-F foram coradas em gelo com 10 Pg iriL em tandem diacorpo TandAb B, que contém o domínio de ligação CD3 ao var W (SEQ ID NOs: 1 e 6) em combinação com um ligação ao domínio C 1. Da superfície da célula em tandem diacorpo ligado foi detectado por anti-Mis mAb seguido por IgG de cabra conjugado com FITC anti-ratinho. A média de intensidades de fluorescência determinadas por

citometria de fluxo foram modeladas como dose-resposta sigmoidal por regressão não-linear para calcular KRJ. (B) Os valores de EC₅₀ foram determinados em ensaios de citotoxicidade com EGFRvIII labcled-calceína + células alvo F98 e PBMC como células efectoras a uma razão E:T de 50:1 com 4 h de tempo de incubação. A EC₅₀ foi calculada por regressão não linear dos dados modelados como uma curva sigmoidal.

[0054] A Figura 2 mostra a estabilidade Biophysical ensaiada por HPLC de exclusão de tamanho. TandAb L (SEQ ID NO: 14), TandAb D (SEQ ID NO: 11), e TandAb E (SEQ ID NO: 12) foram incubadas a 40 °C durante até sete (7) dias. (A) o conteúdo homodimcr conjunto diacorpo, (B) % de recuperação

[0055] A Figura 3 mostra a afinidade de ligação e de reactividade cruzada em tandem de diacorpos EGFRvIII / CD3 com domínios anti-CD3 humanizados. CD3 humano + células Jurkat (A) e cynomolgus CD3 + células HSC-F (B) foram coradas com concentrações crescentes de TandAb D (SEQ ID NO: 11) (em KRJ Jurkat = 1, 822 nM, K_D em HSC-F = 3,4 nM) e TandAb E (SEQ ID NO: 12) (K_D em Jurkat = 27,74 nM, K_j em HSC-F = 24,3 nM). Da superfície da célula em tandem diacorpo ligado foi detectado por anti-His mAb seguido por IgG de cabra conjugado com FITC anti-ratinho. Para calcular Kr significa intensidades de fluorescência determinadas por citometria de fluxo foram modeladas como dose-resposta sigmoidal por regressão não-linear.

[0056] A Figura 4 mostra a atividade citotóxica de diacorpos em tandem EGF.RvIII / CD3 com domínios anti-CD3 humanizados. Os valores de EC₅₀ foram determinados em 4 ensaios de citotoxicidade h com calceína marcada EGFRvIII empregando F98 como células alvo e PBMC como células efectoras a uma razão E: T de 50: 1. Os valores de EC₅₀ foram

calculados por regressão não linear dos dados modelados como uma curva sigmoidal.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0057] Um exemplo particular, para a geração de VH e VL composta por local de ligação a CD3 da proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a invenção é descrita no seguinte:

[0058] No primeiro passo, o VH CDR de SP34 de murino (BD Bioscience, J. Immunol Methods, 1994, 178:... 195) foram enxertados na estrutura humana mais homóloga (VH3_72 humano) de IgG1 obtendo-se um domínio de ligação quimérico composto da recém- cadeia VH e VL de murino parental λ humanizado. Os dados de ligação mostram que a molécula quimérica retinha a função. Assim, a cadeia VH humanizada não foi alterada durante os passos subsequentes de humanização para a cadeia VL.

[0059] Para a humanização da sequência murina S.P34 VL, CDR murina foram enxertadas na estrutura de VL humano com a maior homologia com a estrutura murino (humano V λ 7 7a). Construções contendo esta cadeia λ intimamente relacionados foram gerados mediante a introdução de cópias de mutações e ensaiaram-se no formato de diacorpo em tandem em combinação com um domínio de ligação a CD19. O Back-mutações foram selecionados com base na comparação de modelos do SP34 original de murino e as variantes humanizadas contendo o quadro 7a V 7; em que foram selecionados para reduzir choques estéricos e preservar doadores de anticorpos de murino conformações de CDR, quando enxertado na estrutura aceitadora humana. No entanto, todos estes diacorpos em tandem contendo cadeia λ • ou foram fracamente expresso ou não reconhece o antígeno.

