



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

(21) BR 112021000392-4 A2



(22) Data do Depósito: 11/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 06/04/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO FC-ANTÍGENO MANIPULADOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/395.

(30) **Prioridade Unionista:** 11/07/2018 US 62/696,618.

(71) **Depositante(es):** MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC..

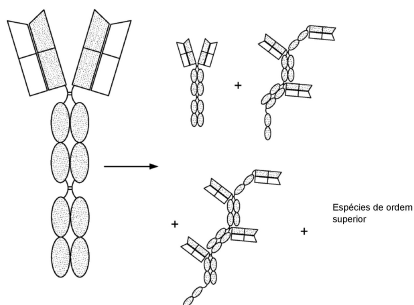
(72) **Inventor(es):** JONATHAN C. LANSING; DANIEL ORTIZ.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019041406 de 11/07/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/014486 de 16/01/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 11/01/2021

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO FC-ANTÍGENO MANIPULADOS. A presente divulgação se refere a composições e métodos de construtos do domínio de ligação Fc-antígeno manipulados, em que os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno incluem pelo menos dois domínios Fc e pelo menos um domínio de ligação ao antígeno.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS
DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO FC-ANTÍGENO MANIPULADOS".**

Fundamentos da Divulgação

[001] Muitos anticorpos terapêuticos funcionam recrutando elementos do sistema imune inato por meio da função efetora dos domínios Fc, como citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Continua a haver necessidade de proteínas terapêuticas melhoradas.

Sumário da Divulgação

[002] A presente divulgação apresenta composições e métodos para combinar a especificidade ao alvo de um domínio de ligação ao antígeno com pelo menos dois domínios Fc para gerar novas terapêuticas com atividade biológica única. As composições e métodos descritos neste documento permitem a construção de proteínas com múltiplos domínios de ligação ao antígeno e múltiplos domínios Fc a partir de múltiplas cadeias polipeptídicas. O número e o espaçamento dos domínios de ligação ao antígeno podem ser ajustados para alterar as propriedades de ligação (por exemplo, avidéz de ligação) dos complexos de proteína para antígenos alvo, e o número de domínios Fc pode ser ajustado para controlar a magnitude das funções efectoras para eliminar células de ligação ao antígeno. Mutações (isto é, mutações de heterodimerização e/ou homodimerização, conforme descrito neste documento) são introduzidas nos polipeptídeos para reduzir o número de proteínas indesejadas, alternativamente montadas, que são produzidas. Em alguns casos, mutações de heterodimerização e/ou homodimerização são introduzidas nos monômeros do domínio Fc, e monômeros do domínio Fc diferencialmente mutados são colocados entre as diferentes cadeias polipeptídicas que se montam na proteína,

de modo a controlar a montagem das cadeias polipeptídicas na estrutura da proteína desejada. Estas mutações estabilizam seletivamente o pareamento desejado de certos monômeros do domínio Fc e desestabilizam seletivamente os pareamentos indesejados de outros monômeros do domínio Fc. Em alguns casos, os construtos de domínio de ligação Fc-antígeno são construtos de domínio de ligação Fc-antígeno "ortogonais" que são formados por um primeiro polipeptídeo contendo monômeros do domínio Fc múltiplos, em que pelo menos dois dos monômeros de Fc contêm diferentes mutações de heterodimerização (e, assim, diferem um do outro na sequência), por exemplo, um polipeptídeo mais longo com dois ou mais monômeros de Fc com diferentes mutações de heterodimerização, e pelo menos dois polipeptídeos adicionais que contêm pelo menos um monômero de Fc, em que os monômeros de Fc dos polipeptídeos adicionais contêm diferentes mutações de heterodimerização entre si (e, portanto, sequências diferentes), por exemplo, dois polipeptídeos mais curtos em que cada um contém um único monômero do domínio Fc com diferentes mutações de heterodimerização. As mutações de heterodimerização dos polipeptídeos adicionais são compatíveis com as mutações de heterodimerização de pelo menos do monômero de Fc do primeiro polipeptídeo.

[003] Em alguns casos, a presente divulgação contempla a combinação de um domínio de ligação ao antígeno de uma proteína terapêutica com um domínio Fc, por exemplo, um anticorpo terapêutico, com pelo menos dois domínios Fc para gerar um novo construto terapêutico. Para gerar tais construtos, a divulgação fornece vários métodos para a montagem de construtos com pelo menos dois, por exemplo, múltiplos, domínios Fc, e para controlar a homodimerização e heterodimerização de tais, para montar moléculas de tamanho discreto a partir de um número limitado de cadeias polipeptídicas, cujos

polipeptídeos também são objeto da presente divulgação. As propriedades desses construtos permitem a geração eficiente de composições farmacêuticas substancialmente homogêneas. Essa homogeneidade em uma composição farmacêutica é desejável a fim de garantir a segurança, eficácia, uniformidade e confiabilidade da composição farmacêutica. Em algumas modalidades, os novos construtos terapêuticos com pelo menos dois domínios Fc descritos neste documento têm uma atividade biológica que é maior do que a de uma proteína terapêutica com um único domínio Fc.

[004] Em um primeiro aspecto, a divulgação apresenta um construto de domínio de ligação Fc-antígeno incluindo pelo menos um domínio de ligação ao antígeno e um primeiro domínio Fc unido a um segundo domínio Fc por um ligante. Em algumas modalidades, o construto de ligação Fc-antígeno inclui função efetora aprimorada, em que o construto de domínio de ligação Fc-antígeno inclui pelo menos um domínio de ligação ao antígeno e um primeiro domínio Fc unido a um segundo domínio Fc por um ligante, onde o construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem função efetora aumentada em um ensaio de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), uma fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), e/ou ensaio de citotoxicidade dependente do complemento (CDC) em relação a um construto com um único domínio Fc e o domínio de ligação ao antígeno.

[005] Em um aspecto, a divulgação refere-se a um polipeptídeo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno; um ligante; um primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3; um segundo ligante; um segundo monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3; um terceiro ligante opcional; e um terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 opcional compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um

domínio CH3, em que pelo menos um monômero do domínio Fc compreende mutações que formam uma protuberância manipulada, e em que pelo menos um outro monômero do domínio Fc compreende pelo menos uma, duas ou três mutações e carga inversa.

[006] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo e, opcionalmente, um domínio CH1. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia leve do anticorpo.

[007] Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreende mutações que formam uma protuberância manipulada e o segundo monômero do domínio Fc de IgG1 compreende pelo menos duas mutações de carga inversa.

[008] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um terceiro ligante e um terceiro monômero do domínio Fc de IgG1, em que o primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreende mutações que formam uma protuberância manipulada. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um terceiro ligante e um terceiro monômero do domínio Fc de IgG1, em que o primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreende mutações que formam uma protuberância manipulada e tanto o segundo monômero do domínio Fc de IgG1 quanto o terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreendem, cada um, pelo menos duas mutações de carga inversa.

[009] Em algumas modalidades os monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo que compreendem mutações de carga inversa possuem mutações de carga inversa idênticas. Em algumas modalidades, os monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo compreendendo mutações que formam uma protuberância manipulada compreendem adicionalmente pelo menos uma mutação de carga inversa. Em algumas modalidades, os monômeros do domínio Fc de

IgG1 do polipeptídeo compreendendo mutações que formam uma protuberância manipulada e pelo menos uma mutação de carga inversa compreendem uma mutação de carga inversa que é diferente da(s) mutação(ões) de carga inversa dos monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo que compreendem mutações de carga inversa, mas nenhuma mutação formadora de protuberância.

[0010] Em algumas modalidades, as mutações que formam uma protuberância manipulada e as mutações de carga inversa estão no domínio CH3. Em algumas modalidades, as mutações estão dentro da sequência da posição EU G341 à posição EU K447, estes inclusos. Em algumas modalidades, as mutações são alterações de único aminoácido.

[0011] Em algumas modalidades, o segundo ligante e o terceiro ligante opcional compreendem ou consistem em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGG, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG e GGGGGGGGGGGGGGGGGGG. Em algumas modalidades, o segundo ligante e o terceiro ligante opcional são um espaçador de glicina. Em algumas modalidades, o segundo ligante e o terceiro ligante opcional consistem, independentemente, em 4 a 30, 4 a 20, 8 a 30, 8 a 20, 12 a 20 ou 12 a 30 resíduos de glicina. Em algumas

modalidades, o segundo ligante e o terceiro ligante opcional consistem em 20 resíduos de glicina.

[0012] Em algumas modalidades, pelo menos um dos monômeros do domínio Fc compreende uma mutação de único aminoácido na posição EU I253. Em algumas modalidades, cada mutação de aminoácido na posição EU I253 é independentemente selecionada do grupo consistindo em I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W, e I253Y. Em algumas modalidades, cada mutação de aminoácidos na posição I253 é I253A.

[0013] Em algumas modalidades, pelo menos um dos monômeros do domínio Fc compreende uma mutação de único aminoácido na posição EU R292. Em algumas modalidades, cada mutação de aminoácido na posição EU R292 é independentemente selecionada do grupo que consiste em R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T, e R292Y. Em algumas modalidades, cada mutação de aminoácidos na posição R292 é R292P.

[0014] Em algumas modalidades, a dobradiça de cada monômero do domínio Fc compreende ou consiste independentemente em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em EPKSCDKTHTCPPCPAPELL e DKTHTCPPCPAPELL. Em algumas modalidades, a porção de dobradiça do segundo monômero do domínio Fc e o terceiro monômero do domínio Fc têm a sequência de aminoácidos DKTHTCPPCPAPELL. Em algumas modalidades, a porção de dobradiça do primeiro monômero do domínio Fc tem a sequência de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPEL. Em algumas modalidades, porção de dobradiça do primeiro monômero do domínio Fc possui a sequência de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPEL e a porção de dobradiça do segundo monômero do domínio Fc, a sequência de aminoácidos DKTHTCPPCPAPELL. Em algumas modalidades, a

porção de dobradiça do primeiro monômero do domínio Fc tem a sequência de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPEL e a porção de dobradiça do segundo monômero do domínio Fc e do terceiro monômero do domínio Fc têm a sequência de aminoácidos DKTHTCPPCPAPELL.

[0015] Em algumas modalidades, os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos:

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK com no máximo duas deleções ou substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc são idênticos e compreendem a sequência de aminoácidos:

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK com no máximo duas deleções ou substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc são idênticos e compreendem a sequência de aminoácidos:

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK com no máximo duas substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc são idênticos e compreendem a sequência de aminoácidos:

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK.

[0016] Em algumas modalidades, os domínios CH3 de cada

monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 10 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, os domínios CH3 de cada

monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 8 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, os domínios CH3 de cada

monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 6 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, os domínios CH3 de cada

monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 5 substituições de único aminoácido.

[0017] Em algumas modalidades, as substituições de único aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em: S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

[0018] Em algumas modalidades, cada um dos monômeros do

domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs:42, 43, 45 e 47, tendo até 10 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, até 6 das substituições de único aminoácido são mutações de carga inversa no domínio CH3 ou são mutações que formam uma protuberância manipulada. Em algumas modalidades, as substituições de único aminoácido estão dentro da sequência da posição EU G341 para a posição EU K447, estes inclusos.

[0019] Em algumas modalidades, pelo menos uma das mutações que formam uma protuberância manipulada é selecionada a partir do grupo que consiste em S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T e T394F. Em algumas modalidades, pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada a partir de: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

[0020] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um scFv. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende ainda um domínio VL. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas na Tabela 1A e 1B. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio VH compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2, e a sequência de VH, excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% ou 98% idêntica à sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de VH de um anticorpo indicado na

Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 indicadas na Tabela 1A e 1B. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de um conjunto de sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2, e um domínio VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de uma sequência de VL de um anticorpo indicado na Tabela 2, em que as sequências do domínio VH e VL, excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, são pelo menos 95% ou 98% idênticas às sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de uma sequência de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio constante de anticorpo CL de IgG e um domínio constante de anticorpo CH1 de IgG. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1 e pode se ligar a um polipeptídeo compreendendo um domínio VL e um domínio CL para formar um Fab.

[0021] Em outro aspecto, um complexo de polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores é unido a um segundo polipeptídeo compreendendo um monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3, em que o polipeptídeo e o segundo polipeptídeo são unidos por ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína no domínio dobradiça do primeiro,

segundo ou terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo e o domínio dobradiça do segundo polipeptídeo.

[0022] Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende mutações formando uma cavidade manipulada. Em algumas modalidades, as mutações que formam a cavidade manipulada são selecionadas do grupo que consiste em: Y407T, Y407A, F405A, T394S, T394W/Y407A, T366W/T394S, T366S/L368A/Y407V/Y349C, S364H/F405A. Em algumas modalidades, as mutações que formam a cavidade manipulada são T366S/L368A/Y407V/Y349C73. Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende ainda pelo menos uma mutação de carga inversa. Em algumas modalidades, a pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada a partir de: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K. Em algumas modalidades, a pelo menos uma mutação de carga inversa é K370D. Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende mutações T366S, L368A, Y407V, Y349C e K370D.

[0023] Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende ainda um domínio de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia leve do anticorpo. Em algumas modalidades, onde o domínio de ligação ao antígeno é um scFv. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende ainda um domínio VL. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas na Tabela 1A e 1B. Em algumas

modalidades, o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio VH compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2, e a sequência de VH, excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% ou 98% idêntica à sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 indicadas na Tabela 1A e 1B. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de um conjunto de sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2, e um domínio VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de uma sequência de VL de um anticorpo indicado na Tabela 2, em que as sequências do domínio VH e VL, excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, são pelo menos 95% ou 98% idênticas às sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de uma sequência de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio constante de anticorpo CL de IgG e um domínio constante de anticorpo CH1 de IgG. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1 e pode se ligar a um polipeptídeo

compreendendo um domínio VL e um domínio CL para formar um Fab.

[0024] Em algumas modalidades, o complexo polipeptídico se une ainda a um terceiro polipeptídeo compreendendo um monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3, em que o polipeptídeo e o terceiro polipeptídeo são unidos por ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína no domínio dobradiça do primeiro, segundo ou terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo e o domínio dobradiça do terceiro polipeptídeo, em que o segundo e o terceiro polipeptídeos se unem a diferentes monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo.

[0025] Em algumas modalidades, o terceiro monômero polipeptídico compreende ainda pelo menos duas mutações de carga inversa. Em algumas modalidades, as pelo menos duas mutações de carga inversa são selecionadas a partir de: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

[0026] Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende pelo menos uma mutação de carga inversa selecionada do grupo que consiste em K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K e o terceiro monômero polipeptídico compreende pelo menos duas mutações de carga inversa selecionadas a partir do grupo que consiste em K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K, em que o segundo e o terceiro monômeros polipeptídicos compreendem diferentes mutações de carga inversa.

[0027] Em algumas modalidades, o segundo polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47, tendo até 10 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, o terceiro polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47, tendo até 10 substituições de único aminoácido.

[0028] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende dois monômeros de Fc, em que um monômero de Fc compreendendo mutações S354C e T366W e um monômero de Fc compreendendo mutações D356K e D399K. Em algumas modalidades, o monômero de Fc compreendendo mutações S354C e T366W compreende ainda uma mutação E357K.

[0029] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende três monômeros de Fc, em que um monômero de Fc compreendendo mutações S354C e T366W e dois monômeros de Fc compreendendo, cada um, as mutações D356K e D399K. Em algumas modalidades, o monômero de Fc compreendendo mutações S354C e T366W compreende ainda uma mutação E357K.

[0030] Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende mutações Y349C, T366S, L368A, e Y407V. Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende ainda uma mutação K370D. Em algumas modalidades, o terceiro monômero polipeptídico compreende mutações K392D e K409D. Em algumas modalidades, o segundo monômero polipeptídico compreende mutações Y349C, T366S, L368A, Y407V, e K370D e o terceiro monômero polipeptídico compreende mutações K392D e K409D. Em algumas modalidades, o complexo polipeptídico compreende função efetora potencializada em um ensaio de citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC), um ensaio de fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) e/ou ensaio de citotoxicidade dependente do complemento (CDC) em relação a um complexo polipeptídico que possui um único domínio Fc e pelo menos um domínio de ligação ao antígeno.

[0031] Em outro aspecto, a divulgação se refere a um construto de domínio de ligação Fc-antígeno compreendendo: a) um primeiro polipeptídeo compreendendo i) um primeiro monômero do domínio Fc,

ii) um segundo monômero do domínio Fc e iii) um ligante unindo o primeiro monômero do domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc; b) um segundo polipeptídeo compreendendo um terceiro monômero do domínio Fc; c) um terceiro polipeptídeo compreendendo um quarto monômero do domínio Fc; e d) um domínio de ligação ao antígeno unido ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo; em que o primeiro monômero do domínio Fc e o terceiro monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc.

[0032] Em algumas modalidades, o ligante compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG e GGGGGGGGGGGGGGGGGGG.

[0033] Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc compreende mutações que formam uma protuberância manipulada e o segundo monômero do domínio Fc compreende pelo menos duas mutações de carga inversa. Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc compreende ainda pelo menos uma mutação de carga inversa. Em algumas modalidades, as mutações são alterações de único aminoácido. Em algumas modalidades, cada um

dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs:42, 43, 45 e 47, tendo até 10 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, até 6 das substituições de único aminoácido são mutações de carga inversa no domínio CH3 ou são mutações que formam uma protuberância manipulada. Em algumas modalidades, as substituições de único aminoácido estão na sequência da posição EU G341 à posição EU K447, com estas inclusas. Em algumas modalidades, pelo menos uma das mutações que formam uma protuberância manipulada é selecionada a partir do grupo que consiste em S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T e T394F. Em algumas modalidades, pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada a partir de: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K. Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc compreende mutações S354C, T366W e E357K e o segundo monômero do domínio Fc compreende mutações D356K e D399K. Em algumas modalidades, o terceiro monômero do domínio Fc compreende mutações Y349C, T366S, L368A, Y407V e K370D. Em algumas modalidades, o quarto monômero do domínio Fc compreende mutações K392D e K409D.

[0034] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um Fab. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um scFv. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio V_H e um domínio C_H1. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende ainda um domínio V_L. Em algumas modalidades, o construto de domínio de ligação Fc-antígeno compreende um quarto polipeptídeo compreendendo o domínio V_L. Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-

H3 indicadas na Tabela 1A e 1B. Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio V_H compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, e o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2, e a sequência de V_H , excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% idêntica à sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2.

[0035] Em outro aspecto, a divulgação fornece um construto de domínio de ligação Fc-antígeno compreendendo: a) um primeiro polipeptídeo compreendendo i) um primeiro monômero do domínio Fc; ii) um segundo monômero do domínio Fc; e iii) um terceiro monômero do domínio Fc, iii) um ligante unindo o primeiro monômero do domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc, e iv) um ligante unido o segundo monômero do domínio Fc ao terceiro monômero do domínio Fc; b) um segundo polipeptídeo compreendendo um quarto monômero do domínio Fc; c) um terceiro polipeptídeo compreendendo um quinto monômero do domínio Fc; e d) um domínio de ligação ao antígeno ligado ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo; em que o primeiro monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc; em que o segundo monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um segundo monômero do domínio Fc, e em que o terceiro monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc.

[0036] Em algumas modalidades, o ligante compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG,

GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS,
 GGSGGS, GGSGGS, GGSGGS, GGSGGS, GGSG, GGSG,
 GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS,
 GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH,
 GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
 AAANSSIDLISVPVDSR,
 GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS,
 GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG,
 GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG,
 GGGGGGGGGGGG e GGGGGGGGGGGGGGGGGG.

[0037] Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc compreende mutações que formam uma protuberância manipulada e o segundo e o terceiro monômeros do domínio Fc compreendem pelo menos duas mutações de carga inversa. Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc compreende ainda pelo menos uma mutação de carga inversa. Em algumas modalidades, as mutações são alterações de único aminoácido. Em algumas modalidades, cada um dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs:42, 43, 45 e 47, tendo até 10 substituições de único aminoácido. Em algumas modalidades, até 6 das substituições de único aminoácido são mutações de carga inversa no domínio CH3 ou são mutações que formam uma protuberância manipulada. Em algumas modalidades, as substituições de único aminoácido estão na sequência da posição EU G341 à posição EU K447, com estas inclusas. Em algumas modalidades, pelo menos uma das mutações que formam uma protuberância manipulada é selecionada a partir do grupo que consiste em S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T e T394F. Em algumas modalidades, pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada a partir de: K409D, K409E,

K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K. Em algumas modalidades, o primeiro monômero do domínio Fc compreende as mutações S354C, T366W e E357K e o segundo e o terceiro monômeros do domínio Fc compreendem, cada um, as mutações D356K e D399K. Em algumas modalidades, o quarto monômero do domínio Fc compreende mutações Y349C, T366S, L368A, Y407V e K370D. Em algumas modalidades, o quinto monômero do domínio Fc compreende mutações K392D e K409D.

[0038] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um Fab. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um scFv. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio V_H e um domínio C_H1 . Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno compreende ainda um domínio V_L . Em algumas modalidades, o construto de domínio de ligação Fc-antígeno compreende um quarto polipeptídeo compreendendo o domínio V_L . Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas na Tabela 1A e 1B. Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio V_H compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2, e a sequência de V_H , excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% idêntica à sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio V_H compreende uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2.

[0039] Em um outro aspecto, a divulgação refere-se a um método de produzir um construto de domínio de ligação Fc-antígeno, o método compreendendo: a) a cultura de uma célula hospedeira: (1) um primeiro

polipeptídeo que compreende i) um primeiro monômero do domínio Fc, ii) um segundo monômero do domínio Fc, e iii) um ligante que une o primeiro monômero do domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc; (2) um segundo polipeptídeo que compreende um terceiro monômero do domínio Fc; (3) um terceiro polipeptídeo que compreende um quarto monômero do domínio Fc; e (4) um domínio de ligação ao antígeno; em que o primeiro monômero do domínio Fc e o terceiro monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar a um segundo domínio Fc; em que o domínio de ligação ao antígeno é ligado ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo, formando assim um construto de domínio de ligação Fc-antígeno; e b) a purificação do construto de domínio de ligação Fc-antígeno do sobrenadante da cultura celular.

[0040] Em algumas modalidades, pelo menos 50% dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno no sobrenadante da cultura celular, em uma base molar, são estruturalmente idênticos.

[0041] Em um outro aspecto, a divulgação refere-se a um método de produzir um construto de domínio de ligação Fc-antígeno, o método compreendendo: a) a cultura de uma célula hospedeira: (1) um primeiro polipeptídeo que compreende i) um primeiro monômero do domínio Fc, ii) um segundo monômero do domínio Fc, iii) um terceiro monômero do domínio Fc, iv) um ligante que une o primeiro monômero do domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc; v) um ligante que une o segundo monômero do domínio Fc ao terceiro monômero do domínio Fc; (2) um segundo polipeptídeo que compreende um quarto monômero do domínio Fc; (3) um terceiro polipeptídeo que compreende um quinto monômero do domínio Fc; e (4) um domínio de ligação ao antígeno; em que o primeiro monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o

segundo monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar a um segundo domínio Fc; e o terceiro monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc; em que o domínio de ligação ao antígeno é ligado ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo, formando assim um construto de domínio de ligação Fc-antígeno; e b) a purificação do construto de domínio de ligação Fc-antígeno do sobrenadante da cultura celular.

[0042] Em algumas modalidades, pelo menos 50% dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno no sobrenadante da cultura celular, em uma base molar, são estruturalmente idênticos.

[0043] Em todos os aspectos da divulgação, alguns ou todos monômeros do domínio Fc (por exemplo, um monômero do domínio Fc que compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs; 42, 43, 45 e 47 tendo não mais de 10, 8, 6 ou 4 substituições de único aminoácido (por exemplo, no domínio CH3 somente) podem ter uma ou ambas as substituições de aminoácido E345K e de E43G além das outras substituições ou modificações de aminoácido. As substituições de aminoácidos E345K e E43G podem aumentar a multimerização do domínio Fc.

Definições:

[0044] Conforme usado neste documento, o termo "monômero do domínio Fc" refere-se a uma cadeia polipeptídica que inclui pelo menos um domínio dobradiça e segundo e terceiro domínios constantes de anticorpo (C_{H2} e C_{H3}) ou seus fragmentos funcionais (por exemplo, pelo menos um domínio dobradiça ou um fragmento funcional deste, um domínio CH2 ou um fragmento funcional deste, e um domínio CH3 ou um fragmento funcional deste) (por exemplo, fragmentos que são capazes de (i) dimerizar com outro monômero do domínio Fc para formar um domínio Fc, e (ii) se ligar a um receptor Fc). Um monômero

do domínio Fc preferido compreende, de terminais amino a carbóxi, pelo menos uma porção da dobradiça IgG1, um domínio CH2 de IgG1 e um domínio CH3 de IgG1. Assim, um monômero do domínio Fc, por exemplo, monômero do domínio Fc humano de IgG1 pode se estender de E316 a G446 ou K447, de P317 a G446 ou K447, de K318 a G446 ou K447, de K318 a G446 ou K447, de S319 a G446 ou K447, de C320 a G446 ou K447, de D321 a G446 ou K447, de K322 a G446 ou K447, de T323 a G446 ou K447, de K323 a G446 ou K447, de H324 a G446 ou K447, de T325 a G446 ou K447, ou de C326 a G446 ou K447. O monômero do domínio Fc pode ser qualquer isotipo de anticorpo imunoglobulina, incluindo IgG, IgE, IgM, IgA, ou IgD (por exemplo, IgG). Adicionalmente, o monômero do domínio Fc pode ser um subtipo de IgG (por exemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, ou IgG4) (por exemplo, IgG1 humano). O monômero do domínio de IgG1 humano é usado nos exemplos descritos neste documento. O domínio dobradiça completo do IgG1 humano estende-se de E316 a P230 ou L235, o domínio CH2 estende-se de A231 ou G236 a K340 e o domínio CH3 estende-se de G341 a K447 da Numeração EU. Há diferentes visões da posição do último aminoácido do domínio dobradiça. É P230 ou L235. Em muitos exemplos deste documento, o domínio CH3 não inclui K347. Assim, um domínio CH3 pode ser de G341 a G446. Em muitos exemplos deste documento, um domínio dobradiça pode incluir E216 a L235. Isto é verdadeiro, por exemplo, quando a dobradiça é de terminal carbóxi a um domínio CH1 ou a um domínio de ligação CD38. Em algum caso, por exemplo quando a dobradiça está no terminal amino de um polipeptídeo, o Asp na Numeração EU 221 é mutado a Gln. Um monômero do domínio Fc não inclui nenhuma porção de uma imunoglobulina que seja capaz de atuar como uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável ou uma região determinante de complementariedade (CDR).. Os monômeros do

domínio Fc podem conter tantas quantas dez alterações de uma sequência de monômero do domínio Fc do tipo selvagem (por exemplo, humano) (por exemplo, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 substituições, adições ou deleções de aminoácidos) que podem alterar a interação entre um domínio Fc e um receptor Fc. Os monômeros do domínio Fc podem conter tantas quantas dez alterações (por exemplo, alterações de único aminoácido) de uma sequência de monômero do domínio Fc do tipo selvagem (por exemplo, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 substituições, adições ou deleções de aminoácidos) que podem alterar a interação entre monômeros do domínio Fc. Em certas modalidades, existem até 10, 8, 6 ou 5 substituições de único aminoácido no domínio CH3 em comparação com a sequência de domínio CH3 de IgG1 humano: GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG. Exemplos de alterações adequadas são conhecidos na técnica.