[0060] Por conseguinte, um método alternativo foi

escolhido para humanizar a cadeia VL. Nesta segunda estratégia, os dados de cadeias pesadas e leves foram analisados em relação óptima de emparelhamento de cadeias pesadas e leves. O enxerto das CDR murinas para uma estrutura humana fixa (humano V κ 1 39) foi perseguido. Assim, a cadeia foi substituída cadeia ba. Verificou-se que um V 1 39 estrutura para a cadeia leve pode ser compatível com o quadro VH3 72 que foi usado para a humanização da cadeia pesada (descrito acima). Em seguida, testou-se se a utilização do V κ uma 39 estrutura em combinação com os VH3 72 Quadro de resultados de um Fv com um melhor emparelhamento VL / VH, e poderia originar um domínio humanizado com uma boa estabilidade, expressão, e outras propriedades biofísicas.

[0061] Vários diacorpos em tandem foram gerados contendo quer um pequeno conjunto de mutações individuais ou suas combinações. As Back-mutações foram selecionadas para reduzir os confrontos estéricos e preservar as configurações de CDR de anticorpos de murino doadores quando enxertado na estrutura aceitadora humana. Surpreendentemente, as proteínas de ligação de antígeno contendo cadeia · demonstrado propriedades superiores com expressão aceitável e que se ligam a CD3 humano e *cynomolgus*. Com base nas suas propriedades biofísicas e funcionais, bem como os respectivos rendimentos de expressão, o V domínios de ligação var _w foi identificado como sendo o candidato mais promissor, e, portanto, foi selecionado para posterior desenvolvimento. A estabilidade inicial de var w poderia ser significativamente melhorada, seguindo mutações em VL: D72 -T72, K73 → D73 e A74 - F74 que resultou em candidato var x.

[0062] Durante as etapas sucessivas de humanizar a ligação CD3 domínio, var_w e var_x foram combinados com

medidas diferentes anti-CD 19, ou seja, anti-EGFRvIII, anti-EpCAM e anti-CD30, locais de ligação ao antígeno para ensaiar a capacidade destes dois variantes para emparelhar com vários sites de antígeno anti-tumoriais. Combinação de var W e X var com estes sítios de ligação ao alvo de tumor resultou bem expressar e diacorpos em tandem estáveis que exibiram tanto a citotoxicidade mediada por células T e de ligação ao alvo. A Figura 1A ilustra a actividade de ligação de TandAb B, um anticorpo contendo a ligação CD3 ao domínios var_w em combinação com um domínio de ligação ao CD1, medido por citometria de fluxo. As afinidades de ligação (PK) de TandAb B ao CD de 19 expressar linha de células humanas Raji, uma linhagem humana CD3¹ de células T (Jiirkat) e um CDS cinomolgos -expressing linha de células (HSC-F) são mostrados. Reatividade cruzada foi observada, sem diferenças substanciais na ligação (Q) para cinomolgos e CDS humanos. Na Figura 1B, um ensaio de citotoxicidade é apresentado, em que o diacorpos em tandem conter domínios de ligação de CD3 var W ou X var em combinação com um domínio de ligação de EGF VIII. A linha celular que expressa o EGFRvIII-F98 foi eficientemente lisadas em um ensaio de citotoxicidade de quatro horas (rotulagem calceína) utilizando PBMC humanas como células efectoras. Tandem diacorpo lise celular mediada pelo alvo pelo var W contendo TandAb L (SEQ ID NO: 14) era comparável ao de um controlo TandAb F (SEQ ID NO: 13) contendo o domínio de ligação de CD3 murino de SP34.

[0063] Sequência e análise de modelagem de clones var w e var x descobriu um papel crucial para os aminoácidos em posições VH 111 e VL49 (que contactar directamente entre si de acordo com o modelo) para as propriedades de ligação e estabilidade destas variantes em diacorpos em tandem. Várias

mutações distintas foram introduzidas nestas posições, e ensaiadas individualmente ou em diacorpos em tandem em combinação com um domínio de ligação ao EGFRvIII. Na posição de VHL 1 1 as mutações eram de W em T, Q, N, S, F, Y, R ou H; na posição VL49 as mutações eram de G para A, V, S, T ou N. Todos os diacorpos em tandem resultantes foram ensaiadas quanto à suas propriedades de ligação, a citotoxicidade, e estabilidade.