[0045] Conforme usado neste documento, o termo "domínio Fc" refere-se a um dímero de dois monômeros do domínio Fc que são capazes de se ligar a um receptor Fc. No domínio Fc do tipo selvagem, os dois monômeros do domínio Fc se dimerizam pela interação entre os dois domínios constantes de anticorpo C_H3, bem como por uma ou mais ligações dissulfeto que se formam entre os domínios dobradiça dos dois monômeros do domínio Fc dimerizantes.

[0046] Na presente divulgação, o termo "construto de domínio de ligação Fc-antígeno" refere-se às cadeias polipeptídicas associadas que formam pelo menos dois domínios Fc conforme descritos neste documento e que incluem pelo menos um do "domínio de ligação ao antígeno". Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento podem incluir monômeros do domínio Fc que têm sequências iguais ou diferentes. Por exemplo, um construto de domínio

de ligação Fc-antígeno pode ter três domínios Fc, dois dos quais incluem IgG1 ou monômeros do domínio Fc derivados de IgG1, e um terceiro que inclui IgG2 ou monômeros do domínio Fc derivados de IgG2. Em outro exemplo não limitante, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode ter três domínios Fc, dois deles incluem um "par protuberância-na-cavidade" (também conhecido como "par knobs into holes") e um terceiro que não inclui um "par protuberância-na-cavidade", por exemplo, o terceiro domínio Fc inclui uma ou mais mutações de direção eletrostática em vez de um par de protuberância-na-cavidade, ou o terceiro domínio Fc tem uma sequência tipo selvagem (ou seja, não inclui mutações). Um domínio Fc forma a estrutura mínima que se liga a um receptor Fc, por exemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb ou FcγRIV. Em alguns casos, os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno são construtos do domínio de ligação Fc-antígeno "ortogonais" que são formadas pela junção de um primeiro polipeptídeo contendo vários monômeros do domínio Fc, em que pelo menos dois dos monômeros de Fc contêm diferentes mutações de heterodimerização (ou seja, os monômeros de Fc cada um tem diferentes mutações de formação de protuberância ou cada um tem diferentes mutações de direção eletrostática, ou um monômero tem mutações formadoras de protuberância e um monômero tem mutações de direção eletrostáticas), a pelo menos dois polipeptídeos adicionais que cada um contém pelo menos um monômero de Fc, em que os monômeros de Fc dos polipeptídeos adicionais contêm diferentes mutações de heterodimerização entre si (ou seja, os monômeros de Fc dos polipeptídeos adicionais têm diferentes mutações de formação de protuberância ou têm diferentes mutações de direção eletrostática, ou um monômero tem mutações formadoras de protuberância e um monômero tem mutações de direção eletrostáticas). As mutações de heterodimerização dos polipeptídeos adicionais se associam de forma

compatível com as mutações de heterodimerização de pelo menos do monômero de Fc do primeiro polipeptídeo.

[0047] Conforme usado neste documento, o termo "domínio de ligação ao antígeno" refere-se a um peptídeo, um polipeptídeo ou um conjunto de polipeptídeos associados que é capaz de ligar especificamente a uma molécula alvo. Em algumas modalidades, o "domínio de ligação ao antígeno" é a sequência mínima de um anticorpo que se liga com especificidade ao antígeno ligado pelo anticorpo. A ressonância plasmônica de superfície (SPR) ou vários imunoenaios conhecidos na técnica, por exemplo, Western Blots ou ELISAs, podem ser usados para avaliar a especificidade de anticorpos para um antígeno. Em algumas modalidades, o "domínio de ligação ao antígeno" inclui um domínio variável ou uma região determinante de complementaridade (CDR) de um anticorpo, por exemplo, uma ou mais CDRs de um anticorpo indicado na Tabela 1A e 1B, uma ou mais CDRs de um anticorpo indicado na Tabela 2, ou os domínios de VH e/ou VL de um anticorpo indicado na Tabela 2. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno pode incluir um domínio de VH e um domínio CH1, opcionalmente com um domínio de VL. Em outras modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um fragmento Fab de um anticorpo ou um scFv. Um domínio de ligação ao antígeno também pode ser um peptídeo manipulado sinteticamente que se liga a um alvo especificamente, como uma proteína de ligação baseada em fibronectina (por exemplo, um monocorpo de domínio tipo III de fibronectina (FN3)).

[0048] Conforme usado neste documento, o termo "Regiões Determinante de Complementaridade" (CDRs) refere-se aos resíduos de aminoácidos de um domínio variável de anticorpos que são necessários para a ligação ao antígeno. Cada domínio variável normalmente tem três regiões de CDR identificadas como CDR-L1,

CDR-L2 e CDR-L3, e CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3). Cada região determinante de complementaridade pode incluir resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" definida por Kabat (ou seja, por volta dos resíduos 24-34 (CDR-L1), 50-56 (CDR-L2) e 89-97 (CDR-L3) no domínio variável da cadeia leve e 31-35 (CDR-H1), 50-65 (CDR-H2) e 95-102 (CDR-H3) no domínio variável da cadeia pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou esses resíduos de uma "alça hipervariável" (ou seja, por volta dos resíduos 26-32 (CDR-L1), 50-52 (CDR-L2) e 91-96 (CDR-L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (CDR-H1), 53-55 (CDR-H2) e 96-101 (CDR-H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Em alguns casos, uma região determinante de complementaridade pode incluir aminoácidos de uma região de CDR definida de acordo com Kabat e uma alça hipervariável.

[0049] "Regiões framework" (doravante FR) são aqueles resíduos de domínio variável que não os resíduos de CDR. Cada domínio variável normalmente tem quatro FRs identificados como FR1, FR2, FR3 e FR4. Se as CDRs forem definidas de acordo com Kabat, os resíduos FR da cadeia leve são posicionados por volta dos resíduos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) e 98-107 (LCFR4) e os resíduos FR da cadeia pesada estão posicionados por volta dos resíduos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) e 103-113 (HCFR4) nos resíduos da cadeia pesada. Se as CDRs incluem resíduos de alças hipervariáveis, os resíduos FR da cadeia leve são posicionados por volta dos resíduos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) e 97-107 (LCFR4) na cadeia leve e os resíduos FR da cadeia pesada são posicionados por volta dos resíduos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) e 102-113 (HCFR4) nos resíduos da

cadeia pesada. Em alguns casos, quando a CDR inclui aminoácidos tanto de uma CDR conforme definido por Kabat quanto os de uma alça hipervariável, os resíduos FR serão ajustados em conformidade.

[0050] Um fragmento "Fv" é um fragmento de anticorpo que contém um reconhecimento completo de antígeno e sítio de ligação. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e uma leve em associação apertada, que pode ser covalente por natureza, por exemplo, em um scFv. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação ao antígeno na superfície do dímero de V_H - V_L .

[0051] O fragmento "Fab" contém um domínio variável e constante da cadeia leve e um domínio variável e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ incluem um par de fragmentos Fab que são geralmente ligados covalentemente perto de seu terminal carbóxi por cisteínas de dobradiça.

[0052] Os fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia única" ou "scFv" incluem os domínios de anticorpos V_H e V_L em uma única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo scFv inclui ainda um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L , o que permite que o scFv forme a estrutura desejada para a ligação ao antígeno.

[0053] Conforme usado neste documento, o termo "domínio constante de anticorpo" refere-se a um polipeptídeo que corresponde a um domínio de região constante de um anticorpo (por exemplo, um domínio constante de anticorpo C_L , um domínio constante de anticorpo C_{H1} , um domínio constante de anticorpo C_{H2} , ou um domínio constante de anticorpo C_{H3}).

[0054] Conforme usado neste documento, o termo "promover" significa estimular e favorecer, por exemplo, favorecer a formação de um domínio Fc a partir de dois monômeros do domínio Fc que tenham maior afinidade de ligação entre si do que por outros monômeros do

domínio Fc distintos. Conforme descrito neste documento, dois monômeros do domínio Fc que se combinam para formar um domínio Fc podem ter modificações de aminoácido compatíveis (por exemplo, protuberâncias manipuladas e cavidades manipuladas, e/ou mutações de direção eletrostáticas) na interface de seus respectivos domínios constantes de anticorpo C_H3. As modificações de aminoácido compatíveis promovem ou favorecem a interação seletiva desses monômeros do domínio Fc entre si em relação a outros monômeros do domínio Fc que não possuem essas modificações de aminoácido ou que possuam modificações de aminoácido incompatíveis. Isto ocorre porque, devido às modificações de aminoácido na interface dos dois domínios constantes de anticorpo C_H3 interativos, os monômeros do domínio Fc têm uma maior afinidade entre si do que em relação a outros monômeros do domínio Fc que não possuem modificações de aminoácido.

[0055] Conforme usado neste documento, o termo "módulo de seletividade de dimerização" refere-se a uma sequência do monômero do domínio Fc que facilita o pareamento favorizado entre dois monômeros do domínio Fc. Módulos de seletividade de dimerização "complementares" são módulos de seletividade de dimerização que promovem ou favorecem a interação de dois monômeros do domínio Fc entre si. Módulos de seletividade de dimerização complementares podem ter sequências iguais ou diferentes. Módulos de seletividade de dimerização complementares são descritos neste documento, e podem incluir mutações de complementariedade selecionadas das mutações formadoras de protuberância e formadoras de cavidade manipulada da Tabela 3 ou as mutações de direção eletrostáticas da Tabela 4.

[0056] Conforme usado neste documento, o termo "cavidade manipulada" refere-se à substituição de pelo menos um dos resíduos de aminoácido originais no domínio constante de anticorpo C_H3 por um

resíduo de aminoácido diferente tendo um volume de cadeia lateral menor do que o resíduo de aminoácido original, criando, assim, uma cavidade tridimensional no domínio constante de anticorpo C_{H3}. O termo "resíduo de aminoácido original" refere-se a um resíduo de aminoácido de ocorrência natural codificado pelo código genético de um domínio constante de anticorpo C_{H3} do tipo selvagem. Uma cavidade manipulada pode ser formada por, por exemplo, qualquer um ou mais das mutações de substituição formadora de cavidade da Tabela 3.

[0057] Conforme usado neste documento, o termo "protuberância manipulada" refere-se à substituição de pelo menos um dos resíduos de aminoácido originais no domínio constante de anticorpo C_{H3} por um resíduo de aminoácido diferente tendo um volume de cadeia lateral maior do que o resíduo de aminoácido original, criando, assim, uma protuberância tridimensional no domínio constante de anticorpo C_{H3}. O termo "resíduos de aminoácido originais" refere-se a resíduos de aminoácido de ocorrência natural codificados pelo código genético de um domínio constante de anticorpo C_{H3} do tipo selvagem. Uma protuberância manipulada pode ser formada por, por exemplo, qualquer um ou mais das mutações de substituição formadora de protuberância da Tabela 3.

[0058] Conforme usado neste documento, o termo "par de protuberância-na-cavidade" descreve um domínio Fc que inclui dois monômeros do domínio Fc, em que o primeiro monômero do domínio Fc inclui uma cavidade manipulada em seu domínio constante de anticorpo C_{H3}, enquanto o segundo monômero do domínio Fc inclui uma protuberância manipulada em seu domínio constante de anticorpo C_{H3}. Em um par de protuberância-em-cavidade, a protuberância manipulada no domínio constante de anticorpo C_{H3} do primeiro monômero do domínio Fc é posicionada de modo que interaja com a cavidade manipulada do domínio constante de anticorpo C_{H3} do segundo

monômero do domínio Fc sem perturbar significativamente a associação normal do dímero na interface de domínio constante de anticorpo inter-C_H3. Um par de protuberância-em-cavidade pode incluir, por exemplo, um par complementar de qualquer uma ou mais mutações de substituição formadora de cavidade e qualquer uma ou mais mutações de substituição formadora de protuberância da Tabela 3.

[0059] Conforme usado neste documento, o termo "domínio Fc heterodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela heterodimerização de dois monômeros do domínio Fc, em que os dois monômeros do domínio Fc contêm mutações de carga inversa diferentes (ver, por exemplo, mutações na Tabela 4) que promovem a formação favorável desses monômeros do domínio Fc.

[0060] Conforme usado neste documento, o termo "estruturalmente idêntico", em referência a uma população de construtos do domínio de ligação Fc-antígeno, refere-se a construtos que são conjuntos das mesmas sequências polipeptídicas na mesma proporção e configuração e não se refere a qualquer modificação pós-tradução, tal como glicosilação.

[0061] Conforme usado neste documento, o termo "domínio Fc homodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela homodimerização de dois monômeros do domínio Fc, em que os dois monômeros do domínio Fc contêm as mesmas mutações de carga inversa (ver, por exemplo, mutações nas Tabelas 5 e 6).

[0062] Conforme usado neste documento, o termo "módulo de seletividade de heterodimerização" refere-se a protuberâncias manipuladas, cavidades manipuladas, e certas substituições de aminoácido de carga inversa que podem ser feitas nos domínios constantes de anticorpo C_H3 dos monômeros do domínio Fc a fim de promover a heterodimerização favorável de dois monômeros do domínio Fc que tenham módulos de seletividade de heterodimerização

compatíveis. Os monômeros do domínio Fc contendo módulos de seletividade de heterodimerização podem ser combinar para formar um domínio Fc heterodimérico. Exemplos de módulos de seletividade de heterodimerização são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

[0063] Conforme usado neste documento, o termo "módulo de seletividade de homodimerização" refere-se a mutações de carga inversa em um monômero do domínio Fc em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface dentre domínios C_H3 que promovem a homodimerização do monômero do domínio Fc para formar um domínio Fc. Por exemplo, as mutações de carga inversa que formam um módulo de seletividade de homodimerização podem estar em pelo menos dois aminoácidos das posições 357, 370, 399 e/ou 409 (pela numeração EU), que estão dentro do anel de resíduos carregados na interface entre domínios CH₃. Exemplos de módulos de seletividade de homodimerização são mostrados nas Tabelas 4 e 5.

[0064] Conforme usado neste documento, o termo "unido" é usado para descrever a combinação ou a ligação de dois ou mais elementos, componentes, ou domínios proteicos, por exemplo, polipeptídeos, por meios incluindo conjugação química, meios recombinantes e ligações químicas, por exemplo, ligações peptídicas, ligações dissulfeto e ligações amida. Por exemplo, dois polipeptídeos únicos podem ser unidos para formar uma estrutura proteica contígua através de conjugação química, uma ligação química, um ligante peptídico, ou quaisquer outros meios de ligação covalente. Em algumas modalidades, um domínio de ligação ao antígeno é unido a um monômero do domínio Fc sendo expresso a partir de uma sequência de ácido nucleico contígua que codifica o domínio de ligação ao antígeno e o monômero do domínio Fc. Em outras modalidades, um domínio de ligação ao antígeno é ligado a um monômero do domínio Fc por meio de um ligante peptídico, em que o terminal N do ligante peptídico é unido ao terminal

C do primeiro domínio de ligação ao antígeno através de uma ligação química, por exemplo, uma ligação peptídica, e o terminal C do ligante peptídico é unido ao terminal N do segundo monômero do domínio Fc através de uma ligação química, por exemplo, uma ligação peptídica.

[0065] Conforme usado neste documento, o termo "associado" é usado para descrever a interação, por exemplo, ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica, ou interação iônica, entre polipeptídeos (ou sequências dentro de um único polipeptídeo) de modo que os polipeptídeos (ou sequências dentro de um único polipeptídeo) sejam posicionados para formar um construto de domínio de ligação Fc-antígeno descrito neste documento (por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc). Por exemplo, em algumas modalidades, quatro polipeptídeos, por exemplo, dois polipeptídeos incluindo, cada um, dois monômeros do domínio Fc, e dois polipeptídeos incluindo, cada um, um monômero do domínio Fc se associam para formar um construto de Fc que tem três domínios Fc (por exemplo, conforme descrito na FIGS. 50 e 51). Os quatro polipeptídeos podem se associar através de seus respectivos monômeros do domínio Fc. A associação entre polipeptídeos não inclui interações covalentes.

[0066] Conforme usado neste documento, o termo "ligante" refere-se a uma ligação entre dois elementos, por exemplo, domínios proteicos. Um ligante pode ser uma ligação covalente ou um espaçador. O termo "ligação" refere-se a uma ligação química, por exemplo, uma ligação amida ou uma ligação dissulfeto, ou qualquer tipo de ligação criada a partir de uma reação química, por exemplo, conjugação química. O termo "espaçador" refere-se a uma fração (por exemplo, um polímero de polietilenoglicol (PEG)) ou uma sequência de aminoácidos (por exemplo, uma sequência de 3-200 aminoácidos, 3-150 aminoácidos ou 3-100 aminoácidos) ocorrendo entre dois polipeptídeos ou domínios polipeptídicos para fornecer espaço e/ou flexibilidade entre

os dois polipeptídeos ou domínios polipeptídicos. Um espaçador de aminoácidos é parte da sequência primária de um polipeptídeo (por exemplo, unido aos polipeptídeos espaçados ou domínios polipeptídicos através da estrutura principal do polipeptídeo). A formação de ligações dissulfeto, por exemplo, entre duas regiões de dobradiça ou dois monômeros do domínio Fc que formam um domínio Fc, não é considerada um ligante.

[0067] Conforme usado neste documento, o termo "espaçador de glicina" refere-se a um ligante contendo apenas glicinas que unem dois monômeros do domínio Fc em série tandem. Um espaçador de glicina pode conter pelo menos 4, 8 ou 12 glicinas (por exemplo, 4-30, 8-30, 12-30 glicinas; por exemplo, 12-30, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 glicinas). Em algumas modalidades, um espaçador de glicina possui a sequência de GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27). Conforme usado neste documento, o termo "peptídeo de ligação à albumina" refere-se a uma sequência de aminoácidos de 12 a 16 aminoácidos que tem afinidade por e funciona para ligar a albumina sérica. Um peptídeo de ligação à albumina pode ser de diferentes origens, por exemplo, humana, de camundongo, ou de rato. Em algumas modalidades da presente divulgação, um peptídeo de ligação à albumina é fundido ao terminal C de um monômero do domínio Fc para aumentar a meia-vida sérica do construto de domínio de ligação Fc-antígeno. Um peptídeo de ligação à albumina pode ser fundido, diretamente ou através de um ligante, ao terminal N ou C de um monômero do domínio Fc.

[0068] Conforme usado neste documento, o termo "peptídeo de purificação" refere-se a um peptídeo de qualquer comprimento que pode ser usado para purificação, isolamento, ou identificação de um polipeptídeo. Um peptídeo de purificação pode ser unido a um polipeptídeo para auxiliar na purificação do polipeptídeo e/ou isolamento

do polipeptídeo, por exemplo, de uma mistura de lisado celular. Em algumas modalidades, o peptídeo de purificação se liga a outra fração que tenha uma afinidade específica pelo peptídeo de purificação. Em algumas modalidades, essas frações que se ligam especificamente ao peptídeo de purificação estão ligadas a um suporte sólido, tal como uma matriz, uma resina, ou esferas de agarose. Exemplos de peptídeo de purificação que podem ser unidos a um construto de domínio de ligação Fc-antígeno são descritos em mais detalhes neste documento.

[0069] Conforme usado neste documento, o termo "multímero" refere-se a uma molécula que inclui pelo menos dois construtos de Fc ou construtos do domínio de ligação Fc-antígeno associados descritos neste documento.

[0070] Conforme usado neste documento, o termo "polinucleotídeo" refere-se a um oligonucleotídeo, ou nucleotídeo, e fragmentos ou porções dos mesmos, e ao DNA ou RNA de origem genômica ou sintética, que pode ser de fita simples ou dupla, e representa a fita sense ou anti-sense. Um único polinucleotídeo é traduzido em um único polipeptídeo.

[0071] Conforme usado neste documento, o termo "polipeptídeo" descreve um polímero único em que os monômeros são resíduos de aminoácidos que estão unidos através de ligações amida. Pretende-se que um polipeptídeo abranja qualquer sequência de aminoácidos, seja de ocorrência natural, recombinante ou produzida sinteticamente.

[0072] Conforme usado neste documento, o termo "posições de aminoácido" refere-se aos números de posição de aminoácidos em uma proteína ou domínio proteico. As posições de aminoácido são numeradas usando o sistema de numeração de Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 5ª ed, 1991) onde indicado (por exemplo, para regiões CDR e FR), de modo contrário é usada a numeração EU.

[0073] As FIGs. 24A-24D representam domínios Fc de IgG1 humana numerados usando o sistema de numeração EU.

[0074] As FIGs. 7A-7D representam domínios Fc de IgG1 humana numerados usando o sistema de numeração EU.

[0075] Conforme usado neste documento, o termo "modificação de aminoácido" refere-se a uma alteração de uma sequência polipeptídica do domínio Fc que, comparada com uma sequência de referência (por exemplo, uma sequência de Fc do tipo selvagem, não mutante ou não modificada), pode ter um efeito sobre as propriedades farmacocinéticas (PK) e/ou farmacodinâmicas (PD), meia-vida sérica, funções efetoras (por exemplo, lise celular (por exemplo, toxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e/ou atividade de citotoxicidade dependente do complemento (CDC)), fagocitose (por exemplo, fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) e/ou citotoxicidade celular dependente do complemento (CDCC)), ativação imunológica, e ativação de células T), afinidade por receptores Fc (por exemplo, receptores Fc-gama (FcγR) (por exemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a), e/ou FcγRIIIB (CD16b)), receptores Fc-alfa (FcαR), receptores Fc-épsilon (FcεR), e/ou receptores Fc neonatais (FcRn)), afinidade por proteínas envolvidas na cascata do complemento (por exemplo, C1q), modificações pós-traducionais (por exemplo, glicosilação, sialilação), propriedades de agregação (por exemplo, a capacidade de formar dímeros (por exemplo, homo e/ou heterodímeros) e/ou multímeros), e as propriedades biofísicas (por exemplo, altera a interação entre C_H1 e C_L, altera a estabilidade, e/ou altera a sensibilidade à temperatura e/ou ao pH) de um construto de Fc, e pode promover maior eficácia de tratamento de doenças imunológicas e inflamatórias. Uma modificação de aminoácido inclui substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos. Em algumas modalidades, uma modificação de aminoácido é a modificação

de único aminoácido. Em outra modalidade, a modificação de aminoácido é a modificação de múltiplos (por exemplo, mais de um) aminoácidos. A modificação de aminoácidos pode incluir uma combinação de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos. Incluídas na descrição de modificações de aminoácidos, estão alterações genéticas (isto é, DNA e RNA), tais como mutações pontuais (por exemplo, a troca de um único nucleotídeo por outro), inserções e deleções (por exemplo, a adição e/ou remoção de um ou mais nucleotídeos) da sequência nucleotídica que codifica um polipeptídeo Fc.

[0076] Em certas modalidades, pelo menos um (por exemplo, um, dois ou três) monômeros do domínio Fc dentro de um construto de Fc ou construto de domínio de ligação Fc-antígeno inclui uma modificação de aminoácido (por exemplo, substituição). Em alguns casos, o pelo menos um monômero do domínio Fc inclui uma ou mais (por exemplo, não mais de duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, ou vinte) modificações de aminoácido (por exemplo, substituições).

[0077] Conforme usado neste documento, o termo "identidade percentual (%)" refere-se à porcentagem de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência candidata, por exemplo, a sequência de um monômero do domínio Fc em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno descrito neste documento, que são idênticos aos resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência de referência, por exemplo, a sequência de um monômero do domínio Fc do tipo selvagem, após o alinhamento das sequências e da introdução de gaps, se necessário, para se obter a identidade percentual máxima (isto é, gaps podem ser introduzidas em uma ou em ambas as sequências candidata e de referência para um alinhamento ideal e sequência não homólogas podem ser desconsideradas para fins de comparação). O alinhamento para fins de determinação da identidade percentual pode

ser obtido de diversas formas que estejam dentro da técnica, por exemplo, usando softwares de computador disponíveis publicamente, tais como software BLAST, ALIGN, ou Megalign (DNASTAR). Os versados na técnica podem determinar os parâmetros apropriados para a medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para se obter o alinhamento máximo sobre o comprimento total das sequências sendo comparadas. Em algumas modalidades, a identidade de sequência de aminoácidos (ou ácido nucleico) percentual de uma dada sequência candidata para, com ou contra uma dada sequência de referência (que pode ser alternativamente fraseada como uma dada sequência candidata que tenha ou inclua uma certa identidade de sequência de aminoácidos (ou ácido nucleico) percentual para, com ou contra uma dada sequência de referência) é calculada como se segue:

$$100 \times (\text{fração de } A/B)$$

onde A é o número de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) marcados como idênticos no alinhamento da sequência candidata e da sequência de referência, e onde B é o número total de resíduos de aminoácidos (ou ácido nucleico) na sequência de referência. Em algumas modalidades onde o comprimento da sequência candidata não é igual ao comprimento da sequência de referência, a identidade de sequência percentual de aminoácidos (ou ácido nucleico) da sequência candidata para a sequência de referência não seria igual à identidade de sequência percentual de aminoácidos (ou ácido nucleico) da sequência de referência para a sequência candidata. Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc) pode ter uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de um monômero do domínio Fc do tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO: 42). Em algumas modalidades, um

monômero do domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc) pode ter uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 43-48 e 50-53. Em certas modalidades, um monômero do domínio Fc no construto de Fc pode ter uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência da SEQ ID NO: 48, 52 e 53.

[0078] Em algumas modalidades, um espaçador entre dois monômeros do domínio Fc pode ter uma sequência que seja pelo menos 75% idêntica (pelo menos, 75%, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99%, 99,5%, ou 100% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-36 (por exemplo, SEQ ID NOs: 17, 18, 26, e 27) descritas adicionalmente neste documento.

[0079] Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc no construto de Fc pode ter uma sequência que difira da sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42-48 e 50-53 por até 10 aminoácidos, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 aminoácidos. Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc no construto de Fc tem até 10 substituições de aminoácido em relação à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42-48 e 50-53 por exemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido.

[0080] Conforme usado neste documento, o termo "célula hospedeira" refere-se a um veículo que inclui os componentes celulares necessários, por exemplo, organelas, necessários para expressar proteínas de seus ácidos nucleicos correspondentes. Os ácidos nucleicos são normalmente incluídos em vetores de ácido nucleico que podem ser introduzidos na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas na técnica (transformação, transfecção,

eletroporação, precipitação por fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.). Uma célula hospedeira pode ser uma célula procariótica, por exemplo, uma célula bacteriana, ou uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de mamífero (por exemplo, uma célula CHO). Conforme descrito neste documento, uma célula hospedeira é usada para expressar um ou mais polipeptídeos que codificam domínios desejados que podem então se combinar para formar um construto de domínio de ligação Fc-antígeno desejado.

[0081] Conforme usado neste documento, o termo "composição farmacêutica" refere-se a uma formulação medicinal ou farmacêutica que contém um ingrediente ativo bem como um ou mais excipientes e diluentes que permitam que o ingrediente ativo seja adequado para o método de administração. A composição farmacêutica da presente divulgação inclui componentes farmacologicamente aceitáveis que sejam compatíveis com o construto de domínio de ligação Fc-antígeno. A composição farmacêutica está normalmente na forma aquosa para administração intravenosa ou subcutânea.

[0082] Conforme usado neste documento, uma "população substancialmente homogênea" de polipeptídeos ou de um construto de Fc é um no qual pelo menos 50% dos polipeptídeos ou construtos de Fc em uma composição (por exemplo, um meio de cultura celular ou uma composição farmacêutica) tem o mesmo número de domínios Fc, conforme determinado por eletroforese em gel de SDS não redutora ou cromatografia de exclusão por tamanho. Uma população substancialmente homogênea de polipeptídeos ou de um construto de Fc pode ser obtida antes da purificação, ou após a purificação da Proteína A ou Proteína G, ou após qualquer cromatografia de afinidade específica para Fab ou Fc apenas. Em várias modalidades, pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, ou 85% dos polipeptídeos ou construtos de Fc na composição têm o mesmo número de domínios Fc.

Em outras modalidades, até 85%, 90%, 92%, ou 95% dos polipeptídeos ou construtos de Fc na composição têm o mesmo número de domínios Fc.

[0083] Conforme usado neste documento, o termo "carreador farmacologicamente aceitável" refere-se a um excipiente ou diluente em uma composição farmacêutica. O carreador farmacologicamente aceitável deve ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não prejudicial ao receptor. Na presente divulgação, o carreador farmacologicamente aceitável deve fornecer estabilidade farmacêutica adequada ao construto de domínio de ligação Fc-antígeno. A natureza do carreador difere com o modo de administração. Por exemplo, para administração oral, um carreador sólido é preferencial; para administração intravenosa, um carreador de solução aquosa (por exemplo, WFI e/ou uma solução tamponada) é geralmente usado.

[0084] Conforme usado neste documento, "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade, por exemplo, dose farmacêutica, eficaz na indução de um efeito biológico desejado em um sujeito ou paciente ou no tratamento de um paciente com uma condição ou distúrbio descrito neste documento. Também é entendido neste documento que uma "quantidade terapêuticamente eficaz" pode ser interpretada como uma quantidade que proporciona um efeito terapêutico desejado, tanto tomada em uma dose quanto em qualquer dosagem ou via, tomada sozinha ou em combinação com outros agentes terapêuticos.

[0085] Conforme usado neste documento, o termo fragmento e o termo porção podem ser usados indistintamente.

Breve Descrição das Figuras

[0086] A FIG. 1 é um esquema que mostra que um construto em tandem com os dois domínios Fc (formados pela união das cadeias polipeptídicas idênticas) e algumas das espécies resultantes geradas

por associação fora do registro das sequências de Fc em tandem. Os domínios variáveis da porção de Fab (VH + VL) são representados como os paralelogramos, os domínios constantes da porção de Fab (CH1 + CL) são descritos como retângulos, os domínios da porção de Fc (CH2 e CH3) são descritos como ovais, e os dissulfetos da dobradiça são mostrados como pares de linhas paralelas.

[0087] A FIG. 2 é um esquema que mostra que um construto em tandem com os três domínios Fc conectados por ligantes peptídicos (formados pela união das cadeias polipeptídicas idênticas) e algumas das espécies resultantes geradas por associação fora do registro das sequências de Fc em tandem. Os domínios variáveis da porção de Fab (VH + VL) são representados como os paralelogramos, os domínios constantes da porção de Fab (CH1 + CL) são descritos como retângulos, os domínios da porção de Fc (CH2 e CH3) são descritos como ovais, e os dissulfetos da dobradiça são mostrados como pares de linhas paralelas.

[0088] As FIGs. 3A e 3B são esquemas de construtos de Fc com dois domínios Fc (FIG. 3A) ou três domínios Fc (FIG. 3B) conectado por ligante e montado usando domínios de heterodimerização ortogonais. Cada uma das cadeias polipeptídicas únicas é protegida diferentemente. Os domínios variáveis da porção de Fab (VH + VL) são representados como os paralelogramos, os domínios constantes da porção de Fab (CH1 + CL) são representados como retângulos, os domínios da porção de Fc (CH2 e CH3) são representados como ovais, os ligantes são mostrados como linhas tracejadas, e os dissulfetos da dobradiça são mostrados como pares de linhas paralelas. CH3 ovais são mostradas com protuberâncias para representar "knobs" e cavidades para descrever "holes" para pares de "knob-into-holes". Sinais de mais e/ou menos são usados para representar mutações de direção eletrostáticas no domínio CH3.

[0089] A FIG. 4 é uma ilustração de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno que contém dois domínios Fc e dois domínios de ligação ao antígeno. O construto é formado por três monômeros do domínio Fc contendo polipeptídeos. O primeiro polipeptídeo (4302) contém um monômero do domínio Fc com um primeiro conjunto substituições de aminoácido carregado de C_{H3} (4308) e um monômero do domínio Fc com substituições de aminoácido formadoras de protuberância opcionalmente com um segundo conjunto substituição(ões) de aminoácido carregado de C_{H3} (4306), ligados por espaçadores em uma série em tandem a um domínio de ligação ao antígeno contendo um domínio V_H (4310) no terminal N. O segundo polipeptídeo (4318) contém um monômero do domínio Fc com um conjunto de substituição(ões) de aminoácido carregado que promovem interação eletrostática favorável com o monômero do domínio Fc do primeiro polipeptídeo com o primeiro conjunto de substituições de aminoácidos carregados (4308). O terceiro polipeptídeo (4320) contém um monômero do domínio Fc com substituições de aminoácido formadoras de cavidade opcionalmente com um conjunto de substituições de aminoácido carregado de C_{H3} (4316) que promovem a interação eletrostática favorável com o monômero do domínio Fc do primeiro polipeptídeo com um segundo conjunto de substituições de aminoácido carregado (4306), ligados em uma série em tandem a um domínio de ligação ao antígeno contendo um domínio V_H (4312) no terminal N. Um domínio contendo V_L (4304, 4314) é ligado a cada domínio V_H .

[0090] A FIG. 5 é uma ilustração de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno contendo três domínios Fc e dois domínios de ligação ao antígeno. O construto é formado por quatro monômeros do domínio Fc contendo polipeptídeos. O primeiro polipeptídeo (4402) contém dois monômeros do domínio Fc com um primeiro conjunto de

substituições de aminoácido carregado de C_{H3} (4410 e 4408) e um monômero do domínio Fc com substituições de aminoácido formadoras de protuberância opcionalmente com um segundo conjunto de substituição(ões) de aminoácido carregado de C_{H3} (4406), ligados por espaçadores em uma série em tandem a um domínio de ligação ao antígeno contendo um domínio V_H (4312) no terminal N. O segundo e terceiro polipeptídeos (4422 e 4420) cada um contém um monômero do domínio Fc com um conjunto de substituição(ões) de aminoácido carregado que promovem interação eletrostática favorável com o monômero do domínio Fc do primeiro polipeptídeo com o primeiro conjunto de substituições de aminoácido carregado (4410 e 4408). O quarto polipeptídeo (4424) contém um monômero do domínio Fc com substituições de aminoácido formadoras de cavidade opcionalmente com um conjunto de substituição(ões) de aminoácido carregado de C_{H3} (4418) que promovem a interação eletrostática favorável com o monômero do domínio Fc do primeiro polipeptídeo com um segundo conjunto de substituições de aminoácido carregado (4406), ligados em uma série em tandem a um domínio de ligação ao antígeno contendo um domínio V_H (4414) no terminal N. Um domínio contendo V_L (4404, 4416) é ligado a cada domínio V_H .

[0091] A FIG. 6A-C é uma representação esquemática de três maneiras exemplares que o domínio de ligação ao antígeno pode ser ligado ao domínio Fc de um construto de Fc. A FIG. 6A mostra que um componente de cadeia pesada de um domínio de ligação ao antígeno pode ser expresso como uma proteína de fusão de uma cadeia de Fc e um componente de cadeia leve pode ser expresso como um polipeptídeo separado. A FIG. 6B mostra um scFv expresso como uma proteína de fusão da cadeia longa de Fc. A FIG. 6C mostra componentes de cadeia pesada e de cadeia leve expressos separadamente e adicionados de maneira exógena e unidos ao

construto de domínio de ligação Fc-antígeno com uma ligação química.

[0092] A FIG. 7A representa a sequência de aminoácido de um IgG1 humano (SEQ ID NO: 43) com numeração EU. A região da dobradiça é indicada por um sublinhado duplo, o domínio CH2 não é sublinhado e a região CH3 é sublinhada.

[0093] A FIG. 7B representa a sequência de aminoácido de um IgG1 humano (SEQ ID NO: 45) com numeração EU. A região da dobradiça, que não possui E216-C220, com estes inclusos, é indicada por um sublinhado duplo, o domínio CH2 não é sublinhado e a região CH3 é sublinhada e não possui K447.

[0094] A FIG. 7C representa a sequência de aminoácido de um IgG1 humano (SEQ ID NO: 47) com numeração EU. A região da dobradiça é indicada por um sublinhado duplo, o domínio CH2 não é sublinhado e a região CH3 é sublinhada e não possui 447K.

[0095] A FIG. 7D representa a sequência de aminoácido de um IgG1 humano (SEQ ID NO: 42) com numeração EU. A região da dobradiça, que não possui E216-C220, com estes inclusos, é indicada por um sublinhado duplo, o domínio CH2 não é sublinhado e a região CH3 é sublinhada.

[0096] A FIG. 8A-8B mostra que os resultados de uma análise não redutora de SDS-PAGE das proteínas secretadas nos meios do crescimento por células transfectadas com os genes que codificam os polipeptídeos que se agrupam em construtos de Fc lineares. As faixas de 200 kDa vistas na FIG. 8A pistas 1 e 2 indicam agrupamento do construto diagramado na FIG. 4 (construto 43). As faixas de 250 kD vistas nas pistas 1-3 da FIG. 8B indicam agrupamento do trímero linear diagramado na FIG. 5 (construto 44).

[0097] A FIG. 9A-9B mostra os resultados de uma análise de Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) das proteínas mostradas na FIG. 8A-8B. As proteínas secretadas nos meios do

crescimento por células transfectadas com os genes que codificam os polipeptídeos que se agrupam em construtos de Fc lineares foram purificados por Proteína A e cromatografia de afinidade da troca catiônica forte. 1 mg do dímero linear purificado (construto 43) (A) ou do trímero linear (construto 44) (B) foram então separados com base no tamanho por SEC.

[0098] A FIG. 10A-10B mostra ensaios CDC e ADCP com vários construtos anti-CD20 que direcionam células Daudi (FIG. 10A) ou Raji (FIG. 10B). A FIG. 10A mostra que os construtos lineares de S2L e de S3L medeiam CDC potencializado comparado a um anticorpo monomérico. A FIG. 10B mostra que os construtos lineares de S2L e de S3L medeiam ADCP potencializado em um ensaio do repórter.

[0099] A FIG. 11A-11C mostra que os ensaios CDC, ADCC e ADCP com vários construtos anti-PD-L1 que direcionam células humanas do carcinoma pulmonar A549 ou células HEK293 transfectadas com PD-L1. A FIG. 11A mostra que os construtos lineares S2L e S3L medeiam ADCC potencializado em comparação com um anticorpo monomérico em um ensaio do repórter (Promega) usando HEK293 transfectadas com PD-L1. A FIG. 11B mostra que os construtos lineares de S2L e S3L medeiam a eliminação potencializada de células humanas do carcinoma pulmonar em um ensaio ADCC KILR. A FIG. 11C que os construtos S2L e S3L lineares são marcadamente mais eficientes em induzir ADCP de células HEK293 transfectadas com PD-L1 em um ensaio do repórter (Promega).

Descrição Detalhada

[00100] Muitos anticorpos terapêuticos funcionam recrutando elementos do sistema imune inato por meio da função efetora dos domínios Fc, como citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Em alguns casos, a presente

divulgação contempla a combinação de um domínio de ligação ao antígeno de um domínio Fc único conhecido contendo terapêutico, por exemplo, um anticorpo terapêutico conhecido, com pelo menos dois domínios Fc para gerar um novo terapêutico com atividade biológica única. Em alguns casos, um novo terapêutico divulgado neste documento possui uma atividade biológica maior do que aquela do domínio Fc conhecido contendo terapêutico, por exemplo, um anticorpo terapêutico conhecido. A presença de pelo menos dois domínios Fc pode potencializar as funções efetoras e ativar múltiplas funções efetoras, como ADCC em combinação com ADCP e/ou CDC, aumentando assim a eficácia das moléculas terapêuticas.

[00101] Os métodos e composições descritos neste documento permitem a construção de proteínas de ligação aos antígenos com múltiplos domínios Fc, introduzindo múltiplas tecnologias de heterodimerização ortogonais (por exemplo, dois conjuntos diferentes de mutações selecionadas das Tabelas 3 e 4) nos polipeptídeos que se unem para formar a mesma proteína. Os princípios de design descritos neste documento, que introduzem múltiplas mutações de heterodimerização nos polipeptídeos que se agrupam na mesma proteína, permitem a criação de uma grande diversidade de configurações proteicas, incluindo, por exemplo, proteínas semelhantes a anticorpos com domínios Fc em tandem, proteínas simetricamente ramificadas e proteínas assimetricamente ramificadas.

[00102] Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno ortogonais descritos neste documento contêm pelo menos um domínio de ligação ao antígeno e pelo menos dois domínios Fc que são unidos por um ligante, onde pelo menos dois dos domínios Fc diferem um do outro, por exemplo, pelo menos um domínio Fc do construto é unido a um domínio de ligação ao antígeno e pelo menos um domínio Fc do construto não é unido a um domínio de ligação ao antígeno, ou dois domínios Fc do

construto são unidos a diferentes domínios de ligação ao antígeno. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno ortogonais são fabricados expressando uma cadeia peptídica longa contendo dois ou mais monômeros de Fc separados por ligantes e expressando duas ou mais cadeias peptídicas curtas diferentes que cada uma contém um único monômero de Fc que é projetado para se ligar preferencialmente a um ou mais monômeros de Fc específicos na cadeia peptídica longa. Qualquer número de domínios Fc pode ser conectado em tandem desta forma, permitindo a criação de construtos com 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais domínios Fc.

[00103] Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno ortogonais são criados usando os métodos de manipulação de Fc para a montagem de moléculas com dois ou mais domínios Fc descritos em PCT/US2018/012689 e na Publicação Internacional N° WO/2015/168643, WO2017/151971, WO 2017/205436 e WO 2017/205434, que estão incorporados neste documento por referência em sua totalidade. Os métodos de manipulação fazem uso de dois conjuntos de módulos de seletividade de heterodimerização para montar com precisão construtos do domínio de ligação Fc-antígeno ortogonais (construtos 43 e 44; FIG. 4 e FIG. 5: (i) módulos de seletividade de heterodimerização com diferentes mutações de carga inversa (Tabela 4) e (ii) módulos de seletividade de heterodimerização com cavidades e protuberâncias manipuladas (Tabela 3). Qualquer módulo de seletividade de heterodimerização pode ser incorporado em um par de monômeros de Fc projetados para se agrupar em um domínio Fc específico do construto, introduzindo substituições específicas de aminoácidos em cada polipeptídeo de monômero de Fc. Os módulos de seletividade de heterodimerização são projetados para incentivar a associação entre os monômeros de Fc tendo as substituições complementares de aminoácidos de um módulo de seletividade de

heterodimerização específico, ao mesmo tempo em que desfavoreça a associação com os monômeros de Fc tendo as mutações de um módulo de seletividade de heterodimerização diferente. Estas mutações de heterodimerização garantem a montagem dos diferentes polipeptídeos de monômeros de Fc na configuração em tandem desejada de diferentes domínios Fc de um construto com formação mínima de complexos menores ou maiores. As propriedades desses construtos permitem a geração eficiente de composições farmacêuticas substancialmente homogêneas, o que é desejável para garantir a segurança, eficácia, uniformidade e confiabilidade das composições farmacêuticas.

[00104] Em algumas modalidades, a montagem de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno ortogonal descrito neste documento pode ser realizada usando diferentes mutações de direção eletrostática entre os dois conjuntos de mutações de heterodimerização conforme descrito neste documento. Um exemplo de mutações de direção eletrostática ortogonais é E357K em um primeiro "knob" de um monômero de Fc e K370D em um primeiro "hole" de um monômero de Fc, em que esses monômeros de Fc associam-se para formar um primeiro domínio Fc, e D399K em um segundo "knob" de um monômero de Fc e K409D em um segundo "hole" de um monômero de Fc, em que esses monômeros de Fc associam-se para formar um segundo domínio Fc.

[00105] Em algumas modalidades, o construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem pelo menos dois domínios de ligação ao antígeno (por exemplo, dois, três, quatro, cinco ou seis domínios de ligação ao antígeno) com características de ligação diferentes, como diferentes afinidades de ligação (para os mesmos ou diferentes alvos) ou especificidades para diferentes moléculas alvo. Construtos biespecíficos podem ser gerados a partir das estruturas em andaime de

Fc acima nas quais dois ou mais dos polipeptídeos do construto de domínio de ligação Fc-antígeno incluem diferentes domínios de ligação ao antígeno, por exemplo, uma cadeia longa inclui um domínio de ligação ao antígeno de uma primeira especificidade e uma cadeia curta inclui um domínio de ligação ao antígeno diferente de uma segunda especificidade. Os diferentes domínios de ligação ao antígeno podem usar diferentes cadeias leves, ou uma cadeia leve comum, ou podem consistir em domínios scFv.

[00106] Construtos biespecíficos e triespecíficos podem ser gerados pelo uso de dois conjuntos diferentes de mutações de heterodimerização, ou seja, mutações de heterodimerização ortogonais. Tais sequências de heterodimerização precisam ser projetadas de tal forma que desfavoreçam a associação com as outras sequências de heterodimerização. Tais designs podem ser realizados usando diferentes mutações de direção eletrostática entre os dois conjuntos de mutações de heterodimerização, e/ou diferentes mutações protuberância-na-cavidade entre os dois conjuntos de mutações de heterodimerização, conforme descrito neste documento. Um exemplo de mutações de direção eletrostática ortogonais é E357K no primeiro "knob" Fc, K370D no primeiro "hole" Fc, D399K no segundo "knob" Fc e K409D no segundo "hole" Fc.

I. Monômeros do domínio Fc

[00107] Um monômero do domínio Fc inclui pelo menos uma porção de um domínio dobradiça, um domínio constante de anticorpos C_H2, e um domínio constante de anticorpos C_H3 (por exemplo, uma dobradiça de IgG1 humana, um domínio constante de anticorpos C_H2, e um domínio constante de anticorpos C_H3 com substituições de aminoácidos opcionais). O monômero do domínio Fc pode ser do isotipo de anticorpo imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgA, ou IgD. O monômero do domínio Fc também pode ser de qualquer isotipo de anticorpo de imunoglobulina

(por exemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, ou IgG4). Os monômeros do domínio Fc também podem ser híbridos, por exemplo, com a dobradiça e C_H2 de IgG1 e o C_H3 de IgA, e com a dobradiça e C_H2 de IgG1, mas o C_H3 de IgG3. Um dímero de monômeros do domínio Fc é um domínio Fc (posteriormente definido neste documento) que pode ser ligar a um receptor Fc, por exemplo, FcγRIIIa, que é um receptor localizado na superfície de leucócitos. Na presente divulgação, o domínio constante de anticorpo C_H3 de um monômero do domínio Fc pode conter substituições de aminoácidos na interface dos domínios constantes de anticorpo C_H3-C_H3 para promover sua associação um com outro. Em outras modalidades, um monômero do domínio Fc inclui uma fração adicional, por exemplo, um peptídeo de ligação à albumina ou um peptídeo de purificação, ligado ao terminal N ou C. Na presente divulgação, um monômero do domínio Fc não contém qualquer tipo de região variável de anticorpo, por exemplo, V_H, V_L, uma região determinante de complementariedade (CDR), ou uma região hipervariável (HVR).

[00108] Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno descrito neste documento (por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc) pode ter uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência da SEQ ID NO:42. Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno descrito neste documento (por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc) pode ter uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 43, 44, 46, 47, 48, e 50-53. Em certas modalidades, um monômero do domínio Fc no construto de domínio de ligação Fc-

antígeno pode ter uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42-53.

SEQ ID NO: 42

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 44

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 46

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 48

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
SRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 50

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGDSFFL
YSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGDSFFL
YSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 53

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

II. Domínios Fc

[00109] Conforme definido neste documento, um domínio Fc inclui dois monômeros do domínio Fc que são dimerizados pela interação entre os domínios constantes de anticorpo C_H3. Um domínio Fc forma a estrutura mínima que se liga a um receptor Fc, por exemplo, receptores Fc gama (isto é, receptores Fc_γ (Fc_γR)), receptores Fc-alfa (isto é, receptores Fc_α (Fc_αR)), receptores Fc-épsilon (isto é, receptores Fc_ε (Fc_εR)), e/ou o receptor Fc neonatal (FcR_n). Em algumas modalidades, um domínio Fc da presente divulgação se liga a um receptor Fc_γ (por

exemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIIb (CD16b)), e/ou FcγRIV e/ou o receptor Fc neonatal (FcRn).

III. Domínios de ligação ao antígeno

[00110] Um domínio de ligação ao antígeno pode ser qualquer proteína ou polipeptídeo que se ligue a uma molécula alvo específica ou conjunto de moléculas alvo. Os domínios de ligação ao antígeno incluem um ou mais peptídeos ou polipeptídeos que ligam especificamente uma molécula alvo. Os domínios de ligação ao antígeno podem incluir o domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno pode ser um fragmento de um anticorpo ou um construto de anticorpos, por exemplo, a porção mínima do anticorpo que se liga ao antígeno alvo. Um domínio de ligação ao antígeno também pode ser um peptídeo manipulado sinteticamente que se liga a um alvo especificamente, como uma proteína de ligação baseada em fibronectina (por exemplo, um monómero FN3). Em algumas modalidades, uma cápsula de domínio de ligação ao antígeno é um ligante ou receptor. Um fragmento de ligação ao antígeno (Fab) de fragmento é uma região em um anticorpo que se liga a um antígeno alvo. É composto por um domínio constante e um variável de cada uma das cadeias leve e pesada. Um fragmento Fab inclui domínios V_H, V_L, C_{H1} e C_L. Os domínios variáveis V_H e V_L cada um contêm um conjunto de 3 regiões determinantes de complementaridade (CDRs) na extremidade terminal amino do monômero. O fragmento Fab pode ser do isotipo de anticorpo de imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgA, ou IgD. O monômero do fragmento Fab também pode ser de qualquer isotipo de anticorpo de imunoglobulina (por exemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, ou IgG4). Em algumas modalidades, um fragmento Fab pode ser ligado covalentemente a um segundo fragmento Fab idêntico após o

tratamento com protease (por exemplo, pepsina) de uma imunoglobulina, formando um fragmento $F(ab')_2$. Em algumas modalidades, o Fab pode ser expresso como um único polipeptídeo, que inclui os domínios variável e constante fundidos, por exemplo, com um ligante entre os domínios.