[0064] A mutação do VHL 11 de W para Y e VL49 de G para A criou o CD3 domínio de ligação var_y, enquanto que uma única mutação da BVS 1 1 de W para H rendeu o var_z de domínio; estes domínios de ligação produzidos os diacorpos em tandem TandAb D (var_y) (SEQ ID NO: 1) e 1 TandAb E (var_z) (SEQ ID NO: 12), que exibiu propriedades melhoradas de estabilidade em relação ao var_w parental. BVS 11 ocupa uma posição especial em CDRH3 que, de acordo com rale 's Shirai (Kuroda et al, 2008, Proteínas, 73: 608), determina se a conformação adoptada pela CDRH3 é estendido ou quebrada. Ele resultou das experiências que as substituições admissíveis para o W nesta posição deve conter grandes anéis aromáticos, tais como F, Y ou H; de outro modo uma perda de ligação está previsto. Além disso, o contacto directo modelado de VL49 com a coluna vertebral nas imediações do VH 11 também coloca restrições significativas sobre a natureza dos resíduos admissíveis. Utilizando cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) para controlar o teor de diacorpo homodímero em tandem, uma estabilidade melhorada 7 dias a 40 ° C foi observado para estas proteínas. Ambos os clones demonstrou aumento do teor desejado em tandem diacorpo homodímero, em relação ao TandAb L (SEQ ID NO: 14) contendo a var_w parental, assim como uma melhoria na recuperação. As Figuras 2A e 2B ilustram a

estabilidade de TandAb D (SEQ ID NO: 1 1), TandAb E (SEQ ID NO: 12), e TandAb L (SEQ ID NO: 14) durante 7 dias a 40 ° C.

[0065] Surpreendentemente, os ensaios funcionais demonstraram também que a actividade e a citotoxicidade destes diacorpos em tandem de ligação foi retida. As Figuras 3A e 3B presente ligação de diacorpos em tandem tituladas TandAb D, contendo var *y*, e TandAb E (SEQ ID NO: 12), contendo var_z, a uma CD3 + T linha celular humana (Jurkat) e de uma CD3 + linha celular cinomolgo (HSC-F), como determinado por análise de citometria de fluxo. KJJ valores foram calculados por regressão não-linear, e encontram-se resumidos nas tabelas abaixo. Afinidades de ligação comparáveis foram observados para CD3 humano e cinomolgo, indicando a reactividade cruzada do domínio de ligação de CD3. TandAb D (SEQ ID NO: 1 1) demonstraram > 10 vezes maior afinidade para CD3 humano (K_i 1,8 nM) do que a TandAb E (D=27.7 nM) (SEQ ID NO: 12).

[0066] TandAb D (SEQ ID NO: 11), contendo var *y*, e o seu antecessor TandAb L (SEQ ID NO: 14), contendo var *W*, foram directamente comparadas em um ensaio de citotoxicidade de libertação de calceina 4 h com o EG FR v 11! -expressi linha celular F98 ng, utilizados como células alvo, e as PBMC humano, utilizado como células efectoras. células alvo de lise induzida por ambos os anticorpos foi observada de um modo dependente da concentração, e exibiu uma potência comparável (TandAb EC50 G-T 29 M, CE50 = D TandAb 122pM). As curvas de titulação são mostradas na Figura 4.

[0067] Em resumo, a partir do clone de murino SP34, as cadeias VH e VL foram sujeitos a uma etapa de humanização por enxerto de CDR. A estabilidade das moléculas humanizadas foi ainda aumentada em diacorpos em tandem por mutações

pontuais dos resíduos de estrutura, e selecção das substituições que preservou a actividade de ligação e de citotoxicidade. Os dois otimizado CD3 domínios, var var z y e vinculativa, demonstrou muito boa reactividade cruzada com cinomolgos CD3. As afinidades de destino dos domínios optimizadas diferiam em, aproximadamente, 10 vezes, permitindo a geração de diacorpos em tandem com diferentes afinidades para o recrutamento de células T. As sequências de aminoácidos de VH e VL de domínios alinhados a ligação ao CD3 (Var_y e var_z), os dois intermediários (var_w e var_x), e o clone murino parental (SP34) são apresentados na

Tabela 1.