[00111] Em algumas modalidades, apenas uma porção de um fragmento Fab pode ser usada como um domínio de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, apenas o componente de cadeia leve ($V_L + C_L$) de um Fab pode ser usado, ou apenas o componente de cadeia pesada ($V_H + C_H$) de um Fab pode ser usado. Em algumas modalidades, pode-se utilizar um fragmento variável de cadeia única (scFv), que é uma proteína de fusão das cadeias V_H e V_L da região variável Fab. Em outras modalidades, pode-se usar um anticorpo linear, que inclui um par de segmentos de Fd em tandem ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$), que, juntamente com polipeptídeos de cadeia leve complementares formam um par de regiões de ligação ao antígeno.

[00112] Os domínios de ligação ao antígeno podem ser colocados em vários números e em vários locais dentro dos polipeptídeos contendo Fc descritos neste documento. Em algumas modalidades, um ou mais domínios de ligação ao antígeno podem ser colocados no terminal N, terminal C e/ou entre os domínios Fc de um polipeptídeo contendo Fc. Em algumas modalidades, um polipeptídeo ou ligante peptídico pode ser colocado entre um domínio de ligação ao antígeno, por exemplo, um domínio Fab e um domínio Fc de um polipeptídeo contendo Fc. Em algumas modalidades, múltiplos domínios de ligação ao antígeno (por exemplo, 2, 3, 4 ou 5 ou mais domínios de ligação ao antígeno) unidos em uma série podem ser colocados em qualquer posição ao longo de uma cadeia polipeptídica (Wu et al., *Nat. Biotechnology*, 25:1290-1297, 2007).

[00113] Em algumas modalidades, dois ou mais domínios de ligação

ao antígeno podem ser colocados em várias distâncias em relação um ao outro em um domínio Fc contendo polipeptídeo ou em um complexo proteico feito de numerosos domínios Fc contendo polipeptídeos. Em algumas modalidades, dois ou mais domínios de ligação ao antígeno são colocados ao lado um do outro, por exemplo, no mesmo domínio Fc, como em um anticorpo monoclonal). Em algumas modalidades, dois ou mais domínios de ligação ao antígeno são colocados mais distantes em relação um ao outro, por exemplo, os domínios de ligação ao antígeno são separados um do outro por 1, 2, 3, 4 ou 5, ou mais domínios Fc na estrutura proteica.

[00114] Em algumas modalidades, um domínio de ligação ao antígeno da presente divulgação inclui um alvo ou antígeno listado na Tabela 1A e 1B, um, dois, três, quatro, cinco ou todas as seis sequências de CDR listadas na Tabela 1A e 1B para o alvo ou antígeno listado, conforme fornecido em mais detalhes abaixo da Tabela 1A e 1B.

Tabela 1A

Alvo	Nome do anticorpo	CDR1-IMGT (pesado)	CDR2-IMGT (pesado)	CDR3-IMGT (pesado)	CDR1-IMGT (leve)	CDR2-IMGT (leve)	CDR3-IMGT (leve)
B7-H3	Enoblitzumabe	GFTFSSFG (SEQ ID NO: 76)	ISSDSSAI (SEQ ID NO: 106)	GRGRENIYYGSRLDY (SEQ ID NO: 137)	QNVDTN (SEQ ID NO: 171)	SAS	QQYNNYPFT (SEQ ID NO: 201)
beta-amiloide	Gantenerumabe	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 77)	INASGTRT (SEQ ID NO: 107)	ARGKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 138)	QSVSSSY (SEQ ID NO: 172)	GAS	LQIYNMPIT (SEQ ID NO: 202)
CCR4	Mogamulizumabe	GFIFSNYG (SEQ ID NO: 78)	ISSASTYS (SEQ ID NO: 108)	GRHSDGNFAFGY (SEQ ID NO: 139)	RNIVHINGDTY (SEQ ID NO: 173)	KVS	FQGSLLPWT (SEQ ID NO: 203)
CD19	Inebilizumabe	GFTFSSSW (SEQ ID NO: 79)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARSGFITTVRDFDY (SEQ ID NO: 140)	ESVDTFGISF (SEQ ID NO: 174)	EAS	QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 204)
CD20	Obinutuzumabe	GYAFSYSW (SEQ ID NO: 80)	IFPGDGDT (SEQ ID NO: 110)	ARNVFDGYWLVY (SEQ ID NO: 141)	KSLLSHNGITY (SEQ ID NO: 175)	QMS	AQNLELPYT (SEQ ID NO: 205)
CD20	Ocaratuzumabe	GRTFTSYNMH (SEQ ID NO: 81)	AIYPLTGDT (SEQ ID NO: 111)	ARSTYVGGDWQFDV (SEQ ID NO: 142)	SSVPY (SEQ ID NO: 176)	ATS	QQWLSNPPT (SEQ ID NO: 206)
CD20	Rituximabe	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	CARSTYYGGDWYFNV (SEQ ID NO: 143)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTSNPPT (SEQ ID NO: 207)
CD20	Ublituzumabe	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARYDYNAMDY (SEQ ID NO: 144)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTFNPPT (SEQ ID NO: 208)
CD20	Veltuzumabe	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARSTYYGGDWYFDV (SEQ ID NO: 145)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTSNPPT (SEQ ID NO: 207)
CD22	Epratuzumabe	GYTFTSYW (SEQ ID NO: 83)	INPRNDYT (SEQ ID NO: 113)	ARRDITTFY (SEQ ID NO: 146)	QSVLYSANHKNY (SEQ ID NO: 178)	WAS	HQYLSS (SEQ ID NO: 209)

CD37	Otlertuzumabe	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYGGT (SEQ ID NO: 114)	ARSVGPFDS (SEQ ID NO: 147)	ENVYSY (SEQ ID NO: 179)	FAK	QHSDNPWT (SEQ ID NO: 210)
CD38	Daratumumabe	GFTFNSFA (SEQ ID NO: 85)	ISGSGGGT (SEQ ID NO: 115)	AKDKILWFGEPVFDY (SEQ ID NO: 148)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWPPT (SEQ ID NO: 211)
CD38	Isatuximabe	GYTFTDYW (SEQ ID NO: 86)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARGDYYGSNSLDY (SEQ ID NO: 149)	QDVSTV (SEQ ID NO: 181)	SAS	QQHYSPPYT (SEQ ID NO: 212)
CD3epsilon	Foralumabe	GFKFSGYG (SEQ ID NO: 87)	IWYDGSKK (SEQ ID NO: 116)	ARQMGYWHFDLW (SEQ ID NO: 150)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 213)
CD52	Alentuzumabe	GFTFTDFY (SEQ ID NO: 88)	IRDKAKGYTT (SEQ ID NO: 117)	AREGHTAAPFDY (SEQ ID NO: 151)	QNIDKY (SEQ ID NO: 182)	NTN	LQHISRPT (SEQ ID NO: 214)
CD105	Carotuximabe	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSKASNHAT (SEQ ID NO: 118)	TRWRRFFDS (SEQ ID NO: 152)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 215)
CD147	cHAb18	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSANNHAPT (SEQ ID NO: 119)	TRDSTATH (SEQ ID NO: 153)	QSVIND (SEQ ID NO: 183)	TAS	QQDTSP (SEQ ID NO: 216)
c-Met	ABT-700	GYIFTAYT (SEQ ID NO: 90)	IKPNNGLA (SEQ ID NO: 120)	ARSEITTEFDY (SEQ ID NO: 154)	ESVDSYANSF (SEQ ID NO: 184)	RAS	QQSKEDPLT (SEQ ID NO: 217)
CTLA-4	Ipilimumabe	GFTFSSYT (SEQ ID NO: 91)	ISYDGNNK (SEQ ID NO: 121)	ARTGWLGPFDY (SEQ ID NO: 155)	QSVGSSY (SEQ ID NO: 185)	GAF	QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 218)
EGFR2	Margetuximabe	GFNIKDTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGFYAMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNTA (SEQ ID NO: 186)	SAS	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 219)
EGFR3	Lumretuzumabe	GYTFRSSY (SEQ ID NO: 93)	IYAGTGSP (SEQ ID NO: 123)	ARHRDYYSNSLTY (SEQ ID NO: 157)	QSVLNSGNQKNY (SEQ ID NO: 187)	WAS	QSDYSYPYT (SEQ ID NO: 220)
EphA3	Ifabotuzumabe	GYTFTGYW (SEQ ID NO: 94)	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 124)	ARGGYEDFDS (SEQ ID NO: 158)	QGIISY (SEQ ID NO: 188)	AAS	GQYANYPYT (SEQ ID NO: 221)
GD3	Ecromeximabe	GFAFSHYA (SEQ ID NO: 95)	ISSGGSGT (SEQ ID NO: 125)	TRVKLGTYFFDS (SEQ ID NO: 159)	QDISNY (SEQ ID NO: 189)	YSS	HQYSKLP (SEQ ID NO: 222)

GPC3	Codrituzumabe	GYTFTDYE (SEQ ID NO: 96)	LDPKTGDT (SEQ ID NO: 126)	TRFYSYTY (SEQ ID NO: 160)	QSLVHSNRNTY (SEQ ID NO: 190)	KVS	SQNTHPPT (SEQ ID NO: 223)
KIR2DL1/2/3	Lirilumabe	GGTFSFYA (SEQ ID NO: 97)	FIPIFGAA (SEQ ID NO: 127)	ARIPSGSYYYDYD MDV (SEQ ID NO: 161)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWMT (SEQ ID NO: 224)
MUC5AC	Ensituximabe	GFSLSKFG (SEQ ID NO: 98)	IWGDGST (SEQ ID NO: 128)	VKPGGDY (SEQ ID NO: 162)	SSISY (SEQ ID NO: 191)	DTS	HQRDYPWT (SEQ ID NO: 225)
fosfatidilserina	Bavituximabe	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYYGDT (SEQ ID NO: 129)	VKGGYYGHWFYDV (SEQ ID NO: 163)	QDIGSS (SEQ ID NO: 192)	ATS	LQVSSPPT (SEQ ID NO: 226)
RHD	Roledumabe	GFTFKNYA (SEQ ID NO: 99)	ISYDGRNI (SEQ ID NO: 130)	ARPVRSRWLQLGL EDAFHI (SEQ ID NO: 164)	QDIRNY (SEQ ID NO: 193)	AAS	QQYYNSPPT (SEQ ID NO: 227)
SLAMF7	Elotuzumabe	GFDFSRYW (SEQ ID NO: 100)	INPDSSTI (SEQ ID NO: 131)	ARPDGNYWFYDV (SEQ ID NO: 165)	QDVGIA (SEQ ID NO: 194)	WAS	QQYSSYPYT (SEQ ID NO: 228)
HER2	Trastuzumabe	GFNIKDTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGFYAMD Y (SEQ ID NO: 156)	QDVNTA (SEQ ID NO: 186)	SAS	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 219)
OX40	Oxelumabe	GFTFNSYA (SEQ ID NO: 101)	ISGSGGFT (SEQ ID NO: 132)	AKDRLVAPGTFDY (SEQ ID NO: 166)	QGISSW (SEQ ID NO: 195)	AAS	QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 229)
PD-L1	Avelumabe	GFTFSSYI (SEQ ID NO: 102)	IYPSGGIT (SEQ ID NO: 133)	ARIKLGTVTTVDY (SEQ ID NO: 167)	SSDVGGYNY (SEQ ID NO: 196)	DVS	SSYTSSSTRV (SEQ ID NO: 230)
CD135	4G8-SDIEM	SYWMH (SEQ ID NO: 103)	EIDPSDSYKDYNQ KFKD (SEQ ID NO: 134)	AITTTPDFD (SEQ ID NO: 168)	RASQISNNLH (SEQ ID NO: 197)	YSQIS (SEQ ID NO: 200)	QQSNTWPYT (SEQ ID NO: 231)
HIV1	VRC01LS	GYTFLNCPI (SEQ ID NO: 104)	GWMKPRGGAVN (SEQ ID NO: 135)	ARYFFGSSPNWYFD (SEQ ID NO: 169)	SQYGSLAW (SEQ ID NO: 198)	GGG	QQYEFFGQGT (SEQ ID NO: 232)
HER3	KTN3379	GFTFSYYMQ (SEQ ID NO: 105)	IGSSGGVTN (SEQ ID NO: 136)	ARVGLGDAFDIWDQ (SEQ ID NO: 170)	SLSNIGLN (SEQ ID NO: 199)	SRN	AAWDDSPPG (SEQ ID NO: 233)
CD38	MOR 202	GFTFSSYYMN	GISGDPSNTYYAD SVKG	DLPLVYTGFAV	SGDNLRHYYVY	GDSKRPS	QTYTGGAS

Tabela 1B: Sequências de Domínio Variável

Anticorpo	VH/CH1	VL	
Atezolizuma-be PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEW VAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCA RRHWPGGFYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIT TCRASQDVSTAVAWYQQKPK GKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQYLYHPATFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
Durvalumabe PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEW VANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AREGGWFGELAFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQRVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGLPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	
Tremelimumabe CTLA-4	QVQLVESGGG SCAASGFTFS PGKLEWVAV ADSVKGRFTI LQMNSLRAED RGATLYYYYY VTVSSASTKG RSTSESTAAL PVTVSWNSGA VLQSSGLYSL FGTQTYTCNV KTKVERKCCVE GPSVFLFPPK PEVTCVVVDV WYVDGVEVHN NSTFRVSVL	VVQPGRSRLR SYGMHWVRQA IWDGSKNY SRDNSKNTLY TAVYYCARDP GMDVWGQGT PSVFLAPCS GCLVKDYFPE LTSGVHTFPA SSVTVPSST DHKPSNTKVD CPPCPAPPVA PKDTLMISRT SHEDPEVQFN AKTKPREEQF TVVHQDWLNG	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIT TCRASQSIN SYLDWYQQKPKGAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQY YSTPFTFGPGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

Anticorpo	VH/CH1	VL
	KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	
Isatuximabe CD38	QVQLVQSGAEVAKPGTQSVKLSCKA SGYTFDYMVMQWVKRPGQGLE WIGTIYPGDGDTGYAQKFQKATL TADKSSKTVYMHLSLASEDSAVY YCARGDYYSNSLDYWGQGTSVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSI TCKASQDVSTVVAWYQQKP GQSPRRLIYSASYRYIGVPDR FTGSGAGTDFTFTISSVQAED LAVYYCQQHYSPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
MOR 202 CD38	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEW VSGISGDPSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLPLVYTGFAWGGQTLTV (Somente VH)	DIELTQPPSVSVAPGQTARIS CSGDNLRHYVYVYQQKPG QAPVLLVIYGDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQTYTGASLVF GGGKTLTVLGG

[00115] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 43s (4304/4310 e 4312/4314 na FIG. 4) podem incluir as sequências de CDR de três cadeias pesadas e três cadeias leves de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 1A e 1B.

[00116] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 44 (4404/4412 e 4414/4416 na FIG. 5) podem incluir as sequências de CDR de três cadeias pesadas e três cadeias leves de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 1A e 1B.

[00117] Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno (por exemplo, um Fab ou um scFv) inclui as cadeias V_H e V_L de um anticorpo listado na Tabela 2 ou Tabela 1B. Em algumas modalidades, o Fab inclui as CDRs contidas nas cadeias V_H e V_L de um anticorpo

listado na Tabela 2 ou Tabela 1B. Em algumas modalidades, o Fab inclui as CDRs contidas nas cadeias V_H e V_L de um anticorpo listado na Tabela 2 e o restante das sequências de V_H e V_L são pelo menos 95% idênticas, pelo menos 97% idênticas, pelo menos 99% idênticas, ou pelo menos 99,5% idênticas às sequências de V_H e V_L de um anticorpo na Tabela 2. Em algumas modalidades, o Fab inclui as CDRs contidas nas cadeias V_H e V_L de um anticorpo listado na Tabela 1B e o restante das sequências de V_H e V_L são pelo menos 95% idênticas, pelo menos 97% idênticas, pelo menos 99% idênticas, ou pelo menos 99,5% idênticas às sequências de V_H e V_L de um anticorpo na Tabela 1B.

Tabela 2

Alvo	Nome do anticorpo
Antígeno AbGn-7	AbGn-7
AMHR2	GM-102
B7-H3	DS-5573a
CA19-9	MVT-5873
CAIX	Anti-CAIX
CD19	XmAb5871
CD33	BI-836858
CD37	BI-836826
CD38	MOR-202
CD47	Anti-CD47
CD70	ARGX-110
CD70	ARGX-110
CD98	IGN-523
CD147	Metuzumabe
CD157	MEN-1112
c-Met	ARGX-111
EGFR2	GT-Mab 7.3-GEX
EphA2	DS-8895a
FGFR2	FPA-144
GM2	BIW-8962
HPA-1a	NAITgam

ICAM-1	BI-505
IL-3Ralfa	Talacotuzumabe
JL-1	Leucotuximabe
antígeno de mieloma capa	MDX-1097
KIR32DL2	IPH-4102
LAG-3	GSK-2381781
<i>P. aeruginosa</i> sorotipo O1	AR-104
pGlu-abeta	PBD-C06
TA-MUC1	GT-MAB 2.5-GEX

[00118] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 43 (4304/4310 e 4312/4314 na FIG. 4) podem incluir as sequências de V_H e V_L de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 2 ou Tabela 1B.

[00119] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 44 (4404/4412 e 4414/4416 na FIG. 5) podem incluir as sequências de V_H e V_L de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 2 ou Tabela 1B.

[00120] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 43 (4304/4310 e 4312/4314 na FIG. 4) podem incluir as sequências de CDR contidas nas sequências de V_H e V_L de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 2 ou Tabela 1B.

[00121] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 44 (4404/4412 e 4414/4416 na FIG. 5) podem incluir as sequências de CDR contidas nas sequências de V_H e V_L de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 2 ou Tabela 1B.

[00122] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 43 (4304/4310 e 4312/4314 na FIG. 4) podem incluir as sequências de CDR contidas nas sequências de V_H e V_L , e o restante das sequências de V_H e V_L são pelo menos 95% idênticas, pelo menos 97% idênticas, pelo menos 99% idênticas, ou pelo menos 99,5% idênticas às sequências de V_H e V_L de qualquer um dos anticorpos

listados na Tabela 2 ou Tabela 1B.

[00123] Os domínios de ligação ao antígeno do construto de domínio de ligação Fc-antígeno 44 (4404/4412 e 4414/4416 na FIG. 5) podem incluir as sequências de CDR contidas nas sequências de V_H e V_L , e o restante das sequências de V_H e V_L são pelo menos 95% idênticas, pelo menos 97% idênticas, pelo menos 99% idênticas, ou pelo menos 99,5% idênticas às sequências de V_H e V_L de qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 2 ou Tabela 1B.

IV. Módulos de seletividade de dimerização

[00124] Na presente divulgação, um módulo de seletividade de dimerização inclui componentes ou seleciona aminoácidos dentro do monômero do domínio Fc que facilita o pareamento preferencial de dois monômeros do domínio Fc para formar um domínio Fc. Especificamente, um módulo de seletividade de dimerização é parte do domínio constante de anticorpo C_{H3} de um monômero do domínio Fc, o qual inclui substituições de aminoácido posicionadas na interface entre os domínios constantes de anticorpo C_{H3} interativos de dois monômeros do domínio Fc. Em um módulo de seletividade de dimerização, as substituições de aminoácidos tornam favorável a dimerização dos dois domínios constantes de anticorpo C_{H3} como resultado da compatibilidade dos aminoácidos escolhidos para tais substituições. A formação final do domínio Fc favorecido é seletiva sobre outros domínios Fc que se formam a partir de monômeros do domínio Fc que não possuem módulos de seletividade de dimerização ou com substituições de aminoácidos incompatíveis nos módulos de seletividade de dimerização. Este tipo de substituição de aminoácido pode ser feito usando técnicas de clonagem molecular convencionais bem conhecidas na técnica, tais como mutagênese QuikChange®.

[00125] Em algumas modalidades, um módulo de seletividade de dimerização inclui uma cavidade manipulada (descrita posteriormente

neste documento) no domínio constante de anticorpo C_{H3}. Em outras modalidades, o módulo de seletividade de dimerização inclui uma protuberância manipulada (descrita posteriormente neste documento) no domínio constante de anticorpo C_{H3}. Para formar seletivamente um domínio Fc, dois monômeros do domínio Fc com módulos de seletividade de dimerização compatíveis, por exemplo, um domínio constante de anticorpo C_{H3} contendo uma cavidade manipulada e o outro domínio constante de anticorpo C_{H3} contendo uma protuberância manipulada, combinam-se para formar um par de protuberância-na-cavidade de monômeros do domínio Fc. Protuberâncias manipuladas e cavidades manipuladas são exemplos de módulos de seletividade de heterodimerização, que podem ser feitos nos domínios constantes de anticorpo C_{H3} dos monômeros do domínio Fc a fim de promover a heterodimerização favorável de dois monômeros do domínio Fc que tenham módulos de seletividade de heterodimerização compatíveis.

[00126] Em outras modalidades, um monômero do domínio Fc com um módulo de seletividade de dimerização contendo substituições de aminoácidos positivamente carregados e um monômero do domínio Fc com um módulo de seletividade de dimerização contendo substituições de aminoácidos negativamente carregados podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através da orientação eletrostática favorável (descrita posteriormente neste documento) dos aminoácidos carregados. Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc pode incluir uma das seguintes substituições de aminoácidos positiva ou negativamente carregados: K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D, e K439E. Em um exemplo, um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido positivamente carregado, por exemplo, D356K ou E357K, e um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido negativamente carregado, por exemplo, K370D ou K370E, podem se

combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em outro exemplo, um monômero do domínio Fc contendo E357K e um monômero do domínio Fc contendo K370D podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em outro exemplo, um monômero do domínio Fc contendo E356K e D399K e um monômero do domínio Fc contendo K392D e K409D podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de direção eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos de carga inversa podem ser usadas como módulos de seletividade de heterodimerização, em que dois monômeros do domínio Fc contendo substituições de aminoácidos de carga inversa diferentes, mas compatíveis, se combinam para formar um domínio Fc heterodimérico. Os módulos de seletividade de dimerização específicos são adicionalmente listados, sem limitação, nas Tabelas 3 e 4 descritas adicionalmente abaixo.

[00127] Em outras modalidades, dois monômeros do domínio Fc incluem módulos de seletividade de homodimerização contendo mutações de carga inversa idênticas em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios C_H3. Os módulos de seletividade de homodimerização são substituições de aminoácidos de carga inversa que promovem a homodimerização de monômeros do domínio Fc para formar um domínio Fc homodimérico. Ao inverter a carga de ambos os membros dos dois ou mais pares complementares de resíduos nos dois monômeros do domínio Fc, os monômeros do domínio Fc mutantes permanecem complementares aos monômeros do domínio Fc da mesma sequência mutante, mas têm uma menor complementaridade com os monômeros do domínio Fc sem essas mutações. Em uma modalidade, um domínio Fc inclui monômeros

do domínio Fc que incluem os mutantes duplos K409D/D399K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D399K, K392E/D399K, E357K/K370D, ou D356K/K439E. Em outra modalidade, um domínio Fc inclui monômeros do domínio Fc incluindo mutantes quádruplos que combinam qualquer par de mutantes duplos, por exemplo, K409D/D399K/E357K/K370E. Exemplos de módulos de seletividade de homodimerização são mostrados posteriormente nas Tabelas 5 e 6. Os domínios Fc de homodimerização podem ser usados para criar pontos de ramificação simétricos em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno. Em uma modalidade, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno descrito neste documento tem um domínio Fc de homodimerização. Em uma modalidade, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem dois ou mais domínios Fc de homodimerização, por exemplo, dois, três, quatro ou cinco ou mais domínios de homodimerização. Em uma modalidade, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem três domínios Fc de homodimerização. Em algumas modalidades, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem um módulo de seletividade de homodimerização. Em algumas modalidades, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem dois ou mais módulos de seletividade de homodimerização, por exemplo, dois, três, quatro ou cinco ou mais módulos de seletividade de homodimerização.

[00128] Em outras modalidades, um monômero do domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma cavidade manipulada ou pelo menos uma protuberância manipulada pode se combinar seletivamente com um outro monômero do domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma protuberância manipulada ou pelo menos uma cavidade manipulada para formar um domínio Fc. Por exemplo, um monômero do domínio Fc contendo a mutação de carga inversa K370D

e as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y407V e um outro monômero do domínio Fc contendo a mutação de carga inversa E357K e as protuberâncias manipuladas S354C e T366W podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc.

[00129] A formação desses domínios Fc é promovida pelas substituições de aminoácidos compatíveis nos domínios constantes de anticorpo C_H3. Dois módulos de seletividade de dimerização contendo substituições de aminoácidos incompatíveis, por exemplo, ambos contendo cavidades manipuladas, ambos contendo protuberâncias manipuladas, ou ambos contendo os mesmos aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3, não irão promover a formação de um domínio Fc de heterodimerização.

[00130] Vários pares de domínios Fc de heterodimerização podem ser usados para criar construtos do domínio de ligação Fc-antígeno com vários pontos de ramificação assimétricos, vários pontos de não ramificação ou pontos de ramificação assimétricas e pontos de não ramificação. Múltiplas e distintas tecnologias de heterodimerização (ver, por exemplo, Tabelas 3 e 4) estão incorporadas em diferentes domínios Fc para montar esses construtos contendo domínios Fc. As tecnologias de heterodimerização têm associação mínima (ortogonalidade) para o pareamento indesejado de monômeros de Fc. Dois métodos diferentes de heterodimerização de Fc, como "knobs-into-holes" (Tabela 3) e direção eletrostática (Tabela 4), podem ser usados em diferentes domínios Fc para controlar a montagem das cadeias polipeptídicas no construto desejado. Alternativamente, duas variantes diferentes de "knobs-into-holes" (por exemplo, dois conjuntos distintos de mutações selecionadas da Tabela 3), ou duas variantes diferentes da direção eletrostática (por exemplo, dois conjuntos distintos de mutações selecionadas da Tabela 4), podem ser usadas em diferentes domínios Fc para controlar a montagem das cadeias polipeptídicas no construto

desejado. Ramificações assimétricas podem ser criados colocando os monômeros do domínio Fc de um domínio Fc de heterodimerização em diferentes cadeias polipeptídicas, cadeia polipeptídica com múltiplos domínios Fc. Pontos não ramificados podem ser criados colocando um monômero do domínio Fc do domínio Fc de heterodimerização em uma cadeia polipeptídica com vários domínios Fc e o outro monômero do domínio Fc do domínio Fc de heterodimerização em uma cadeia polipeptídica com um único domínio Fc.

[00131] Em algumas modalidades, os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento são lineares. Em algumas modalidades, os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento não possuem pontos de ramificação. Por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode ser montado a partir de um peptídeo grande com dois ou mais monômeros do domínio Fc, onde pelo menos dois monômeros do domínio Fc são diferentes (ou seja, têm mutações de heterodimerização diferentes), e dois ou mais peptídeos menores, cada um tendo um monômero do domínio Fc diferente (ou seja, dois ou mais pequenos peptídeos com monômeros do domínio Fc com mutações de heterodimerização diferentes). Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento podem ter dois ou mais módulos de seletividade de dimerização que são incompatíveis entre si, por exemplo, pelo menos dois módulos de seletividade de dimerização incompatíveis selecionados das Tabelas 3 e/ou 4, que promovem ou facilitam a formação adequada dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno, de modo que o monômero do domínio Fc de cada peptídeo menor se associe com seu(s) monômero(s) do domínio Fc compatível(is) no peptídeo maior. Em algumas modalidades, um primeiro monômero do domínio Fc ou primeiro subconjunto de monômeros do domínio Fc em um peptídeo longo contém substituições de aminoácidos que fazem

parte de um primeiro módulo de seletividade de dimerização que é compatível com uma parte do primeiro módulo de seletividade de dimerização formado por substituições de aminoácidos no monômero do domínio Fc de um primeiro peptídeo curto. Um segundo monômero do domínio Fc ou segundo subconjunto de monômeros do domínio Fc em um peptídeo longo contém substituições de aminoácidos que fazem parte de um segundo módulo de seletividade de dimerização que é compatível com uma parte do segundo módulo de seletividade de dimerização formado por substituições de aminoácidos no monômero do domínio Fc de um segundo peptídeo curto. O primeiro módulo de seletividade de dimerização favorece a ligação de um primeiro monômero do domínio Fc (ou primeiro subconjunto de monômeros do domínio Fc) no peptídeo longo ao monômero do domínio Fc de um primeiro peptídeo curto, ao mesmo tempo em que desfavorece a ligação entre um primeiro monômero do domínio Fc e o monômero do domínio Fc do segundo peptídeo curto. De maneira similar, o segundo módulo de seletividade de dimerização favorece a ligação de um segundo monômero do domínio Fc (ou segundo subconjunto de monômeros do domínio Fc) no peptídeo longo ao monômero do domínio Fc de um segundo peptídeo curto, ao mesmo tempo em que desfavorece a ligação entre um segundo monômero do domínio Fc e o monômero do domínio Fc do primeiro peptídeo curto.

[00132] Em certas modalidades, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode ter um primeiro domínio Fc com um primeiro módulo de seletividade de dimerização, e um segundo domínio Fc com um segundo módulo de seletividade de dimerização. Em algumas modalidades, o primeiro domínio Fc é montado a partir de um monômero de Fc com pelo menos uma mutação formadora de protuberância selecionada da Tabela 3 e/ou pelo menos uma mutação de carga inversa selecionada da Tabela 4 (por exemplo, o monômero

de Fc pode ter mutações formadora de protuberância S354C e T366W e uma mutação de carga inversa E357K), e um monômero de Fc com pelo menos uma mutação formadora de cavidade selecionada da Tabela 3 e/ou pelo menos uma mutação de carga inversa selecionada da Tabela 4 (por exemplo, o monômero de Fc pode ter mutações formadoras de cavidade Y349C, T366S, L368A e Y407V e uma mutação de carga inversa K370D. Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc é montado a partir de um monômero de Fc com pelo menos uma mutação formadora de protuberância selecionada da Tabela 3 e/ou pelo menos uma mutação de carga inversa selecionada da Tabela 4 (por exemplo, o monômero de Fc pode ter mutações de carga inversa D356K e D399K), e um monômero de Fc com pelo menos uma mutação formadora de cavidade selecionada da Tabela 3 e/ou pelo menos uma mutação de carga inversa selecionada da Tabela 4 (por exemplo, o monômero de Fc pode ter mutações de carga inversa K392D e K409D).

[00133] Além disso, outros métodos usados para promover a formação de domínios Fc com monômeros do domínio Fc definidos incluem, sem limitação, a abordagem LUZ-Y (Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº WO2011034605) que inclui uma fusão C-terminal de α -hélices monoméricas de um zíper de leucina a cada um dos monômeros do domínio Fc para permitir a formação de heterodímeros, bem como a abordagem do corpo de domínio modificado de troca de fita (SEED) (Davis et al., *Protein Eng Des Sel.* 23:195-202, 2010) que gera domínio Fc com monômeros do domínio Fc heterodiméricos, com cada um incluindo segmentos alternados de sequências de C_H3 de IgA e IgG.

V. Cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas

[00134] O uso de cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas (ou a estratégia de "knob-into-hole") é descrito por Carter e colaboradores (Ridgway et al. *Protein Eng.* 9:617-612, 1996; Atwell et al. *J Mol Biol.* 270:26-35, 1997; Merchant et al. *Nat Biotechnol.* 16:677-

681, 1998). A interação de nó ("knob") e orifício ("hole") favorece a formação de heterodímeros, em que a interação knob-knob e hole-hole impede a formação de heterodímero devido ao choque estérico e deleção de interações favoráveis. A técnica "knob-into-hole" também é divulgada na Patente U.S. nº 5,731,168.

[00135] Na presente divulgação, as cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas são usadas na preparação dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento. Uma cavidade manipulada é um espaço vazio que é criado quando um aminoácido original de uma proteína é substituído por um aminoácido diferente com um volume menor de cadeia lateral. Uma protuberância manipulada é uma saliência que é criada quando um aminoácido original de uma proteína é substituído por um aminoácido diferente com um volume maior de cadeia lateral. Especificamente, o aminoácido sendo substituído está no domínio constante de anticorpo C_{H3} de um monômero do domínio Fc e está envolvido na dimerização de dois monômeros do domínio Fc. Em algumas modalidades, uma cavidade manipulada em um domínio constante de anticorpo C_{H3} é criada para acomodar uma protuberância manipulada em um outro domínio constante de anticorpo C_{H3}, de tal modo que ambos os domínios constantes de anticorpo C_{H3} atuam como módulos de seletividade de dimerização (por exemplo, módulos de seletividade de heterodimerização) (descritos acima) que promovem ou favorecem a dimerização dos dois monômeros do domínio Fc. Em outras modalidades, uma cavidade manipulada em um domínio constante de anticorpo C_{H3} é criada para acomodar melhor um aminoácido original em um outro domínio constante de anticorpo C_{H3}. Em ainda outras modalidades, uma protuberância manipulada em um domínio constante de anticorpo C_{H3} é criada para formar interações adicionais com os aminoácidos originais em um outro domínio constante de anticorpo C_{H3}.

[00136] Uma cavidade manipulada pode ser construída através da substituição de aminoácidos contendo cadeias laterais maiores, tais como tirosina ou triptofano, por aminoácidos contendo cadeias laterais menores, tais como alanina, valina ou treonina. Especificamente, alguns módulos de seletividade de dimerização (por exemplo, os módulos de seletividade de heterodimerização) (descritos adicionalmente acima) contêm cavidades manipuladas, tais como a mutação Y407V no domínio constante de anticorpo C_H3. Semelhantemente, uma protuberância manipulada pode ser construída ao substituir aminoácidos que contêm cadeias laterais menores por aminoácidos que contêm cadeias laterais maiores. Especificamente, alguns módulos de seletividade de dimerização (por exemplo, os módulos de seletividade de heterodimerização) (descritos adicionalmente acima) contêm protuberâncias manipuladas, tal como a mutação T366W no domínio constante de anticorpo C_H3. Na presente divulgação, as cavidades manipuladas e as protuberâncias manipuladas também são combinadas com a manipulação da ligação dissulfeto do domínio inter-C_H3 para potencializar a formação de heterodímeros. Em um exemplo, um monômero do domínio Fc que contém as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y407V podem se combinar seletivamente com um outro monômero do domínio Fc que contém as protuberâncias S354C e T366W para formar um domínio Fc. Em um outro exemplo, um monômero do domínio Fc que contém uma cavidade manipulada com a adição de Y349C e um monômero do domínio Fc que contém uma protuberância manipulada com a adição de S354C podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc. Outras cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas, em combinação tanto com manipulação de ligação dissulfeto quanto com cálculos estruturais (HA-TF misturados) estão incluídas, sem limitação, na Tabela 3.

Tabela 3: Métodos de heterodimerização de Fc ("Knobs-into-holes")

Método	Mutações (Cadeia A) (Domínio constante de anticorpo CH ₃ do monômero 1 do domínio Fc)	Mutações (Cadeia B) (Domínio constante de anticorpo CH ₃ do monômero 2 do domínio Fc)	Referência
Knobs-into-Holes (Y-T)	Y407T	T336Y	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	Y407A	T336W	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	F405A	T394W	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	Y407T	T366Y	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	T394S	F405W	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	T394W, Y407T	T366Y, F406A	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	T394S, Y407A	T366W, F405W	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	T366W, T394S	F405W, T407A	Pat. US Nº 8.216.805
Knobs-into-Holes	F405T	T394Y	
Knobs-into-Holes	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V	
Knobs-into-Holes (CW-CSAV)	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W	Merchant et al., <i>Nat. Biotechnol.</i> 16(7):677-81, 1998
HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F	WO2011028952

Nota: Todos os resíduos numerados pelo esquema de numeração EU (Edelman e outros, Proc Acad Natl Sci EUA, 63:78-85, 1969)

[00137] Substituir um resíduo de aminoácido original no domínio constante de anticorpo C_H3 por um resíduo de aminoácido diferente pode ser obtido alterando o ácido nucléico que codifica o resíduo de aminoácido original. O limite superior para o número de resíduos de aminoácidos originais que podem ser substituídos é o número total de resíduos na interface dos domínios constantes de anticorpo C_H3, dado que a interação suficiente na interface ainda seja mantida.

Combinar cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas com orientação eletrostática

[00138] A orientação eletrostática pode ser combinada com a tecnologia "knob-into-holes" para favorecer a heterodimerização, por exemplo, entre monômeros do domínio de Fc em dois polipeptídeos diferentes. A orientação eletrostática, descrita em maiores detalhes abaixo, é a utilização de interações eletrostáticas favoráveis entre aminoácidos de carga oposta em peptídeos, domínios proteicos e proteínas para controlar a formação de moléculas proteicas com maior ordenação. A orientação eletrostática pode ser usada promover a homodimerização ou a heterodimerização, o último dos quais pode ser combinado de maneira útil com a tecnologia "knobs-into-holes". No caso de heterodimerização, mutações diferentes, mas compatíveis, são introduzidas em cada um dos monômeros do domínio Fc que devem ser heterodimerizados. Assim, um monômero do domínio Fc pode ser modificado para incluir uma das seguintes substituições de aminoácidos positiva ou negativamente carregadas: D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D e K439E. Por exemplo, um monômero do domínio Fc, por exemplo, um monômero do domínio Fc que tem uma cavidade (Y349C, T366S, L368A e Y407V), pode também incluir a mutação K370D e o outro monômero do domínio Fc, por exemplo, um monômero do domínio Fc que tem uma protuberância (S354C e T366W) pode incluir E357K.

[00139] Mais geralmente, qualquer uma das mutações de cavidade (ou combinações de mutação): Y407T, Y407A, F405A, Y407T, T394S, T394W:Y407A, T366W:T394S, T366S:L368A:Y407V:Y349C, e S3364H:F405 podem ser combinadas com uma mutação na Tabela 4 e qualquer uma das mutações de protuberância (ou combinações de mutação): T366Y, T366W, T394W, F405W, T366Y:F405A, T366W:Y407A, T366W:S354C, e Y349T:T394F podem ser combinadas

com uma mutação na Tabela 4 que é pareada com a mutação da Tabela 4 usado em combinação com a mutação da cavidade (ou combinação de mutação).

VI. Orientação eletrostática

[00140] A orientação eletrostática é a utilização de interações eletrostáticas favoráveis entre aminoácidos de carga oposta em peptídeos, domínios de proteínas e proteínas para controlar a formação de moléculas de proteína com maior ordenação. Um método de usar efeitos de orientação eletrostática para alterar a interação de domínios de anticorpo para reduzir a formação de homodímero a favor da formação de heterodímero na geração de anticorpos biespecíficos é divulgado na Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2014-0024111.

[00141] Na presente divulgação, a orientação eletrostática é usada para controlar a dimerização de monômeros do domínio Fc e a formação de construtos do domínio de ligação Fc-antígeno. Particularmente, para controlar a dimerização de monômeros do domínio Fc usando a orientação eletrostática, um ou mais resíduos de aminoácidos que compõem a interface C_{H3} - C_{H3} são substituídos por resíduos de aminoácidos carregados positiva ou negativamente, de tal modo que a interação se torna eletrostaticamente favorável ou desfavorável dependendo dos aminoácidos específicos carregados introduzidos. Em algumas modalidades, um aminoácido carregado positivamente na interface, como lisina, arginina ou histidina é substituído por um aminoácido carregado negativamente, tal como o ácido aspártico ou ácido glutâmico. Em outras modalidades, um aminoácido carregado negativamente na interface é substituído por um aminoácido carregado positivamente. Os aminoácidos carregados podem ser introduzidos em um dos domínios constantes de anticorpo C_{H3} em interação, ou em ambos. Através da introdução de aminoácidos carregados nos domínios constantes de anticorpo C_{H3} em interação, são criados módulos de

seletividade de dimerização (descritos adicionalmente acima) que podem formar seletivamente dímeros de monômeros do domínio Fc, conforme controlado pelos efeitos da orientação eletrostática, resultando a partir da interação entre aminoácidos carregados.

[00142] Em algumas modalidades, para criar um módulo de seletividade de dimerização incluindo cargas invertidas que podem formar seletivamente dímeros dos monômeros do domínio Fc, conforme controlado pelos efeitos de orientação eletrostática, os dois monômeros do domínio Fc podem ser seletivamente formados através da heterodimerização ou homodimerização.

Heterodimerização de monômeros do domínio Fc

[00143] A heterodimerização de monômeros do domínio Fc pode ser promovida ao introduzir mutações diferentes, mas compatíveis, nos dois monômeros do domínio Fc, tais como os pares de resíduos de carga incluídos, sem limitação, na Tabela 4. Em algumas modalidades, um monômero do domínio Fc pode incluir uma das seguintes substituições de aminoácidos positiva ou negativamente carregados: D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D, e K439E, por exemplo, 1, 2, 3, 4, ou 5 ou mais de D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D, e K439E. Em um exemplo, um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido positivamente carregado, por exemplo, D356K ou E357K, e um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido negativamente carregado, por exemplo, K370D ou K370E, podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em outro exemplo, um monômero do domínio Fc contendo E357K e um monômero do domínio Fc contendo K370D podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em

outro exemplo, um monômero do domínio Fc contendo E356K e D399K e um monômero do domínio Fc contendo K392D e K409D podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de direção eletrostática favorável dos aminoácidos carregados.

[00144] Um "domínio Fc heterodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela heterodimerização de dois monômeros do domínio Fc, em que os dois monômeros do domínio Fc contêm mutações de carga inversa diferentes (módulo de seletividade de heterodimerização) (ver, por exemplo, mutações na Tabela 4) que promovem a formação favorável destes dois monômeros do domínio Fc. Em um exemplo, em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc, dois dos três domínios Fc podem ser formados pela heterodimerização de dois monômeros do domínio Fc, conforme promovido pelos efeitos de orientação eletrostática.

Tabela 4: Métodos de heterodimerização de Fc (orientação eletrostática)

Método	Mutações (Cadeia A) (CH ₃ do monômero 1 do domínio Fc)	Mutações (Cadeia B) (CH ₃ do monômero 2 do domínio Fc)	Referência
Orientação Eletrostática	K409D	D399K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K409D	D399R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K409E	D399K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K409E	D399R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K392D	D399K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K392D	D399R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K392E	D399K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K392E	D399R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática (DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010

Orientação Eletrostática	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	WO 2006/106905
Knobs-into-Holes mais Orientação Eletrostática	S354C, E357K, T366W	Y349C, T366S, L368A, K370D, Y407V	WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	K370D	E357K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370D	E357R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370E	E357K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370E	E357R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370D	D356K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370D	D356R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370E	D356K	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370E	D356R	US 2014/0024111
Orientação Eletrostática	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	

Nota: Todos os resíduos numerados pelo esquema de numeração EU (Edelman e outros, Proc Acad Natl Sci EUA, 63:78-85, 1969)

Homodimerização de monômeros do domínio Fc

[00145] A homodimerização de monômeros do domínio Fc pode ser promovida ao introduzir as mesmas mutações de orientação eletrostática (módulos de seletividade de homodimerização) em ambos os monômeros do domínio Fc em uma forma simétrica. Em algumas modalidades, dois monômeros do domínio Fc incluem módulos de seletividade de homodimerização contendo mutações de carga inversa idênticas em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios C_H3. Ao inverter a carga de ambos os membros dos dois ou mais pares complementares de resíduos nos dois monômeros do domínio Fc, os monômeros do domínio Fc mutantes permanecem complementares aos monômeros do domínio Fc da mesma sequência mutante, mas têm uma menor complementaridade com os monômeros do domínio Fc sem essas mutações. As mutações de orientação eletrostática que podem ser

introduzidas em um monômero do domínio Fc para promover sua homodimerização são mostradas, sem limitações, nas Tabelas 5 e 6. Em uma modalidade, um domínio Fc inclui dois monômeros do domínio Fc, cada um incluindo os mutantes de carga inversa dupla (Tabela 5), por exemplo, K409D/D399K. Em uma outra modalidade, um domínio Fc inclui dois monômeros do domínio Fc, cada um incluindo os mutantes reversos quádruplos (Tabela 6), por exemplo, K409D/D399K/K370D/E357K.

[00146] Por exemplo, em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc, um dos três domínios Fc pode ser formado pela homodimerização de dois monômeros do domínio Fc, conforme promovido pelos efeitos de orientação eletrostática. Um "domínio Fc homodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela homodimerização de dois monômeros do domínio Fc, em que os dois monômeros do domínio Fc contêm as mesmas mutações de carga inversa (ver, por exemplo, as mutações nas Tabelas 5 e 6). Em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno que tem três domínios Fc - um domínio Fc "de haste" de terminal carboxila e dois domínios Fc "de ramificação" de terminal amino - o domínio Fc "haste" de terminal carboxila pode ser um domínio Fc homodimérico (chamado também de um "domínio Fc homodimérico de haste"). Um domínio Fc homodimérico com haste pode ser formado por dois monômeros do domínio Fc, cada um contendo os mutantes duplos K409D/D399K.

Tabela 5: Homodimerização de Fc (orientação eletrostática com 2 mutações)

Método	Mutações (Cadeias A e B) (CH₃ dos monômeros 1 e 2 do domínio Fc)	Referência
Tipo Selvagem	Nenhum	
Orientação Eletrostática (KD)	D399K, K409D	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643

Orientação Eletrostática	D399K, K409E	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	E357K, K370D	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	E357K, K370E	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	D356K, K439D	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	D356K, K439E	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	K392D, D399K	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	K392E, D399K	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
Orientação Eletrostática	D399R, K409D	
Orientação Eletrostática	D399R, K409E	
Orientação Eletrostática	D399R, K392D	
Orientação Eletrostática	D399R, K392E	
Orientação Eletrostática	E357K, K370D	
Orientação Eletrostática	E357R, K370D	
Orientação Eletrostática	E357K, K370E	
Orientação Eletrostática	E357R, K370E	
Orientação Eletrostática	D356K, K370D	
Orientação Eletrostática	D356R, K370D	
Orientação Eletrostática	D356K, K370E	
Orientação Eletrostática	D356R, K370E	

Nota: Todos os resíduos numerados pelo esquema de numeração EU (Edelman e

outros, *Proc Acad Natl Sci EUA*, 63:78-85, 1969)

Tabela 6: Homodimerização de Fc (orientação eletrostática de 4 mutações)

Mutações (Cadeias A e B) (CH ₃ dos monômeros 1 e 2 do domínio Fc)	Mutações (Cadeias A e B) (CH ₃ dos monômeros 1 e 2 do domínio Fc)
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R
K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K
K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R
K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K

Mutações (Cadeias A e B) (CH ₃ dos monômeros 1 e 2 do domínio Fc)	Mutações (Cadeias A e B) (CH ₃ dos monômeros 1 e 2 do domínio Fc)
K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

Nota: Todos os resíduos numerados pelo esquema de numeração EU (Edelman e outros, Proc Acad Natl Sci EUA, 63:78-85, 1969)

Outros métodos de heterodimerização

[00147] Várias outras tecnologias do heterodimerização foram descritas. Qualquer uma ou mais destas tecnologias (Tabela 7) podem ser combinadas com qualquer tecnologia "knob-into-holes" e/ou heterodimerização e/ou homodimerização de orientação eletrostática descrita neste documento para produzir um construto de domínio de ligação Fc-antígeno.

Tabela 7: Outros métodos de heterodimerização de Fc

Método	Mutações (Cadeia A)	Mutações (Cadeia B)	Referência
ZW1 (VYAV-VLLW)	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W	Von Kreudenstein et al, MAbs, 5:646-54, 2013
Dobradiça IgG1/pares de carga CH3 (EEE-RRR)	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R	Strop et al, J Mol Biol, 420:204-19, 2012
EW-RVT	K360E, K409W	Q347R, D399V, F405T	Choi et al, Mol Cancer Ther, 12:2748-59, 2013
EW-RVT _{S-S}	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C	Choi et al, Mol Immunol, 65:377-83, 2015
Introdução da Carga (DK Biclonic)	L351D	T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
Introdução da carga (DEKK Biclonic)	L351D, L368E	L351K, T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017

Método	Mutações (Cadeia A)	Mutações (Cadeia B)	Referência
DuoBody (L-R)	F405L	K409R	Labrijn et al, Proc Natl Acad Sci USA, 110:5145-50, 2013
SEEDbody	IgG/A quimera	IgG/A quimera	Davis et al, Protein Eng Des Sel, 23:195-202, 2010
BEAT (A/B)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B min)	S364K, T366V, K370T, K392Y, K409W, T411N	F405A, Y407S	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B + Q)	Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B – T)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
7.8.60 (DMA-RRVV)	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016
20.8.34 (SYMV-GDQA)	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016

Nota: Todos os resíduos numerados pelo esquema de numeração EU (Edelman e outros, Proc Acad Natl Sci EUA, 63:78-85, 1969)

VII. Ligantes

[00148] Na presente divulgação, um ligante é usado para descrever uma ligação ou conexão entre domínios de polipeptídeos ou de proteína e/ou associados a frações não proteicas. Em algumas modalidades, um ligante é uma ligação ou uma conexão entre pelo menos dois monômeros do domínio Fc, pois o ligante conecta terminal C do domínio constante de anticorpo C_H3 de um primeiro monômero do domínio Fc ao terminal N do domínio dobradiça de um segundo monômero do

domínio Fc, de tal modo que os dois monômeros do domínio Fc são unidos uns aos outros em série em tandem. Em outras modalidades, um ligante é uma ligação entre um monômero do domínio Fc e qualquer outros domínios de proteína que são anexados ao mesmo. Por exemplo, um ligante pode anexar o terminal C do domínio constante de anticorpo C_H3 de um monômero do domínio Fc ao terminal N de um peptídeo de ligação à albumina.

[00149] Um ligante pode ser uma ligação covalente simples, por exemplo, uma ligação peptídica, um polímero sintético, por exemplo, um polímero de polietilenoglicol (PEG) ou qualquer tipo de ligação criado a partir de uma reação química, por exemplo, uma conjugação química. No caso em que um ligante é uma ligação peptídica, o grupo de ácido carboxílico no terminal C de um domínio de proteína pode reagir com o grupo amino no terminal N de um outro domínio de proteína em uma reação de condensação para formar uma ligação peptídica. Especificamente, a ligação peptídica pode ser formada a partir de meios sintéticos através de uma reação química orgânica convencional bem conhecida na técnica, ou por produção natural de uma célula hospedeira, em que uma sequência polinucleotídica codifica as sequências de DNA de ambas as proteínas, por exemplo, dois monômeros do domínio Fc, em série em tandem, pode ser diretamente transcrita e traduzida em um polipeptídeo contíguo codificando ambas as proteínas pelas máquinas moleculares necessárias, por exemplo, polimerase de DNA e ribossomo, na célula hospedeira.

[00150] No caso em que um ligante é um polímero sintético, por exemplo, um polímero de PEG, o polímero pode ser acrescido com grupos funcionais químicos reativos em cada extremidade para reagir com os aminoácidos terminais nas extremidades de ligação de duas proteínas.

[00151] No caso em que um ligante (exceto a ligação peptídica

mencionada acima) é feito a partir de uma reação química, os grupos funcionais químicos, por exemplo, amina, ácido carboxílico, éster, azida ou outros grupos funcionais comumente usados na técnica, podem ser ligados sinteticamente ao terminal C de uma proteína e o terminal N de outra proteína, respectivamente. Os dois grupos funcionais podem então reagir através de meios de química sintética para formar uma ligação química, ligando assim as duas proteínas. Tais procedimentos de conjugação química são rotineiros para os versados na técnica.