Tabela 1: alinhamento de sequências de aminoácidos das cadeias VH e VL de clones relevantes gerados no decurso da humanização / optimização. VH humanizado da cadeia em relação à sequência de murino são destacadas em itálico e sublinhadas. As mutações de volta na VL das sequências germline humanos para a sequência de murino são destacadas em itálico e sublinhadas. CDRs estão em negrito e sublinhadas.

SP34 variante humanizada	Sequência identificadora	Sequência de cadeia leve
var_w	SEQ ID NO:1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> W <u>VQQKPGKAPK</u> <u>GLI</u> <u>G</u> <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGS <u>LIGDKA</u> TLTISSLQ PEDFATYYC <u>ALWYSNLWV</u> FGQGKVEIK
Var_x	SEQ ID NO:2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> W <u>VQQKPGKAPK</u> <u>GLI</u> <u>G</u> <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGS <u>LIGDKA</u> TLTISSLQ PEDFATYYC <u>ALWYSNLWV</u> FGQGKVEIK
Var_y	SEQ ID NO:3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> W <u>VQQKPGKAPK</u> <u>KALI</u> <u>G</u> <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGS <u>LIGDKA</u> TLTISSLQ PEDFATYYC <u>ALWYSNLWV</u> FGQGKVEIK
Var_z	SEQ ID NO:4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> W <u>VQQKPGKAPK</u> <u>GLI</u> <u>G</u> <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGS <u>LIGDKA</u> TLTISSLQ PEDFATYYC <u>ALWYSNLWV</u> FGQGKVEIK
murine SP34	SEQ ID NO:5	QAVVTQESALTSPGETVTLTC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQEKPDLHFTGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQT EDEAIYFC <u>ALWYSNLWV</u> FGGGTKLTVL

SP34 variante humanizada	Sequência identificadora	Sequência de cadeia pesada
var_w	SEQ ID NO:6	EVQLVESGGGLVQP G SL R SCAASGFTF S TYAMN WVRQAPGKGLEWV <u>RIRSKYNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDS <u>KNSLY</u> LQMN S LKTEDTA V YCAR HGNFGNSYVSWFAY WGQGTLTVSS
Var_x	SEQ ID NO:7	EVQLVESGGGLVQP G SL R SCAASGFTF S TYAMN WVRQAPGKGLEWV <u>RIRSKYNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDS <u>KNSLY</u> LQMN S LKTEDTA V YCAR HGNFGNSYVSWFAY WGQGTLTVSS
Var_y	SEQ ID NO:8	EVQLVESGGGLVQP G SL R SCAASGFTF S TYAMN WVRQAPGKGLEWV <u>RIRSKYNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDS <u>KNSLY</u> LQMN S LKTEDTA V YCAR HGNFGNSYVSWFAY WGQGTLTVSS
Var_z	SEQ ID NO:9	EVQLVESGGGLVQP G SL R SCAASGFTF S TYAMN WVRQAPGKGLEWV <u>RIRSKYNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDS <u>KNSLY</u> LQMN S LKTEDTA V YCAR HGNFGNSYVSWFAY WGQGTLTVSS
Murine SP34	SEQ ID NO:10	EVQLVESGGGLVQP K GS L SCAASGFTF N TYAMN WVRQAPGKGLEWV <u>RIRSKYNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDS <u>KNSLY</u> LQMN N LKTEDTAM Y YCAR HGNFGNSYVSWFAY WGQGTLTVSS

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação ao antígeno **caracterizada pelo** fato de que compreende, pelo menos, um local de ligação de CD3, em que o local de ligação de CD3 compreende:

(a) um domínio variável de cadeia pesada (VH) como representado na SEQ ID NO: 6 e um domínio variável de cadeia leve (VL) como representado na SEQ ID NO: 1; ou

(b) um domínio variável de cadeia pesada (VH) como representado em SEQ ID NO: 7 e um domínio variável de cadeia leve (VL) tal como representado em SEQ ID NO: 2; ou

(c) um domínio variável de cadeia pesada (VH), como representado na SEQ ID NO: 8 e um domínio variável de cadeia leve (VL) conforme descrito na SEQ ID NO: 3; ou

(d) um domínio variável de cadeia pesada (VH), como representado na SEQ ID NO: 9 e um domínio variável de cadeia leve (VL) conforme descrito na SEQ ID NO: 4; ou

(e) um domínio variável de cadeia pesada (VH) incorporando 1 a 5 substituições conservativas de aminoácidos em comparação com a VH como descrito na SEQ ID NO: 8, em que o resíduo de aminoácido na posição 111 é Y ou H, e um domínio variável de cadeia leve (VL) incorporando 1 a 5 substituições conservativas de aminoácidos em relação ao VL, conforme definida na SEQ ID NO: 3, em que o resíduo de aminoácido na posição 49 é G ou A; e

a proteína de ligação ao antígeno de (a), (b), (c), (d) ou (e) não é uma proteína de ligação biespecífica que se liga especificamente ao CD33 humano e CD3 humano, em que o local de ligação de CD3 compreende um domínio variável da cadeia leve anti-CD3 selecionado a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1 - 3 e um domínio variável de cadeia pesada anti-CD3 selecionado a partir do grupo

consistindo nas SEQ ID NOs: 6 - 8.

2. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de ligação ao antígeno não é um diacorpo biespecífico em tandem que se liga a CD33 e CD3.

3. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada pelo** fato de que a proteína compreende pelo menos um outro domínio funcional.

4. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo** fato de que o pelo menos um outro domínio funcional é um outro local de ligação ao antígeno.

5. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pelo** fato de que o outro local de ligação ao antígeno é específico para uma célula tumoral.

6. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que o local de ligação ao antígeno adicional não é específico para CD33.

7. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de ligação ao antígeno é multivalente.

8. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de ligação ao antígeno é multiespecífica.

9. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de ligação ao antígeno é multimérica.

10. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de ligação ao antígeno é dimérica, compreendendo um primeiro polipeptídeo e um segundo polipeptídeo, cada um polipeptídeo

possuindo pelo menos quatro domínios variáveis de cadeia ligados um após o outro, em que a proteína de ligação ao antígeno comprehende pelo menos um local de ligação a CD3 conforme definido pela reivindicação 1 e pelo menos um local de ligação ao antígeno específico para um segundo antígeno.

11. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo** fato de que cada polipeptídeo tem, pelo menos, quatro domínios variáveis fundidos um com o outro por ligantes peptídicos L1, L2 e L3 na ordem de:

- (i) VL (CD3)-L1-VH (segundo antígeno)-L2-VL (segundo antígeno) -L3-VH (CD3) ;
- (ii) VH (CD3)-L1-VL (segundo antígeno)-L2-VH (segundo antígeno)-L3-VL (CD3) ;
- (iii) VL (segundo antígeno)-L1-VH (CD3)-L2-VL (CD3)-L3-VH (segundo antígeno); ou
- (iv) VH (segundo antígeno)-L1-VL (CD3)-L2-VH (CD3)-L3-VL (segundo antígeno) .

12. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo** fato de que os ligantes L1, L2 e L3 consistem de cerca de 12 ou menos resíduos de aminoácidos.

13. Composição farmacêutica **caracterizada pelo** fato de que comprehende (i) a proteína de ligação ao antígeno conforme definida por qualquer uma das reivindicações 1 a 12 e (ii) um veículo farmaceuticamente aceitável.

14. Proteína de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 **caracterizada pelo** fato de que é para utilização como um medicamento.