Espaçador

[00152] Na presente divulgação, um ligante entre dois monômeros do domínio Fc pode ser um espaçador de aminoácidos, incluindo 3-200 aminoácidos (por exemplo 3-200, 3-180, 3-160, 3-140, 3-120, 3-100, 3-90, 3-80, 3-70, 3-60, 3-50, 3-45, 3-40, 3-35, 3-30, 3-25, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200, 8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 45-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, ou 180-200 aminoácidos). Em algumas modalidades, um ligante entre dois monômeros do domínio Fc é um espaçador de aminoácidos contendo pelo menos 12 aminoácidos, tal como 12-200 aminoácidos (por exemplo, 12-200, 12-180, 12-160, 12-140, 12-120, 12-100, 12-90, 12-80, 12-70, 12-60, 12-50, 12-40, 12-30, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, ou 12-13 aminoácidos) (por exemplo, 14-200, 16-200, 18-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, 180-200, ou 190-200 aminoácidos). Em algumas modalidades, um ligante entre dois monômeros do domínio Fc é um espaçador de aminoácidos que contém 12-30 aminoácidos (por exemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 aminoácidos). Os espaçadores peptídicos adequados são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, ligantes peptídicos que contêm resíduos de aminoácidos

flexíveis, tais como glicina e serina. Em certas modalidades, um espaçador pode conter motivos, por exemplo, motivos múltiplos ou repetidos, de GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO: 1), GGSG (SEQ ID NO: 2) ou SGGG (SEQ ID NO: 3). Em outras modalidades, um espaçador pode conter 2 a 12 aminoácidos incluindo motivos de GS, por exemplo, GS, GSGS (SEQ ID NO: 4), GSGSGS (ID SEQ NO: 5), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 6), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 7) ou GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 8). Em outras modalidades, um espaçador pode conter de 3 a 12 aminoácidos incluindo motivos de GGS, por exemplo, GGS, GGSGGS (SEQ ID NO: 9), GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 10) e GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11). Em ainda outras modalidades, um espaçador pode conter de 4 a 20 aminoácidos incluindo motivos de GGSG (SEQ ID NO: 2), por exemplo, GGSGGGSG (SEQ ID NO: 12), GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 13), GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14) ou GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 15). Em outras modalidades, um espaçador pode conter motivos de GGGGS (SEQ ID NO: 1), por exemplo, GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16) ou GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17). Em certas modalidades, um espaçador é SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18).

[00153] Em algumas modalidades, um espaçador entre dois monômeros do domínio Fc contém apenas resíduos de glicina, por exemplo, pelo menos 4 resíduos de glicina (por exemplo, 4-200, 4-180, 4-160, 4-140, 4-40, 4-100, 4-90, 4-80, 4-70, 4-60, 4-50, 4-40, 4-30, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6 ou 4-5 resíduos de glicina) (por exemplo, 4-200, 6-200, 8-200, 10-200, 12-200, 14-200, 16-200, 18-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, 180-200, ou 190-200 resíduos de glicina). Em certas modalidades, um espaçador tem 4-30 resíduos de glicina (por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,

29 ou 30 resíduos de glicina). Em algumas modalidades, um espaçador que contém apenas resíduos de glicina pode não ser glicosilado (por exemplo, glicosilação O-ligada, também referida como O-glicosilação) ou pode ter um nível de glicosilação diminuído (por exemplo, um nível de O-glicosilação diminuído) (por exemplo, um nível de O-glicosilação diminuído com glicanos, tais como xilose, manose, ácidos siálicos, fucose (Fuc) e/ou galactose (Gal) (por exemplo, xilose)), conforme comparado com, por exemplo, um espaçador que contém um ou mais resíduos de serina (por exemplo, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)).

[00154] Em algumas modalidades, um espaçador que contém apenas resíduos de glicina pode não ser O-glicosilado (por exemplo, O-xilosilação) ou pode ter um nível diminuído de O-glicosilação (por exemplo, um nível diminuído de O-xilosilação), conforme comparado a, por exemplo, um espaçador que contém um ou mais resíduos de serina (por exemplo, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)).

[00155] Em algumas modalidades, um espaçador que contém apenas resíduos de glicina pode não se submeter à proteólise ou pode ter uma taxa de proteólise diminuída em comparação com, por exemplo, um espaçador que contém um ou mais resíduos de serina (por exemplo, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)).

[00156] Em certas modalidades, um espaçador pode conter motivos de GGGG (SEQ ID NO: 19), por exemplo, GGGGGGGG (SEQ ID NO: 20), GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21), GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 22) ou GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). Em certas modalidades, um espaçador pode conter motivos de GGGGG (SEQ ID NO: 24), por exemplo, GGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 25) ou GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 26). Em certas modalidades, um espaçador é GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27).

[00157] Em outras modalidades, um espaçador pode também conter aminoácidos que não sejam glicina e serina, por exemplo, GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 28), SACYCELS (SEQ ID NO: 29), RSIAT (SEQ ID NO: 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 32), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 33) ou GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34).

[00158] Em certas modalidades na presente divulgação, um espaçador peptídico de 12 ou 20 aminoácidos é usado para ligar dois monômeros do domínio Fc na série em tandem, os espaçadores peptídicos de 12 ou 20 aminoácidos consistindo nas sequências GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35) e SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18), respectivamente. Em outras modalidades, um espaçador de peptídeo de 18 aminoácidos que consiste na sequência GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 36) pode ser usado.

[00159] Em algumas modalidades, um espaçador entre dois monômeros do domínio Fc pode ter uma sequência que seja pelo menos 75% idêntica (por exemplo, pelo menos 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-36 descritas acima. Em certas modalidades, um espaçador entre dois monômeros do domínio Fc pode ter uma sequência que seja pelo menos 80% idêntica (por exemplo, pelo menos 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18, 26, e 27. Em certas modalidades, um espaçador entre dois monômeros do domínio Fc pode ter uma sequência que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, pelo menos, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% ou 99,5%) à sequência da SEQ ID NO: 18 ou 27.

[00160] Em certas modalidades, o ligante entre o terminal amino da dobradiça de um monômero do domínio Fc e o terminal carbóxi de um monômero de Fc que é no mesmo polipeptídeo (ou seja, o ligante conecta o terminal C do domínio constante de anticorpo C_H3 de um primeiro monômero do domínio Fc ao terminal N do domínio dobradiça de um segundo monômero do domínio Fc, de modo que os dois monômeros do domínio Fc sejam unidos entre si em série em tandem) em um espaçador tendo 3 ou mais aminoácidos ao invés de uma ligação covalente (por exemplo, 3-200 aminoácidos (por exemplo 3-200, 3-180, 3-160, 3-140, 3-120, 3-100, 3-90, 3-80, 3-70, 3-60, 3-50, 3-45, 3-40, 3-35, 3-30, 3-25, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200, 8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 45-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, ou 180-200 aminoácidos) ou um espaçador de aminoácido contendo pelo menos 12 aminoácidos, tal como 12-200 aminoácidos (por exemplo, 12-200, 12-180, 12-160, 12-140, 12-120, 12-100, 12-90, 12-80, 12-70, 12-60, 12-50, 12-40, 12-30, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, ou 12-13 aminoácidos) (por exemplo, 14-200, 16-200, 18-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, 180-200, ou 190-200 aminoácidos)).

[00161] Um espaçador também pode estar presente entre o terminal N domínio dobradiça de um monômero do domínio Fc e o terminal carbóxi de um domínio de ligação CD38 (por exemplo, um domínio CH1 de um domínio de ligação de cadeia pesada CD38 ou o domínio CL de um domínio de ligação de cadeia leve CD38) de modo que os domínios estejam unidos por um espaçador de 3 ou mais aminoácidos (por exemplo, 3-200 aminoácidos (por exemplo, 3-200, 3-180, 3-160, 3-140, 3-120, 3-100, 3-90, 3-80, 3-70, 3-60, 3-50, 3-45, 3-40, 3-35, 3-30, 3-25, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200,

8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 45-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, ou 180-200 aminoácidos) ou um espaçador de aminoácidos contendo pelo menos 12 aminoácidos, tal como 12-200 aminoácidos (por exemplo, 12-200, 12-180, 12-160, 12-140, 12-120, 12-100, 12-90, 12-80, 12-70, 12-60, 12-50, 12-40, 12-30, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, ou 12-13 aminoácidos) (por exemplo, 14-200, 16-200, 18-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, 180-200, ou 190-200 aminoácidos)).

VII. Peptídeos de ligação a proteínas séricas

[00162] A ligação a peptídeos de proteína sérica pode aprimorar a farmacocinética de farmacêuticos proteicos e, em particular, os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos aqui podem ser fundidos com peptídeos de ligação a proteínas séricas.

[00163] Como um exemplo, os peptídeos de ligação à albumina que podem ser usados nos métodos e composições descritos neste documento são geralmente conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o peptídeo de ligação à albumina inclui a sequência DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 37). Em algumas modalidades, o peptídeo de ligação à albumina tem uma sequência que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, 80%, 90% ou 100% idênticas) à SEQ ID NO: 37.

[00164] Na presente divulgação, os peptídeos de ligação à albumina podem ser associados ao terminal N ou C de certos polipeptídeos no construto de domínio de ligação Fc-antígeno. Em uma modalidade, um peptídeo de ligação à albumina pode ser ligado ao terminal C de um ou mais polipeptídeos nos construtos de Fc contendo um domínio de ligação ao antígeno. Em outra modalidade, um peptídeo de ligação à albumina pode ser fundido ao terminal C do polipeptídeo que codifica

dois monômeros do domínio Fc ligados na série em tandem nos construtos de Fc contendo um domínio de ligação ao antígeno. Em uma outra modalidade, um peptídeo de ligação à albumina pode ser ligado ao terminal C do monômeros do domínio Fc (por exemplo, os monômeros do domínio Fc 114 e 116 na FIG. 1; os monômeros do domínio Fc 214 e 216 na FIG. 2) que unido ao segundo monômero do domínio Fc no polipeptídeo que codifica os dois monômeros do domínio Fc ligados em uma série em tandem. Os peptídeos de ligação à albumina podem ser geneticamente fundidos aos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno ou ligados aos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno através de meios químicos, por exemplo, conjugação química. Se desejado, um espaçador pode ser inserido entre o construto domínio de ligação Fc-antígeno e o peptídeo de ligação à albumina. Sem estar ligado a uma teoria, espera-se que a inclusão de um peptídeo de ligação à albumina em um construto domínio de ligação Fc-antígeno da divulgação possa levar a uma retenção prolongada da proteína terapêutica através de sua ligação à albumina sérica.

VIII. Construtos do domínio de ligação Fc-antígeno

[00165] No geral, a divulgação apresenta construtos do domínio de ligação Fc-antígeno que têm 2-10 domínios Fc e um ou mais domínios de ligação ao antígeno ligados. Os mesmos podem ter maior afinidade de ligação e/ou avides do que um único domínio Fc do tipo selvagem para um receptor de Fc, por exemplo, FcγRIIIa. A divulgação divulga métodos de manipulação de aminoácidos na interface de dois domínios constantes de anticorpo C_H3 em interação, de tal modo dois monômeros do domínio Fc de um domínio Fc formam seletivamente um dímero uns com os outros, evitando, portanto, a formação de multímeros ou agregados não desejados. Um construto de domínio de ligação Fc-antígeno inclui um número igual de monômeros do domínio Fc, com cada par de monômeros do domínio Fc formando um domínio Fc. Um

construto de domínio de ligação Fc-antígeno inclui, no mínimo, dois domínios Fc funcionais formados a partir de um dímero de quatro monômeros do domínio Fc e um domínio de ligação ao antígeno. O domínio de ligação ao antígeno pode ser ligado a um domínio Fc por exemplo, com um ligante, um espaçador, uma ligação peptídica, uma ligação química ou fração do produto químico. Em algumas modalidades, a divulgação refere-se aos métodos da manipulação de um conjunto das substituições de aminoácido selecionadas das Tabelas 3 e 4 na interface de um primeiro par dos dois domínios constantes de anticorpo CH3 em interação, e manipulação de um segundo conjunto de substituições de aminoácido selecionadas das Tabelas 3 e 4, diferente do primeiro conjunto de substituições de aminoácido, na interface de um segundo par de dois domínios constantes de anticorpo CH3 em interação, de modo que o primeiro par de dois monômeros do domínio Fc de um domínio Fc forma seletivamente um dímero entre si e o segundo par de dois monômeros do domínio Fc de um domínio Fc forma seletivamente um dímero entre si, assim impedindo a formação de multímeros ou de agregados não desejados.

[00166] Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser montados em muitas maneiras. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser montados a partir dos domínios Fc em tandem assimétricos. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser montados a partir dos domínios Fc unicamente ramificados, onde o ponto de ramificação está no domínio Fc do terminal N. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser montados a partir dos domínios Fc unicamente ramificados, onde o ponto de ramificação está no domínio Fc do terminal C. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser montados a partir dos domínios Fc unicamente ramificados, onde o ponto de ramificação não está nem no terminal N nem no terminal C do domínio Fc.. Os construtos do domínio de ligação

Fc-antígeno podem ser montados para formar construtos biespecíficos usando cadeias longas e curtas com sequências do domínio de ligação ao antígeno diferentes. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser montados para formar construtos biespecíficos e triespecíficos usando cadeias diferentes conjuntos de mutações de heterodimerização e domínios de ligação ao antígeno diferentes. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno biespecíficos incluem dois domínios de ligação ao antígeno diferentes. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno biespecíficos incluem três domínios de ligação ao antígeno diferentes.

[00167] O domínio de ligação ao antígeno pode ser ligado ao construto de domínio de ligação Fc-antígeno de muitas maneiras. O domínio de ligação ao antígeno pode ser expresso como uma proteína de fusão de uma cadeia de Fc. O componente de cadeia pesada do antígeno pode ser expresso como uma proteína de fusão de uma cadeia de Fc e um componente de cadeia leve pode ser expresso como um polipeptídeo separado (FIG. 6A). Em algumas modalidades, um scFv é usado como um domínio de ligação ao antígeno. O scFv pode ser expresso como uma proteína de fusão da cadeia longa de Fc (FIG. 6B). Em algumas modalidades, os componentes de cadeias leve e pesada são expressos separadamente e adicionados de maneira exógena ao construto de domínio de ligação Fc-antígeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é expresso separadamente e posteriormente ligado ao construto de domínio de ligação Fc-antígeno com uma ligação química (FIG. 6C).

[00168] Em algumas modalidades, um ou mais polipeptídeos de Fc em construto de domínio de ligação Fc-antígeno não possuem um resíduo de lisina C-terminal. Em algumas modalidades, todos os polipeptídeos de Fc em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno não possuem um resíduo de lisina C-terminal. Em algumas

modalidades, a ausência de uma lisina C-terminal em um ou mais polipeptídeos de Fc em um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode aprimorar a homogeneidade de uma população de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno (por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno com três domínios Fc), por exemplo, uma população de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc que é pelo menos 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% homogênea.

[00169] Em algumas modalidades, a Asp N-terminal em um ou mais dos polipeptídeos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento podem ser mutada a Gln.

[00170] Para os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno exemplares descritos nos Exemplos neste documento, os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem conter pares da carga de E357K e de K370D nas subunidades "Knobs" e "Holes", respectivamente. Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno 29-42 podem usar as mutações de orientação eletrostática ortogonais que podem conter pareamentos de E357K e de K370D, e também poderiam incluir mutações de orientação adicionais. Para construtos do domínio de ligação Fc-antígeno 29-42 com mutações de orientação eletrostática de "knobs" e "holes" ortogonais são requeridos todos menos um dos pares ortogonais, e podem ser incluídos em todos os pares ortogonais.

[00171] Em algumas modalidades, se dois "knobs" e "holes" ortogonais forem requeridos, a modificação de orientação eletrostática para "Knob1" pode ser E357K e a modificação de orientação eletrostática para "Hole1" pode ser K370D, e a modificação de orientação eletrostática para "Knob2" pode ser K370D e a modificação de orientação eletrostática para "Hole2" pode ser E357K. Se houver a necessidade de um terceiro "knob" e "hole" ortogonais (por exemplo, para um anticorpo trispecífico) modificações de orientação

eletrostática E357K e D399K podem ser adicionadas para "Knob3" e as modificações de orientação eletrostática K370D e K409D podem ser adicionadas para "Hole3" ou as modificações de orientação eletrostática K370D e K409D podem ser adicionadas para "Knob3" e as modificações de orientação eletrostática E357K e D399K podem ser adicionadas para "Hole3".

[00172] Qualquer um dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno exemplares descrito neste documento (por exemplo, construtos do domínio de ligação Fc-antígeno 1-42) pode ter função efetora potencializada em um ensaio de citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC), um ensaio de fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e/ou ensaio de citotoxicidade dependente do complemento (CDC) em relação a um construto com um único domínio Fc e o domínio de ligação ao antígeno, ou pode incluir uma atividade biológica que não é exibida por um construto com um único domínio Fc e o domínio de ligação ao antígeno.

IX. Produção de células hospedeiras e de proteína

[00173] Na presente divulgação, uma célula hospedeira se refere a um veículo que inclui os componentes celulares necessários, por exemplo, organelas, para expressar polipeptídeos e construtos descritos neste documento a partir de seus ácidos nucleicos correspondentes. Os ácidos nucleicos podem ser incluídos em vetores de ácido nucleico que podem ser introduzidos na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas na técnica (transformação, transfecção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.). As células hospedeiras podem ser de origem mamífera, bacteriana, de fungos ou de insetos. As células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não estão limitadas a, CHO (ou cepas de células derivadas de CHO, por exemplo, CHO-K1, CHO-DXB11 CHO-DG44), células hospedeiras murinas (por exemplo, NS0, Sp2/0), VERY,

HEK (por exemplo, HEK293), BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, CRL7030 e células HsS78Bst. Também podem ser escolhidas células hospedeiras que modulem a expressão dos construtos proteicos, ou modifiquem e processem o produto proteico da maneira específica desejada. Células hospedeiras diferentes têm características e mecanismos específicos para o processamento pós-traducional e modificação de produtos proteicos. As linhas de célula apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para garantir a correta modificação e processamento da proteína expressa.

[00174] Para a expressão e secreção de produtos proteicos a partir de seus construtos plasmidiais de DNA correspondentes, as células hospedeiras podem ser transfectadas ou transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão adequados conhecidos na técnica, incluindo o promotor, potencializador, sequências, exterminadores de transcrição, sítios de poliadenilação e marcadores selecionáveis. Os métodos para a expressão de proteínas terapêuticas são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2ª ed. edição de 2004 (20 de julho de 2004); Vladimir Voynov e Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2ª ed. edição de 2012 (28 de junho de 2012).

[00175] Em algumas modalidades, pelo menos 50% do construto de domínio de ligação Fc-antígeno que são produzidos por uma célula hospedeira transfectada com construtos de plasmídeo do DNA que codificam os polipeptídeos que se unem para formar o construto de Fc, por exemplo, no sobrenadante da cultura celular, são estruturalmente idênticos (em uma base molar), por exemplo, 50%, 60%, 70%, 80%,

90%, 95%, 100% dos construtos de Fc são estruturalmente idênticos.

X. Afucosilação

[00176] Cada monômero de Fc inclui um sítio de N-glicosilação na Asn 297. O glicano pode estar presente em um número de diferentes formas em um dado monômero de Fc. Em uma composição contendo anticorpos ou os construtos de ligação ao antígeno-Fc descritos neste documento, os glicanos podem ser bastante heterogêneos e a natureza do presente glicano pode depender, entre outras coisas, do tipo de células usadas para produzir os anticorpos ou construtos de ligação ao antígeno-Fc, as condições de crescimento para as células (incluindo os meios de crescimento) e purificação pós-produção. Em vários casos, as composições contendo um construto descrito neste documento são afucosilados até certo ponto, pelo menos. Por exemplo, pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% dos glicanos (por exemplo, os glicanos de Fc) presentes na composição não têm um resíduo de fucose. Assim, 5%-60%, 5%-50%, 5%-40%, 10%-50%, 10%-50%, 10%-40%, 20%-50%, ou 20%-40% dos glicanos não têm um resíduo de fucose. Composições que são afucosiladas até pelo menos certo ponto podem ser produzidas por células de cultura produtoras de anticorpos na presença de inibidor de 1,3,4-Tri-O-acetil-2-deoxi-2-fluoro-L-fucose. Formas relativamente afucosiladas dos construtos e polipeptídeos descritos neste documento podem ser produzidas usando uma variedade de outros métodos, incluindo: expressar em células com expressão de FUT8 reduzida ou ausente e expressar em células que superexpressam beta-1,4-manosilglicoproteína 4-beta-N-acetilglucosamiltransferase (GnT-III).

XI. Purificação

[00177] Um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica de purificação proteica, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca de íons,

afinidade (por exemplo, afinidade de Proteína A) e cromatografia em coluna por exclusão de tamanho), centrifugação, solubilidade diferenciada ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Por exemplo, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode ser isolado e purificado adequadamente selecionando e combinando colunas de afinidade como coluna da Proteína A com colunas de cromatografia, filtração, ultra filtração, procedimentos de "salting-out" e de diálise (ver, por exemplo, *Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009; e Subramanian (ed.) *Antibodies-Volume I-Production and Purification*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova York (2004)).

[00178] Em alguns casos, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno pode ser conjugado a um ou mais peptídeos de purificação para facilitar a purificação e isolamento do construto de domínio de ligação Fc-antígeno a partir de, por exemplo, toda a mistura de lisado celular. Em algumas modalidades, o peptídeo de purificação se liga a outra fração que tenha uma afinidade específica pelo peptídeo de purificação. Em algumas modalidades, essas frações que se ligam especificamente ao peptídeo de purificação estão ligadas a um suporte sólido, tal como uma matriz, uma resina, ou esferas de agarose. Os exemplos de peptídeos de purificação que podem ser unidos a um construto de domínio de ligação Fc-antígeno incluem, mas não estão limitados a, peptídeos de hexa-histidina, um peptídeo FLAG, um peptídeo myc e um peptídeo de hemaglutinina (HA). Um peptídeo de hexa-histidina (HHHHHH (SEQ ID NO: 38)) se liga à coluna de afinidade de agarose funcionalizada com níquel com afinidade micromolecular. Em algumas modalidades, um peptídeo FLAG inclui a sequência DYKDDDDK (SEQ ID NO: 39). Em algumas modalidades, um peptídeo FLAG inclui múltiplos inteiros da sequência DYKDDDDK na série em tandem, por exemplo, 3xDYKDDDDK. Em algumas modalidades, um

peptídeo myc inclui a sequência EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 40). Em algumas modalidades, um peptídeo myc inclui múltiplos inteiros da sequência EQKLISEEDL na série em tandem, por exemplo, 3xEQKLISEEDL. Em algumas modalidades, um peptídeo HA inclui a sequência YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 41). Em algumas modalidades, um peptídeo HA inclui múltiplos inteiros da sequência YPYDVPDYA na série em tandem, por exemplo, 3xYPYDVPDYA. Os anticorpos que especificamente reconhecem e se ligam ao peptídeo de purificação FLAG, myc ou HA são bem conhecidos na técnica e geralmente estão comercialmente disponíveis. Um suporte sólido (por exemplo, uma matriz, uma resina ou grânulos de agarose) funcionalizado com estes anticorpos pode ser usado para purificar um construto de domínio de ligação Fc-antígeno que inclui um peptídeo FLAG, myc ou HA.

[00179] Para os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno, a cromatografia em coluna da Proteína A pode ser empregada como um processo de purificação. Os ligantes da Proteína A interagem com os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno através da região Fc, tornando a cromatografia de Proteína A um processo de captura altamente seletivo que é capaz de remover a maior parte das proteínas de célula hospedeira. Na presente divulgação, os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno podem ser purificados usando a cromatografia por coluna de Proteína A, conforme descrito nos Exemplo 2-3.

[00180] Em algumas modalidades, o uso de domínios de heterodimerização e/ou homodimerização descritos neste documento permite a preparação de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno com 60% ou mais pureza, ou seja, em que 60% ou mais do material do construto proteico produzido nas células tem a estrutura de construto de Fc desejada, por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% do material de construto de Fc em uma preparação que tem a estrutura de construto

de Fc desejada. Em algumas modalidades, menos de 30% do material de construto proteico em uma preparação de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno tem uma estrutura de construto de Fc não desejada (por exemplo, uma espécie de ordem superior do construto, conforme descrito no Exemplo 1) por exemplo, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, ou menos do material de construto proteico em uma preparação tem uma estrutura de construto de Fc não desejado. Em algumas modalidades, a pureza final de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno, após purificação adicional usando um ou mais métodos conhecidos de purificação (por exemplo, purificação de afinidade de Proteína A), pode ser 80% ou mais, ou seja, em que 80% ou mais do material de construto proteico purificado tem a estrutura de construto de Fc desejada, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% do material de construto proteico em uma preparação tem a estrutura de construto de Fc desejada. Em algumas modalidades, menos de 15% do material de construto proteico em uma preparação de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno que é ainda mais purificado usando um ou mais métodos conhecidos de purificação (por exemplo, purificação de afinidade de Proteína A) tem uma estrutura de construto de Fc indesejada (por exemplo, uma espécie de ordem superior do construto, conforme descrito no Exemplo 1), por exemplo, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, ou menos do material de construto proteico na preparação tem uma estrutura de construto de Fc indesejada.

XII. Composições/preparações farmacêuticas

[00181] A divulgação apresenta composições farmacêuticas que incluem um ou mais construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos neste documento. Em uma modalidade, uma composição farmacêutica inclui uma população substancialmente homogênea de construtos do domínio de ligação Fc que são idênticas ou

substancialmente idênticas na estrutura. Em vários exemplos, a composição farmacêutica inclui uma população substancialmente homogênea de qualquer um dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno 1-42.

[00182] Um construto de proteína terapêutica, por exemplo, um construto do domínio de ligação Fc-antígeno descrito neste documento (por exemplo, um construto do domínio de ligação Fc-antígeno tendo três domínios Fc), da presente divulgação pode ser incorporado em uma composição farmacêutica. As composições farmacêuticas que incluem proteínas terapêuticas podem ser formuladas por métodos conhecidos pelos versados na técnica. A composição farmacêutica pode ser administrada parentericamente na forma de uma formulação injetável incluindo uma solução ou suspensão estéril em água ou outro líquido farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, a composição farmacêutica pode ser formulada combinando apropriadamente o construto de domínio de ligação Fc-antígeno com veículos ou meios farmaceuticamente aceitáveis, como água estéril para injeção (WFI), soro fisiológico, emulsionante, agente de suspensão, surfactante, estabilizador, diluente, aglutinante, excipiente, seguidos de mistura em forma de dose unitária necessária para práticas farmacêuticas geralmente aceitas. A quantidade de ingrediente ativo incluído nas preparações farmacêuticas é tal que uma dose apropriada dentro da faixa designada é fornecida.

[00183] A composição estéril para injeção pode ser formulada em conformidade com práticas farmacêuticas convencionais usando água destilada para injeção como um veículo. Por exemplo, o soro fisiológico ou uma solução isotônica contendo glicose e outros suplementos tais como D-sorbitol, D-manose, D-manitol e cloreto de sódio podem ser usados como uma solução aquosa para injeção, opcionalmente em combinação com um agente solubilizante adequado, por exemplo,

álcool tal como etanol e poliálcool tal como propilenoglicol ou polietilenoglicol, e um surfactante não iônico, tal como polissorbato 80™, HCO-50 e semelhantes comumente conhecidos na técnica. Os métodos de formulação para os produtos proteicos terapêuticos são conhecidos na técnica, ver por exemplo, Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2ª ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006).

XIII. Métodos de Tratamento e Dosagem

[00184] Os construtos descritos neste documento podem ser usados para tratar distúrbios que são tratados pelo anticorpo a partir do qual o domínio de ligação ao antígeno é derivado. Por exemplo, quando o construto tem um domínio de ligação ao antígeno que reconhece CD38, o construto pode ser usado para tratar uma variedade de cânceres (por exemplo, malignidades hematológicas e tumores sólidos) e doenças autoimunes. O câncer pode ser um que é resistente a um tratamento do anticorpo monoclonal anti-CD38 terapêutico. O câncer pode ser selecionado dentre: câncer gástrico, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pulmão, linfoma de células do manto, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia de células NK, linfoma de células T/NK, leucemia linfocítica crônica, leucemia de células plasmáticas e mieloma múltiplo. Os construtos podem também ser usados para tratar: Amiloidose de cadeia leve amiloide, doença de Castleman, gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), gamopatia biclonal de significado indeterminado, doenças da cadeia pesada, plasmocitoma solitário, plasmocitoma extramedular. Em alguns casos, os construtos podem ser usados aumentar funções imunorreguladoras contra as células de câncer pela indução mediada do complexo imune de efeitos preventivos e/ou terapêuticos da vacina. Os construtos direcionados por CD38 podem também ser usadas tratar: discrasias da célula plasmática ou gamopatias monoclonais como:

Doença de deposição de cadeia leve, Glomerulonefrite Membranoproliferativa (MGRS), anemia hemolítica autoimune, Síndrome de Tempí (Telangiectasia-Eritrocitose-Gamopatia Perinéfrica Monoclonal-Coleções Fluídas-Desvio Intrapulmonar), Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso

[00185] Síndrome de POEMS (Polineuropatia-Organomegalia-Endocrinopatia- Distúrbio plasmaproliferativo monoclonal-Pele) e Macroglobulinemia de Waldenström

[00186] Os construtos podem ser usados para tratar doenças mediadas por autoanticorpos, tais como: Miastenia Gravis (MG), MuSK-MG, Miocardite, Lambert Eaton, Síndrome miastênica, Neuromiotonia, Neuromielite ótica, Narcolepsia, Neuropatia axonal motora aguda, Síndrome de Guillain-Barré, Síndrome de Fisher, Neuropatia atáxica sensorial aguda, Síndrome da pessoa rígida paraneoplásica, Neuropatia Crônica, Neuropatia Periférica, Encefalomielite aguda disseminada, Esclerose Múltipla, Síndrome de Goodpasture, Nefropatia Membranosa, Glomerulonefrite, Proteinose Alveolar Pulmonar, CIPD, Anemia hemolítica autoimune, púrpura trombocitopênica autoimune, Pênfigo vulgar, Pênfigo foliáceo, pênfigo bolhoso, gestações penfigoide, Epidermólise bolhosa adquirida, lúpus neonatal eritematoso, Dermatite herpetiforme, Doença de Graves, Doença de Addison, Insuficiência ovariana, Orquite autoimune, Doença de Sjogren, Gastrite Autoimune, Artrite Reumatoide, SLE, Doença do Olho Seco, Vasculite (Aguda), Cardite, e rejeição mediada por anticorpo.

[00187] As composições farmacêuticas são administradas de uma forma compatível com a formulação de dosagem e em uma quantidade tal como é terapeuticamente eficaz para resultar em uma melhoria ou remediação dos sintomas. As composições farmacêuticas são administradas em uma variedade de formas de dosagem, por exemplo, formas de dosagem intravenosas, formas de dosagem subcutâneas,

formas de dosagem orais, tais como soluções ingeríveis, cápsulas de liberação de fármacos e semelhantes. A dosagem apropriada para o sujeito individual depende dos objetivos terapêuticos, a via de administração e a condição do paciente. Geralmente, as proteínas recombinantes são dosadas em 1-200 mg/kg, por exemplo, 1-100 mg/kg, por exemplo, 20-100 mg/kg. Em conformidade, será necessário que um médico adeque e meça a concentração da dosagem e modifique a via de administração conforme necessário para obter o efeito terapêutico ideal.

XIV. Citotoxicidade Dependente do Complemento (CDC)

[00188] Construtos do domínio de ligação Fc-antígeno descritos nesta divulgação são capazes de ativar várias funções efetoras mediados pelo receptor Fc. Um componente do sistema imunológico é o sistema de citotoxicidade dependente do complemento (CDC), uma parte do sistema imunológico inato que potencializa a capacidade de anticorpos e células fagocíticas de limpar patógenos estranhos. Três vias bioquímicas ativam o sistema do complemento: a via do complemento clássico, a via do complemento alternativa, e a via de lectina, que implicam um conjunto complexo de ativação complexa e cascatas de sinalização.

[00189] Na via do complemento clássica, IgG ou IgM desencadeiam a ativação do complemento. A proteína C1q se liga a esses anticorpos depois de terem se ligado a um antígeno, formando o complexo C1. Este complexo gera C1s esterase, que cliva e ativa as proteínas C4 e C2 em C4a e C4b, e C2a e C2b. Os fragmentos C2a e C4b formam então um complexo proteico chamado C3 convertase, que cliva C3 em C3a e C3b, levando a uma amplificação de sinal e formação do complexo de ataque de membrana.

[00190] Os construtos de domínio de ligação Fc-antígeno desta divulgação são capazes de melhorar a atividade do CDC pelo sistema

imunológico.

[00191] O CDC foi avaliado por um ensaio colorimétrico no qual células Raji (ATCC) foram revestidas com um anticorpo diluído serialmente, construído de domínio de ligação Fc ou IVIg. O complemento sérico humano (Quidel) pode ser adicionado a todos os poços a 25% v/v e incubado por 2 h a 37°C. As células foram incubadas por 12 h a 37°C após adição de reagente de proliferação celular WST-1 (Roche Applied Science). As placas podem então ser colocadas em um agitador por 2 minutos e absorbância a 450 nm pode ser medida.

XV. Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC)

[00192] Os construídos do domínio de ligação Fc-antígeno desta divulgação também são capazes de potencializar a atividade de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) pelo sistema imunológico. A ADCC é uma parte do sistema imunológico adaptativo onde anticorpos se ligam a antígenos superficiais de patógenos estranhos e os direcionam para eliminação. A ADCC envolve a ativação de células natural killer (NK) por anticorpos. As células NK expressam receptores Fc, que se ligam a porções Fc de anticorpos como IgG e IgM. Quando os anticorpos são ligados à superfície de uma célula alvo infectada por patógenos, eles então se ligam às células NK e as ativam. As células NK liberam citocinas como IFN- γ , e proteínas como perforina e granzimas. Perforina é um poro formando citolisina que oligomeriza na presença de cálcio. Granzimas são proteases de serinas que induzem morte celular programada em células alvo. Além às células NK, os macrófagos, os neutrófilos e os eosinófilos podem também mediar a ADCC.

[00193] A ADCC pode ser avaliada usando um ensaio de luminescência. Células efectoras NK primárias humanas (Hemacare) são descongeladas e repousadas durante a noite a 37°C em meio de

crescimento de linfócitos-3 (Lonza) a 5×10^5 / mL. No dia seguinte, as células alvo Raji da linhagem celular linfoblastoide humana (ATCC CCL-86) são colhidas, ressuspensas em meios de ensaio (RPMI livre de vermelho de fenol, 10% de FBSΔ, GlutaMAX™) e plaqueadas na presença de várias concentrações de cada sonda de interesse por 30 minutos a 37°C. As células NK em repouso são então colhidas, ressuspensas em meios de ensaio e adicionadas às placas contendo as células Raji revestidas com anti-CD20. As placas são incubadas a 37°C durante 6 horas com a proporção final de células efetoras para células alvo de 5:1 (5×10^4 células NK: 1×10^4 Raji).

[00194] O kit de Ensaio de Citotoxicidade CytoTox-Glo™ (Promega) é usado para determinar a atividade ADCC. O ensaio CytoTox-Glo™ usa um substrato de peptídeo luminogênico para medir a atividade da protease das células mortas, que é liberada pelas células que perderam a integridade da membrana, por exemplo, células Raji lisadas. Após o período de incubação de 6 horas, o reagente preparado (substrato) é adicionado a cada poço da placa e colocado em um agitador de placa orbital por 15 minutos em temperatura ambiente. A luminescência é medida usando o leitor de placas PHERAstar F5 (BMG Labtech). Os dados são analisados após as leituras das condições de controle (células NK + Raji apenas) serem subtraídas das condições de teste para eliminar o fundo.

XVI. Fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP)

[00195] Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno desta divulgação também são capazes de potencializar a atividade de fagocitose mediada por células dependentes de anticorpos (ADCP) pelo sistema imunológico. A ADCP, também conhecida como opsonização de anticorpos, é o processo pelo qual um patógeno é marcado para ingestão e eliminação por um fagócito. Os fagócitos são células que protegem o corpo ingerindo patógenos estranhos nocivos e células

mortas ou morrendo. O processo é ativado por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), que levam à ativação de NF-κB. Oponinas, como C3b e anticorpos, podem se ligar a patógenos alvo. Quando um alvo é revestido com opsonina, os domínios Fc atraem fagócitos por meio de seus receptores Fc. Os fagócitos então envolvem as células e o fagossomo do material ingerido é fundido com o lisossoma. O fagolisossomo subsequente então digere proteoliticamente o material celular.

[00196] A ADCP pode ser avaliada usando um ensaio de bioluminescência. A fagocitose mediada por células dependente de anticorpos (ADCP) é um importante mecanismo de ação dos anticorpos terapêuticos. A ADCP pode ser mediada por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas via FcγRIIa (CD32a), FcγRI (CD64) e FcγRIIIa (CD16a). Todos os três receptores podem participar no reconhecimento de anticorpos, agrupamento de receptores imunológicos e eventos de sinalização que resultam em ADCP; no entanto, estudos de bloqueio sugerem que FcγRIIa é o receptor Fc predominante envolvido neste processo.

[00197] O Bioensaio de Repórter ADCP FcγRIIa-H é um ensaio de bioluminescência baseado em células que pode ser usado para medir a potência e estabilidade de anticorpos e outros produtos biológicos com domínios Fc que se ligam e ativam especificamente FcγRIIa. O ensaio consiste em uma linhagem de células T Jurkat geneticamente modificada que expressa a variante FcγRIIa-H humana de alta afinidade que contém uma Histidina (H) no aminoácido 131 e um repórter de luciferase conduzido por um elemento de resposta a NFAT (NFAT-RE).

[00198] Quando cocultivadas com uma célula alvo e anticorpo relevante, as células efectoras FcγRIIa-H ligam-se ao domínio Fc do anticorpo, resultando na sinalização de FcγRIIa e atividade de luciferase mediada por NFAT-RE. O sinal bioluminescente é detectado e

quantificado com um ensaio de Luciferase e um luminômetro padrão.

Exemplos

[00199] Os exemplos a seguir são apresentados de modo a fornecer aos versados na técnica uma divulgação e descrição completas de como os métodos e compostos reivindicados neste documento são realizados, feitos e avaliados e se destinam a ser puramente exemplares da divulgação e não se destinam a limitar o escopo do que os inventores consideram sua divulgação.

Exemplo 1. Uso de domínios de heterodimerização ortogonais para controlar a montagem de polipeptídeos contendo domínio Fc-antígeno linear

[00200] Uma variedade de abordagens para anexar domínios Fc aos terminais C de anticorpos foram descritos, incluindo a produção de construtos Fc em tandem com e sem ligantes peptídicos entre domínios Fc (ver, por exemplo, Nagashima et al., *Mol Immunol*, 45: 2752-63, 2008, e Wang et al. *MAbs*, 9: 393-403, 2017). No entanto, os métodos descritos na literatura científica para produzir construtos de anticorpos com múltiplos domínios Fc são limitados em sua eficácia porque esses métodos resultam na produção de numerosas espécies indesejadas de proteínas contendo o domínio Fc. Essas espécies têm pesos moleculares diferentes que resultam de associação fora de registro não controlada de cadeias polipeptídicas durante a produção do produto, resultando em uma escada de pesos moleculares (ver, por exemplo, Nagashima et al., *Mol Immunol*, 45:2752-63, 2008 , e Wang et al. *MAbs*, 9:393-403, 2017). As FIG. 1 e FIG. 2 representam esquematicamente alguns exemplos das espécies de proteínas com múltiplos domínios Fc de vários pesos moleculares que podem ser produzidos pela associação fora de registro de polipeptídeos contendo dois monômeros de Fc em tandem (FIG. 1) ou três monômeros de Fc em tandem (FIG. 2). Consistentemente, alcançar um construto de domínio de ligação Fc-

antígeno desejado com vários domínios Fc tendo um peso molecular definido usando essas abordagens existentes requer a remoção de espécies de ordem superior (HOS) com pesos moleculares maiores, o que reduz muito o rendimento do construto desejado.

[00201] O uso de domínios de heterodimerização ortogonais permitiu a produção de estruturas semelhantes a anticorpos com extensões Fc em tandem sem também gerar grandes quantidades de espécies de ordem superior (HOS). As FIGs. 3A e 3B representam exemplos de construtos do domínio de ligação Fc-antígeno lineares ortogonais com dois domínios Fc (FIG. 3A) ou 3 domínios Fc (FIG. 3B) que são produzidos pela união de um polipeptídeo longo com vários monômeros do domínio Fc a dois polipeptídeos curtos diferentes, cada um com um único monômero de Fc. Nestes exemplos, um domínio Fc de cada construto inclui mutações "knobs-into-holes" em combinação com uma mutação de carga inversa na interface CH3-CH3 do domínio Fc e duas mutações de carga inversa na interface CH3-CH3 de qualquer 1 do outro domínio Fc (FIG. 3A) ou 2 outros domínios Fc (FIG. 3B). Cadeias polipeptídicas curtas com monômeros de Fc tendo as duas mutações de carga inversa têm uma afinidade mais baixa para o monômero de Fc de cadeia longa com mutações formadoras de protuberância e uma mutação de carga inversa única, e são muito mais propensos a se ligar ao(s) monômero(s) Fc de cadeia longa tendo 2 mutações de carga inversa compatíveis. As cadeias polipeptídicas curtas com monômeros de Fc tendo mutações formadoras de cavidade em combinação com uma mutação de carga inversa são muito mais propensas a se ligar ao monômero de Fc de cadeia longa tendo mutações formadoras de protuberância em combinação com uma mutação de carga inversa compatível.

[00202] Os exemplos 2 e 3 descrevem a produção de construtos do domínio de ligação Fc-antígeno lineares ortogonais que correspondem

às estruturas representadas nos esquemas das FIGs. 3A e 3B. O Construto 43 e o Construto 44, tendo domínios anti-CD20 ou anti-PD-L1, foram produzidos com espécies de ordem superior indesejadas mínimas e testados quanto à funcionalidade usando ensaios CDC, ADCP e ADCC.

Exemplo 2. Design e purificação do construto 43 do domínio de ligação Fc-antígeno com um domínio de ligação ao antígeno anti-CD20 ou um domínio de ligação ao antígeno anti-PD-L1

[00203] Construtos do domínio de ligação Fc-antígeno são projetados para aumentar eficiências de dobramento, minimizar associação não controlada de subunidades, o que pode criar oligômeros e multímeros com massa molecular alta indesejados, e gerar composições para uso farmacêutico que sejam substancialmente homogêneas (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% homogêneas). Com esses objetivos em mente, um construto não ramificada formada a partir de domínios Fc em tandem (FIG. 4) foi feito conforme descrito abaixo. O construto 43 do domínio de ligação Fc-antígeno (CD20) e o construto 44 (PD-L1) incluem, cada um, três monômeros de Fc distintos contendo polipeptídeos (uma cadeia Fc longa anti-CD20 (SEQ ID NO: 234) ou uma cadeia Fc longa anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 235); uma cópia de uma primeira cadeia Fc curta (SEQ ID NO: 236); e uma cópia de uma segunda cadeia Fc curta que é uma cadeia Fc curta anti-CD20 (SEQ ID NO: 67) ou uma cadeia Fc curta anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 68)); e duas cópias de um polipeptídeo de cadeia leve anti-CD20 (SEQ ID NO: 61) ou de um polipeptídeo de cadeia leve anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 49), respectivamente. A cadeia Fc longa contém dois monômeros do domínio Fc em uma série em tandem, cada um com uma mutação formadora de protuberância diferente selecionada da Tabela 3 (mutações de heterodimerização) e/ou mutação de carga inversa diferente selecionada da Tabela 4, em uma

série em tandem com um domínio de ligação ao antígeno no terminal N. A primeira cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com um primeiro conjunto de mutações formadoras de cavidade selecionadas da Tabela 3 e/ou uma ou mais mutações de carga inversa selecionadas da Tabela 4 (em que as mutações são diferentes das mutações na segunda cadeia Fc curta). A segunda cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com um primeiro conjunto de mutações formadoras de cavidade selecionadas da Tabela 3 e/ou uma ou mais mutações de carga inversa selecionadas da Tabela 4 (em que as mutações são diferentes do primeiro conjunto de mutações na primeira cadeia Fc curta), e um domínio de ligação ao antígeno no terminal N.

[00204] Neste caso, a cadeia Fc longa contém um monômero do domínio Fc com mutações de carga D356K e D399K em uma série em tandem com um monômero do domínio Fc com mutações formadoras de protuberância S354C e T366W e uma mutação de carga E357K, e domínios VH e CH1 anti-CD20 (posições EU 1-220) no terminal N (construto 43 (CD20) ou domínios VH e CH1 anti-PD-L1 VH (posições EU 1-220) no terminal N (construto 43 (PD-L1)) . A primeira cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com mutações de carga K392D e K409D. A segunda cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com mutações formadoras de cavidade Y349C, T366S, L368A e Y407V e uma mutação de carga K370D e domínios CH1 e anti-CD20 VH (posições EU 1-220) no terminal N (construto 43 (CD20)) ou domínios CH1 e anti-PD-L1 VH (posições EU 1-220) no terminal N (construto 43 (PD-L1)).

Tabela 8. Sequências do construto 43 (CD20) e construto 43 (PD-L1)

Construto	Cadeia leve	Cadeia Fc longa (com anti-CD20 ou anti-PD-L1 VH e CH1)	Primeira cadeia Fc curta	Segunda cadeia Fc curta (com anti-CD20 ou anti-PD-L1 VH e CH1)
Construto 43 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSL PVTGPGEASI SCRSSKSLH SNGITYLYWY LQKPGQSPQL LIYQMSNLVS GVPDRFSGS GSGTDFTLKIS RVEAEDVGVY YCAQNLELPY TFGGGKVEI KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQS GNSQESVTE QDSKDYSL SSTLTLKAD YEHKVVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC	SEQ ID NO: 234 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDVAVYCAR NVFDGYWLVYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKVV EPKSCDKHTCPCPEPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLW GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRD KLTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHT CPCPEPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLSKSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKLSLSP GQ	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHED DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYDTTPPVLDSD GSFFLYSDLTVD KSRWQQGNVFSC CSVMHEALHNHY TQKLSLSPG	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCKASGYA FSYSWINWVRQAP GGGLEWMGRIFPG DGDYDNGKFKGR VTITADKSTSTAYME LSSLRSEDVAVYCAR ARNVFDGYWLVYVW GQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGAL TSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKVEPKS CDKHTCPCPEPELL LLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTK KPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVDGFYPS SDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSL SPG
Construto 43 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASV SGSPGQITIS CTGTSSDVG GYNVSWYQ QHPGKAPKL MIYDVSNRPS GVSNRFGSK SGNTASLTIS LQAEDADY YCSSYSSST RVFGTGKVT VLGQPKANPT VTLFPPSSEE LQANKATLVC LISDFYPGAVT VAWKVGGSP VKAGVETTKP SKQSNKYAA SSYLSLTPEQ	SEQ ID NO: 235 EVQLLESGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQA PGKGLEWVSSIYPSGGITFYA DTVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARIKLG TVTTVDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKVEPKSC DKHTCPCPEPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEW	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHED DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYDTTPPVLDSD GSFFLYSDLTVD KSRWQQGNVFSC CSVMHEALHNHY TQKLSLSPG	SEQ ID NO: 68 EVQLLESGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQA FSSYIMMWVRQAP GKGLEWVSSIYPSG GITFYADTVKGRFTI SRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARI KLGTVTTVDYWGQ GLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPS NTKVDKVEPKSCD KHTCPCPEPELL GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVD

WKSHRSYSC QVTHEGSTVE KTVAPTECS	ESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRKELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLKSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	DVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVDGFYPSD IAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQ QGNVFCSSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP G
--------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cultura de Células

[00205] As sequências de DNA foram otimizadas para expressão em células mamíferas e clonadas no vetor de expressão de mamífero pcDNA3.4. Os construtos de plasmídeo de DNA foram transfectados através de lipossomas em 293 células de rim humano embrionário (HEK). As sequências de aminoácidos para as cadeias Fc curta e longa foram codificadas por múltiplos plasmídeos.

Purificação de Proteína

[00206] As proteínas expressadas foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura de células por cromatografia em coluna de afinidade com base em Proteína A, usando uma coluna Poros MabCapture A (LifeTechnologies). Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno capturados foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,0) após o carregamento e posteriormente lavados com tampão de lavagem intermediário, tampão citrato 50 mM (pH 5,5) para remover impurezas adicionais relacionadas ao processo. O material do construto de Fc ligado foi eluído com glicina 100 mM, pH 3 e o eluato foi rapidamente neutralizado pela adição de TRIS 1 M pH 7,4, em seguida, centrifugado e filtrado de maneira estéril através de um filtro de 0,2 µm.

[00207] As proteínas foram adicionalmente fracionadas por cromatografia de troca iônica usando resina Poros XS (Applied

Biosciences). A coluna foi pré-equilibrada com MES 50 mM, pH 6 (tampão A), as amostras foram diluídas (1:3) no tampão de equilíbrio antes do carregamento. A amostra foi eluída usando um gradiente linear 12-15CV de MES 50 mM (100% A) para cloreto de sódio 400 mM, pH 6 (100% B) como tampão de eluição. Todas as frações coletadas durante a eluição foram analisadas por cromatografia por exclusão de tamanho analítica (SEC) e as frações alvo foram agrupadas para produzir o material de construto de Fc purificado.

[00208] Após a troca iônica, a fração alvo foi trocada por meio de tampão em tampão 1X-PBS usando um cartucho de membrana polietersulfona (PES) com cut-off de 30 kDa em um sistema de filtração de fluxo tangencial. As amostras foram concentradas a aproximadamente 10-15 mg/mL e submetidas à filtração estéril através de um filtro de 0,2 µm.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio Não Redutor (SDS-PAGE)

[00209] As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (4% SDS, Bio-Rad) a 95°C por 10 minutos. As amostras correram em um gel livre de corantes Criterion TGX (4-15% poliacrilamida, Bio-Rad). As bandas de proteína foram visualizadas por iluminação UV ou coloração com azul de Coomassie. Géis foram imageados pelo Sistema de Imageamento ChemiDoc MP (Bio-Rad). A quantificação de bandas foi realizada usando software ImagemLab 4.0.1 (Bio-Rad).

Exemplo 3. Design e purificação do construto 44 do domínio de ligação Fc-antígeno com um domínio de ligação ao antígeno anti-CD20 ou um domínio de ligação ao antígeno anti-PD-L1

[00210] Um construto não ramificado formado a partir de domínios Fc em tandem (FIG. 5) foram feitos conforme descrito abaixo. O construto 44 do domínio de ligação Fc-antígeno (CD20) e o construto

44 (PD-L1) incluem, cada um, três monômeros de Fc distintos contendo polipeptídeos (uma cadeia Fc longa anti-CD20 (SEQ ID NO: 237) ou uma cadeia Fc longa anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 238); duas cópias de uma primeira cadeia Fc curta (SEQ ID NO: 236); e uma cópia de uma segunda cadeia Fc curta que é uma cadeia Fc curta anti-CD20 (SEQ ID NO: 67) ou uma cadeia Fc curta anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 68)); e duas cópias de um polipeptídeo de cadeia leve anti-CD20 (SEQ ID NO: 61) ou de um polipeptídeo de cadeia leve anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 49), respectivamente. A cadeia Fc longa contém três monômeros do domínio Fc, cada um com um conjunto de mutações formadora de protuberância selecionada da Tabela 3 (mutações de heterodimerização), e, opcionalmente, um ou mais mutações de carga inversa selecionada da Tabela 4, (o terceiro monômero do domínio Fc com um conjunto de mutações de heterodimerização diferente dos dois primeiros) em uma série em tandem com um domínio de ligação ao antígeno no terminal N. A primeira cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com um primeiro conjunto de mutações formadoras de cavidade selecionadas da Tabela 3 e, opcionalmente, uma ou mais mutações de carga inversa selecionadas da Tabela 4 (em que as mutações são diferentes de um segundo conjunto de mutações na segunda cadeia Fc curta). A segunda cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com um segundo conjunto de mutações formadoras de cavidade selecionadas da Tabela 3 e, opcionalmente, uma ou mais mutações de carga inversa selecionadas da Tabela 4 (em que as mutações são diferentes do primeiro conjunto de mutações na primeira cadeia Fc curta), e um domínio de ligação ao antígeno no terminal N.