Ligaçāo a células CD3⁺ humana e Cyno
(Média e DP de 2 experimentos independentes que são plotados)

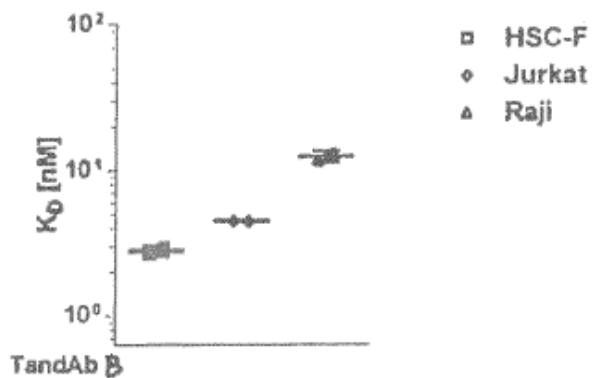


FIGURA 1A

Potência em alvos EGFRvIII F98
(4 h de liberação de calceína; PBMC como efetores; E:T 50:1;
Média e DP de 2 experimentos independentes que são plotados)

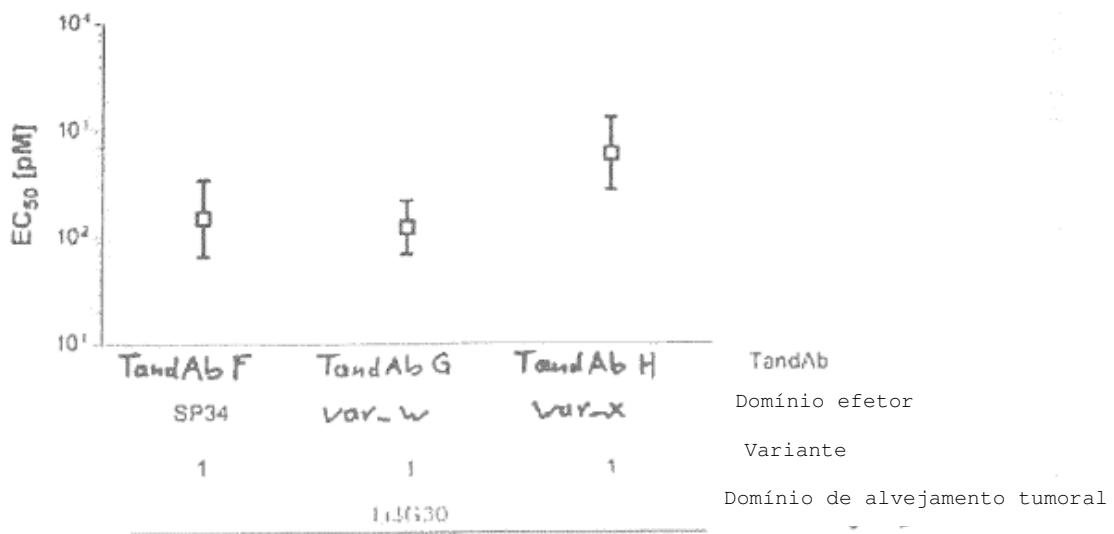
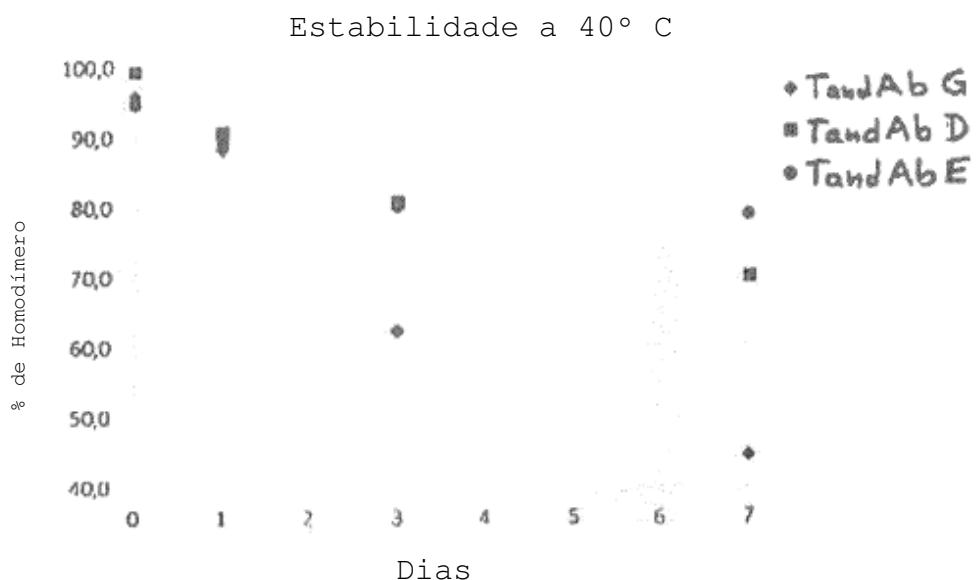
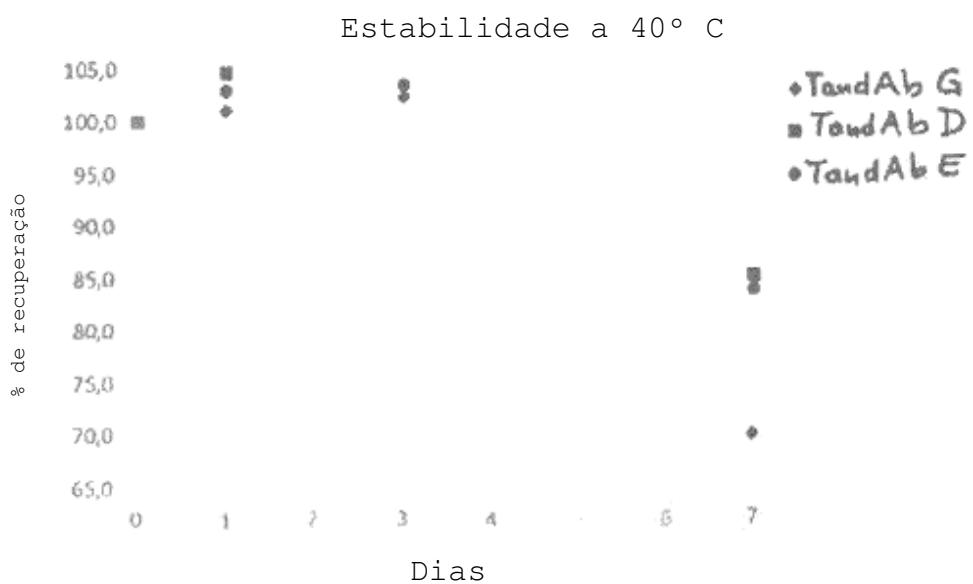


FIGURA 1B

**FIGURA 2A****FIGURA 2B**

Titulação de EGFR_{VIII} X TandsAbs CD3 em jukart no gelo

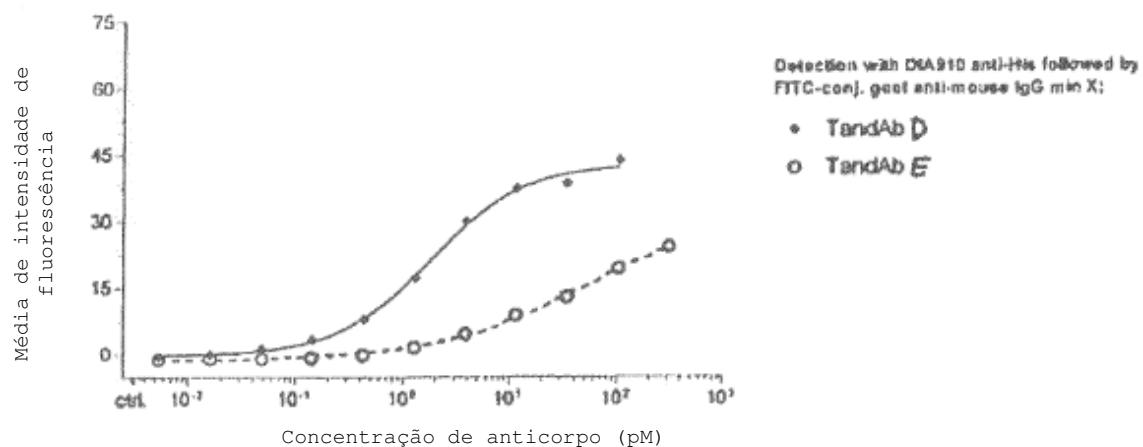


FIGURA 3A

Titulação de EGFR_{VIII} X TandsAbs CD3 em HSC-F no gelo

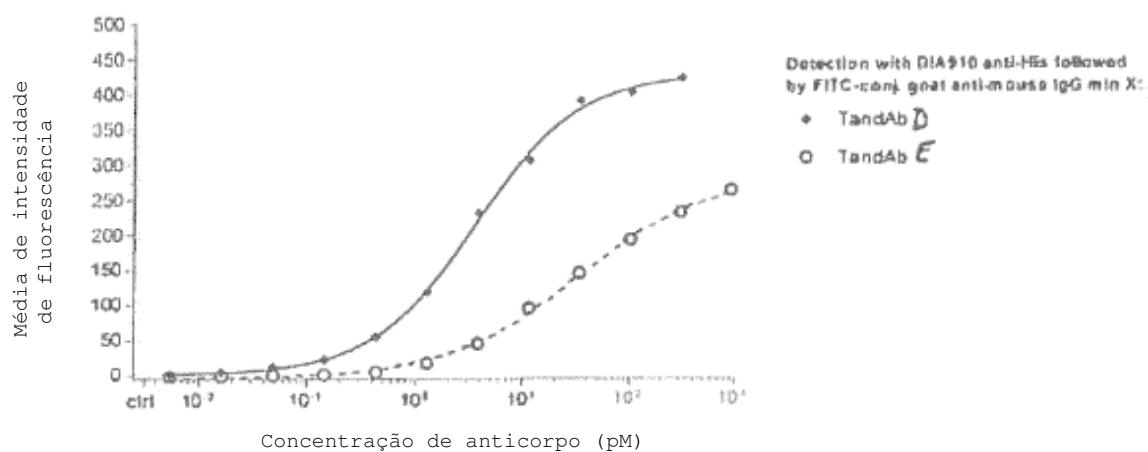


FIGURA 3B

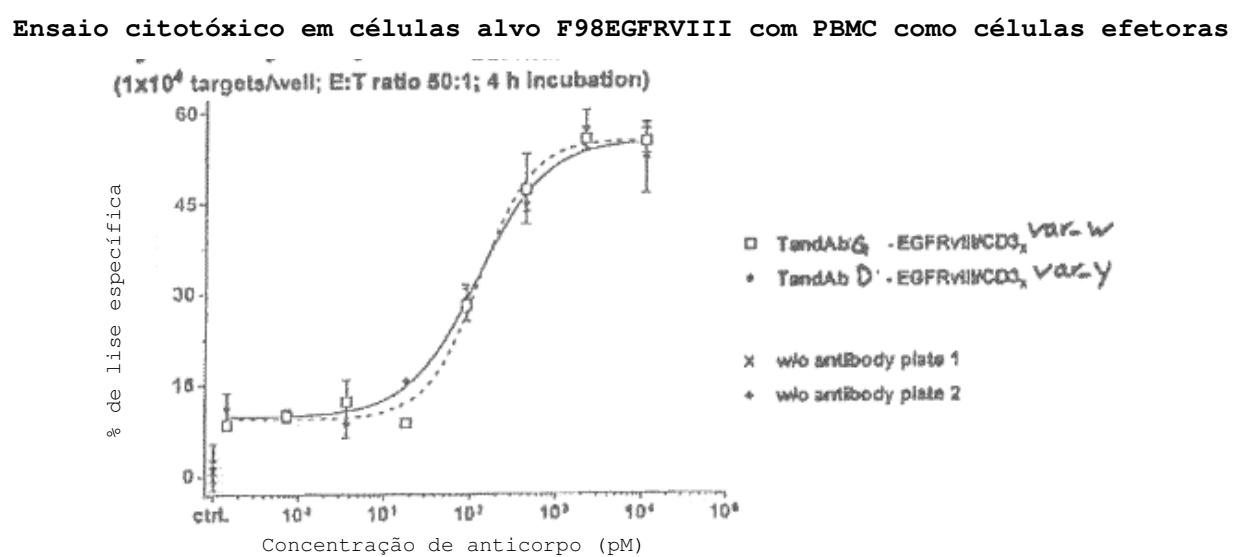


FIGURA 4