[00211] Neste caso, a cadeia Fc longa contém dois monômeros do domínio Fc, cada um com mutações de carga D356K e D399K em uma série em tandem com um monômero do domínio Fc com mutações formadoras de protuberância S354C e T366W e uma mutação de carga

E357K, e domínios VH e CH1 anti-CD20 (posições EU 1-220) no terminal N (construto 44 (CD20)) ou domínios VH e CH1 e anti-PD-L1 (posições EU 1-220) no terminal N (construto 44 (PD-L1)) . A primeira cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com mutações de carga K392D e K409D. A segunda cadeia Fc curta contém um monômero do domínio Fc com mutações formadoras de cavidade Y349C, T366S, L368A e Y407V e uma mutação de carga K370D e domínios CH1 e anti-CD20 VH (posições EU 1-220) no terminal N (construto 44 (CD20)) ou domínios CH1 e anti-PD-L1 VH (posições EU 1-220) no terminal N (construto 44 (PD-L1)).

Tabela 9. Sequências do Construto 44 (CD20) e Construto 44 (PD-L1)

Construto	Cadeia leve	Cadeia Fc longa (com anti-CD20 ou anti-PD-L1 VH e CH1)	Primeira cadeia Fc curta	Segunda cadeia Fc curta (com anti-CD20 ou anti-PD-L1 VH e CH1)
Construto 44 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL HSNGITYLYW YLQKPGQSP QLLIYQMSNL VSGVPDRFS GSGSGTDF LKISRVEAED VGVVYCAQN LELPYTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWK VDNALQSGN SQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTSLKADYE KHKVYACEV THQGLSSPV TKSFNRGEC	SEQ ID NO: 237 QVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCASGYAF SYSWINWVRQAPGQ GLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARNVFD GYWLVYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKVEPKS CDKHTCPCPAP LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGKGGGGG	SEQ ID NO: 63 DKHTCPCPAP ELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTPPVLDSGDS FFLVSKLTVDKSR WQQGNVFS MHEALHNHYTQK SLSLSPG	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCA SGYAFSYSWINW VRQAPGQGLEW MGRIFPGDGD YNGKFKGRVTITA DKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVY WGQGLTIVTSSA STKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVN HKPSNTKVDK EPKSCDKHTCP PCPAPPELLG VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKN QVSLSCAVDGFY

		GGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYT LPPSRKELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGQKGGG GGGGGGGGGGGGGG GGGGDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQV YTLPPSRKELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKT TPPVLKSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGQ		PSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP G
Constru- to 44 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPAS VSGSPGQSIT ISCTGTSSDV GGYNYVSWY QQHPGKAPK LMIYDVSNRP SGVSNRFSG SKSGNTASLT ISGLQAEDEA DYCYSSYTS SSTRVFGTG TKVTVLGQPK ANPTVTLFPP SSEELQANK ATLVCLISDF YPGAVTVAW KADGSPVKA GVETTKPSK QSNNKYAAS SYLSLTPEQ WKSHRSYSC QVTHEGSTV	SEQ ID NO: 238 EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF SSYIMMWVRQAPGK GLEWVSSIYPSGGIT FYADTVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARIKLT VTTVDYWGQGLVTV VSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKS CDKHTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVTV VDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTL	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTTTPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSPG	SEQ ID NO: 68 EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFSSYIMMW VRQAPGKGLEW VSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISR NSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCA RIKLTGTVTTVDY WGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSV VHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKE EPKSCDKHTHTCP PCAPELGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVTV VDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA

	EKTVPTECS	PCRDKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTP PVLSDGSSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGG GGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYT LPPSRKELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVF SCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGG GGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYT LPPSRKELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVF SCVMHEALHNHYT QKSLSLSPG		KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKN QVSLSCAVDGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LSDGSSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP G
--	-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cultura de Células

[00212] As sequências de DNA foram otimizadas para expressão em células mamíferas e clonadas no vetor de expressão de mamífero pcDNA3.4. Os construtos de plasmídeo de DNA foram transfectados através de lipossomas em 293 células de rim humano embrionário (HEK). As sequências de aminoácidos para as cadeias Fc curta e longa foram codificadas por múltiplos plasmídeos.

Purificação de Proteína

[00213] As proteínas expressadas foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura de células por cromatografia em coluna de afinidade com base em Proteína A, usando uma coluna Poros MabCapture A (LifeTechnologies). Os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno capturados foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,0) após o carregamento e posteriormente lavados com tampão de lavagem intermediário, tampão citrato 50 mM (pH 5,5) para remover impurezas adicionais relacionadas ao processo. O material do construto de Fc ligado foi eluído com glicina 100 mM, pH 3 e o eluato foi rapidamente neutralizado pela adição de TRIS 1 M pH 7,4, em seguida, centrifugado e filtrado de maneira estéril através de um filtro de 0,2 µm.

[00214] As proteínas foram adicionalmente fracionadas por cromatografia de troca iônica usando resina Poros XS (Applied Biosciences). A coluna foi pré-equilibrada com MES 50 mM, pH 6 (tampão A), as amostras foram diluídas (1:3) no tampão de equilíbrio antes do carregamento. A amostra foi eluída usando um gradiente linear 12-15CV de MES 50 mM (100% A) para cloreto de sódio 400 mM, pH 6 (100% B) como tampão de eluição. Todas as frações coletadas durante a eluição foram analisadas por cromatografia por exclusão de tamanho analítica (SEC) e as frações alvo foram agrupadas para produzir o material de construto de Fc purificado.

[00215] Após a troca iônica, a fração alvo foi trocada por meio de tampão em tampão 1X-PBS usando um cartucho de membrana polietersulfona (PES) com cut-off de 30 kDa em um sistema de filtração de fluxo tangencial. As amostras foram concentradas a aproximadamente 10-15 mg/mL e submetidas à filtração estéril através de um filtro de 0,2 µm.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio Não Redutor (SDS-PAGE)

[00216] As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (4% SDS, Bio-Rad) a 95°C por 10 minutos. As amostras correram em um gel livre de corantes Criterion TGX (4-15% poliacrilamida, Bio-Rad). As bandas de proteína foram visualizadas por iluminação UV ou coloração com azul de Coomassie. Géis foram imageados pelo Sistema de Imageamento ChemiDoc MP (Bio-Rad). A quantificação de bandas foi realizada usando software Imagelab 4.0.1 (Bio-Rad).

Exemplo 4. Ensaios Experimentais usados para caracterizar construtos do domínio de ligação Fc-antígeno

Cromatografia Líquida com Peptídeos e Glicopeptídeos-MS/MS

[00217] As proteínas (construtos de Fc) foram diluídas a 1 µg/µL em guanidina 6M (Sigma). Ditioneitol (DTT) foi adicionado a uma concentração de 10 mM, para reduzir as ligações dissulfeto sob condições de desnaturação a 65 °C por 30 min. Após resfriamento em gelo, as amostras foram incubadas com iodoacetamida (IAM) 30 mM por 1 h no escuro para alquilação (carbamidometilação) dos tióis livres. A proteína foi, então, dialisada através de uma membrana de 10-kDa em tampão de bicarbonato de amônio 25 mM (pH 7,8) para remover IAM, DTT e guanidina. A proteína foi digerida com tripsina em Barocycler (NEP 2320; Pressure Biosciences, Inc.). A pressão foi ciclada entre 20.000 psi e pressão ambiente a 37°C por um total de 30 ciclos em 1 h. A análise de LC-MS/MS dos peptídeos foi realizada em um Sistema de Cromatografia Ultimate 3000 (Dionex) e um Espectrômetro de Massa Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Os peptídeos foram separados em uma Coluna BEH PepMap (Waters) usando FA 0,1% em água e FA 0,1% em acetonitrila como as fases móveis.

Espectrometria de Massa Intacta

[00218] 50 µg da proteína (construto de Fc) foram trocados por

tampão em bicarbonato de amônio 50 mM (pH 7,8) usando filtros de rotação de 10 kDa (EMD Millipore) a uma concentração de 1 µg/µL. 30 unidades de PNGase F (Promega) foram adicionadas à amostra e incubadas a 37°C durante 5 horas. A separação foi realizada em uma coluna Waters Acquity C4 BEH (1x100 mm, tamanho de partícula de 1,7 µm, tamanho de poro 300Å) usando FA a 0,1% em água e FA a 0,1% em acetonitrila como as fases móveis. LC-MS foi realizada em um Sistema de Cromatografia Ultimate 3000 (Dionex) e um Espectrômetro de Massa Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Os espectros foram deconvoluídos usando o método ReSpect padrão do Biopharma Finder (Thermo Fisher Scientific).

Ensaio de Eletroforese Capilar com dodecil sulfato de sódio (CE-SDS)

[00219] As amostras foram diluídas a 1 mg/mL e misturadas com o tampão desnaturante HT Protein Express (PerkinElmer). A mistura foi incubada a 40°C por 20 min. As amostras foram diluídas com 70 µL de água e transferidas para uma placa de 96 poços. As amostras foram analisadas por um instrumento Caliper GXII (PerkinElmer) equipado com o HT Protein Express LabChip (PerkinElmer). A intensidade de fluorescência foi usada para calcular a abundância relativa de cada variante de tamanho.

SDS-PAGE não redutor

[00220] As amostras são desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (4% SDS, Bio-Rad) a 95°C por 10 minutos. As amostras correm em um gel livre de corantes Criterion TGX (4-15% poliacrilamida, Bio-Rad). As bandas de proteína são visualizadas por iluminação UV ou coloração com azul de Coomassie. Géis foram fotografados pelo Sistema de Produção de Imagens ChemiDoc MP (Bio-Rad). A quantificação de bandas é realizada usando software Imagelab 4.0.1 (Bio-Rad).

Citotoxicidade Dependente do Complemento (CDC)

[00221] A CDC foi avaliada por um ensaio colorimétrico no qual células Raji (ATCC) foram revestidas com Rituximabe diluído serialmente, um construto de Fc, ou IVIg. O complemento de soro humano (Quidel) foi adicionado a todos os poços a 25% v/v e incubado por 2 h a 37°C. As células foram incubadas por 12 h a 37°C após adição de reagente de proliferação celular WST-1 (Roche Applied Science). As placas foram colocadas em um agitador por 2 minutos e absorbância a 450 nm foi medida.

Exemplo 5. Ativação de Citotoxicidade Dependente do Complemento (CDC) por construtos de Fc anti-CD20

[00222] Um ensaio de CDC foi desenvolvido para testar o grau em que os construtos de Fc anti-CD20 aumentam a atividade de CDC em relação a um anticorpo monoclonal anti-CD20, obinutuzumabe. Os construtos 43 e 44 de Fc anti-CD20 tendo a sequência Fab (VL+CL, VH+H1) de obinutuzumabe foram produzidos como descrito nos Exemplos 2 e 3. Cada construto de Fc anti-CD20 e o anticorpo monoclonal obinutuzumabe foram testados em um ensaio de CDC realizado da seguinte forma:

[00223] As células Daudi cultivadas em RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS inativado por calor foram sedimentadas, lavadas 1X com PBS gelado e ressuspensas em RPMI-1640 contendo BSA a 0,1% a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células viáveis por mL. Cinquenta microlitros desta suspensão de células foram adicionados a todos os poços (exceto bordas da placa) das placas de 96 poços. As placas foram mantidas em gelo até que todas as adições fossem feitas. Os artigos de teste foram diluídos em série quatro vezes a partir de uma concentração inicial de 450 nM em RPMI-1640 + BSA. Um total de dez concentrações foi testado para cada artigo de teste. Cinquenta microlitros cada foram adicionados às células Daudi plaqueadas. Soro do complemento humano normal ou depletado em C1q (Quidel, San

Diego, CA) foi diluído 1:5 em RPMI-1640 + BSA. Cinquenta microlitros cada foram adicionados às células Daudi plaqueadas. Seis poços de controle de soro normal receberam células, apenas meio (sem tratamento) e 1/5 de soro normal (fundo normal). Três destes poços também receberam 16,5 µL de Triton X-100 (Promega, Madison, WI) (Normal Lysis Control). Os controles de lise e fundo depletados de C1q foram preparados de forma semelhante. PBS foi adicionado a todos os poços da borda da placa. As placas foram incubadas durante 2 h a 37°C. Após 2 h, 50 µL de azul Alamar pré-aquecido (Thermo, Waltham, MA) foram adicionados a todos os poços (com exceção das bordas da placa). As placas foram devolvidas à incubadora durante a noite (18 h a 37°C). Após 18 h, a fluorescência foi medida em um FlexStation 3. As placas foram lidas no topo usando filtros Ex/Em 544/590 e Cut-Off Automático. As médias foram calculadas para poços de fundo normal, controle de lise normal, fundo depletado de C1q e controle de lise depletado de C1q. A porcentagem de lise celular foi calculada como:

$\% \text{ de lise celular} = (\text{Teste RFU} - \text{Fundo RFU}) / (\text{Controle de Lise RFU} - \text{Fundo RFU}) * 100$. O EC50 (nM) foi determinado para cada construto.

[00224] Conforme representado na Tabela 10, os construtos de Fc anti-CD20 induziram CDC em células Daudi e demonstraram maior potência na potencialização da citotoxicidade em relação ao anticorpo monoclonal obinutuzumabe, conforme evidenciado por valores mais baixos de EC50.

Tabela 10. Potência de construtos de Fc anti-CD20 para induzir CDC em células Daudi

Construto ¹	n	EC50 (nM)		
		Faixa	Média	SD
Anticorpo IgG1, Fucosilado Obinutuzumabe	5	38 – 65	47	11

Construto ¹	n	EC50 (nM)		
		Faixa	Média	SD
S2L-AT-OBI Construto 43 (anti-CD20)	2	1,6 - 2,5	2,1	0,59
S3L-A22-OBI Construto 44 (anti-CD20)	2	9,8 - 12	11	1,5

¹Todos os construtos incluíam ligantes G20, a menos que indicado de outra forma.

Exemplo 6. Ativação de Fagocitose Celular Dependente de Anticorpo (ADCP) por construtos de Fc anti-CD20

Ensaio de Repórter ADCP

[00225] Um ensaio de repórter ADCP foi desenvolvido para testar o grau em que os construtos de Fc anti-CD20 ativam a sinalização de FcγRIIa, aumentando assim a atividade de ADCP, em relação a um anticorpo obinutuzumabe monoclonal anti-CD20. Os construtos 43 e 44 de Fc anti-CD20 tendo as CDRs de obinutuzumabe foram produzidos como descrito nos Exemplos 2 e 3. Cada construto de Fc anti-CD20 e anticorpos monoclonais obinutuzumabe fucosilado e não fucosilado foram testados em um ensaio repórter ADCC realizado da seguinte forma:

[00226] Células alvo Raji ($1,5 \times 10^4$ células/poço) e células efetoras Jurkat/FcγRIIa-H (Promega) ($3,5 \times 10^4$ células/poço) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de IgG baixo a 4% (Promega) e semeado em uma placa de 96 poços com construtos de Fc anti-CD20 diluídos em série. Após incubação por 6 h a 37 °C em CO₂ a 5%, a luminescência foi medida usando o Reagente de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante usando um luminômetro PHERAstar FS (BMG LABTECH).

[00227] Conforme representado na Tabela 11, os construtos de Fc

anti-CD20 induziram a sinalização de FcγRIIIa em um ensaio repórter ADCP e demonstraram maior potência na potencialização da atividade ADCP em relação ao anticorpo monoclonal obinutuzumabe fucosilado, conforme evidenciado por valores mais baixos de EC50. O construto 44 também exibiu maior potência no ensaio ADCP em relação ao anticorpo monoclonal obinutuzumabe afucosilado.

Tabela 11. Potência de construtos de Fc anti-CD20 para induzir a sinalização de FcγRIIIa em um ensaio repórter ADCP

Construto ¹	n	EC50 (nM)		
		Faixa	Média	SD
Anticorpo IgG1, Fucosilado	6	4,5 - 10,8	7,1	2,2
Anticorpo IgG1, Afucosilado	3	5,5 - 6,1	5,8	0.3
S2L-AT-OBI Construto 43 (anti-CD20)	1	7,8	7,8	N/A
S3L-A22-OBI Construto 44 (anti-CD20)	1	0,17	0,17	N/A

¹Todos os construtos incluíam ligantes G20, a menos que indicado de outra forma.

Exemplo 7. Ativação de Fagocitose Celular Dependente de Anticorpo (ADCP) por construtos de Fc anti-PD-L1

Ensaio Repórter ADCP

[00228] Um ensaio repórter ADCP foi desenvolvido para testar o grau em que os construtos de Fc anti-PD-L1 ativam a sinalização de FcγRIIIa, aumentando assim a atividade de ADCP, em relação a um anticorpo monoclonal anti-PD-L1, avelumabe (Bavencio). Os construtos 43 e 44

de Fc anti-PD-L1 tendo a sequência Fab (VL+CL, VH+CH1) de avelumabe foram produzidos conforme descrito nos Exemplos 2 e 3. Cada construto de Fc anti-PD-L1 e anticorpos monoclonais avelumabe fucosilados e afucosilados foram testados em um ensaio repórter ADCC realizado da seguinte forma:

[00229] Células alvo HEK-PD-L1 ($1,5 \times 10^4$ células/poço) e células efectoras Jurkat/Fc γ R11a-H (Promega) ($3,5 \times 10^4$ células/poço) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de IgG baixo a 4% (Promega) e semeado em uma placa de 96 poços com construtos de Fc anti-PD-L1 diluídos em série. Após incubação por 6 horas a 37 °C em CO₂ a 5%, a luminescência foi medida usando o Reagente de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante usando um luminômetro PHERAstar FS (BMG LABTECH).

[00230] Conforme representado na Tabela 12, os construtos ed Fc anti-PD-L1 induziram a sinalização de Fc γ R11a em um ensaio repórter ADCP.

Tabela 12. Potência de construtos de Fc anti-PD-L1 para induzir a sinalização de Fc γ R11a em um ensaio repórter ADCP

Número do Construto ¹	n	EC50 (nM)		
		Faixa	Média	SD
Anticorpo IgG1, Fucosilado	6	Sem efeito ²	Sem efeito ²	N/A
Anticorpo IgG1, Afucosilado	1	Sem efeito ²	Sem efeito ²	N/A
S2L-AA-AVE Construto 43 (anti-PD-L1)	1	0,037	0,037	N/A
S3L-AA-AVE Construto 44 (anti-PD-L1)	1	0,033	0,033	N/A

¹Todos os construtos incluíam ligantes G20, a menos que indicado de outra forma.²O construto não induziu sinalização Fc γ R11a mensurável nas condições do ensaio.

Exemplo 8. Ativação de Citotoxicidade Mediada por Células Dependentes de Anticorpos (ADCC) por construtos de Fc anti-CD20

Ensaio Repórter ADCC

[00231] Um ensaio repórter ADCC foi desenvolvido para testar o grau em que os construtos de Fc anti-CD20 induzem a sinalização de FcγRIIa e potencializam a atividade de ADCC em relação a um anticorpo obinutuzumabe monoclonal anti-CD20. Os construtos 43 e 44 de Fc anti-CD20 tendo a sequência Fab (VL+CL, VH+H1) de obinutuzumabe foram produzidos como descrito nos Exemplos 2 e 3. Cada construto de Fc anti-CD20 e anticorpos monoclonais obinutuzumabe fucosilado e não fucosilado foram testados em um ensaio repórter ADCC realizado da seguinte forma:

[00232] Células alvo Raji ($1,25 \times 10^4$ células/poço) e células efectoras Jurkat/Fc γ RIIa-H (Promega) ($7,45 \times 10^4$ células/poço) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de IgG baixo a 4% (Promega) e semeado em uma placa de 96 poços com construtos de Fc anti-CD20 diluídos em série. Após incubação por 6 horas a 37°C em CO₂ a 5%, a luminescência foi medida usando o Reagente de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante usando um luminômetro PHERAstar FS (BMG LABTECH).

[00233] Conforme representado na Tabela 13, os construtos de Fc anti-CD20 induziram a sinalização de FcγRIIa em um ensaio repórter ADCC.

Tabela 13. Potência de construtos de Fc anti-CD20 para induzir a sinalização de FcγRIIa em um ensaio repórter ADCC

Construto ¹	n	EC50 (nM)		
		Faixa	Média	SD
Anticorpo IgG1, Fucosilado	6	0,039-0,150	0,08	0,04
S2L-AT-OBI Construto 43 (anti-CD20)	1	0,86	0,86	N/A
S3L-AA-OBI Construto 44 (anti-CD20)	1	0,055	0,055	N/A

¹Todos os construtos incluíam ligantes G20, a menos que indicado de outra forma.

Exemplo 9. Ativação de Citotoxicidade Mediada por Células Dependentes de Anticorpos (ADCC) por construtos de Fc anti-PD-L1

Ensaio Repórter ADCC

[00234] Um ensaio repórter ADCC foi desenvolvido para testar o grau em que os construtos de Fc anti-PD-L1 ativam a sinalização de FcγRIIIa e potencializam a atividade de ADCC em relação a um anticorpo monoclonal anti-PD-L1, avelumabe (Bavencio). Os construtos 43 e 44 de Fc anti-PD-L1 tendo a sequência Fab (VL+CL, VH+CH1) de avelumabe foram produzidos conforme descrito nos Exemplos 2 e 3. Cada construto de Fc anti-PD-L1 e anticorpos monoclonais avelumabe fucosilados e afucosilados foram testados em um ensaio repórter ADCC realizado da seguinte forma:

[00235] Células alvo HEK-PD-L1 ($1,25 \times 10^4$ células/poço) e células efectoras Jurkat/FcγRIIIa-H (Promega) ($7,45 \times 10^4$ células/poço) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de IgG baixo a 4% (Promega) e semeado em uma placa de 96 poços com construtos de Fc anti-PD-L1 diluídos em série. Após incubação por 6 horas a 37°C em CO₂ a 5%, a luminescência foi medida usando o Reagente de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante usando um luminômetro PHERAstar FS (BMG LABTECH).

[00236] Conforme representado na Tabela 14, os construtos 43 de Fc induziram a sinalização de FcγRIIIa em um ensaio repórter ADCC. A indução da sinalização de FcγRIIIa não pôde ser determinada para a construção 44 de Fc e o anticorpo monoclonal afucosilado usando este ensaio.

Tabela 14. Potência de construtos de Fc anti-PD-L1 para induzir a sinalização de FcγRIIIa em um ensaio repórter ADCC

Número do Construto ¹	n	EC50 (nM)		
		Faixa	Média	SD
Anticorpo IgG1, Fucosilado	5	0,037 - 0,056	0,049	0,008
Anticorpo IgG1, Afucosilado	1	Não determinado ²	Não determinado ²	N/A
S2L-AA-AVE Construto 43 (anti-PD- L1)	1	0,028	0,028	N/A
S3L-AA-AVE Construto 44 (anti-PD- L1)	1	Não determinado ²	Não determinado ²	N/A

¹Todos os construtos incluíam ligantes G20, a menos que indicado de outra forma.

²Os dados não puderam ser ajustados de forma confiável a uma curva logística de quatro parâmetros (4PL).

Exemplo 10: Atividade de construtos de Fc anti-PD-L1 e anti-CD20

[00237] A FIG. 8A-8B mostra que os resultados de uma análise não redutora de SDS-PAGE das proteínas secretadas nos meios do crescimento por células transfectadas com os genes que codificam os polipeptídeos que se agrupam em construtos de Fc lineares. As faixas de 200 kDa vistas na FIG. 8A pistas 1 e 2 indicam agrupamento do construto diagramado na FIG. 4 (construto 43). As faixas de 250 kD vistas nas pistas 1-3 da FIG. 8B indicam agrupamento do trímero linear diagramado na FIG. 5 (construto 44).

[00238] A FIG. 9A-9B mostra os resultados de uma análise de Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) das proteínas mostradas na FIG. 8A-8B. As proteínas secretadas nos meios do crescimento por células transfectadas com os genes que codificam os polipeptídeos que se agrupam em construtos de Fc lineares foram

purificados por Proteína A e cromatografia de afinidade da troca catiônica forte. 1 mg do dímero linear purificado (construto 43) (A) ou do trímero linear (construto 44) (B) foram então separados com base no tamanho por SEC.

[00239] A FIG. 10A-10B mostra ensaios CDC e ADCP com vários construtos anti-CD20 que direcionam células Daudi (FIG. 10A) ou Raji (FIG. 10B). A FIG. 10A mostra que os construtos lineares de S2L e de S3L medeiam CDC potencializado comparado a um anticorpo monomérico. A FIG. 10B mostra que os construtos lineares de S2L e de S3L medeiam ADCP potencializado em um ensaio do repórter.

[00240] A FIG. 11A-11C mostra que os ensaios CDC, ADCC e ADCP com vários construtos anti-PD-L1 que direcionam células humanas do carcinoma pulmonar A549 ou células HEK293 transfectadas com PD-L1. A FIG. 11A mostra que os construtos lineares S2L e S3L medeiam ADCC potencializado em comparação com um anticorpo monomérico em um ensaio do repórter (Promega) usando HEK293 transfectadas com PD-L1. A FIG. 11B mostra que os construtos lineares de S2L e S3L medeiam a eliminação potencializada de células humanas do carcinoma pulmonar em um ensaio ADCC KILR. A FIG. 11C que os construtos S2L e S3L lineares são marcadamente mais eficientes em induzir ADCP de células HEK293 transfectadas com PD-L1 em um ensaio do repórter (Promega).

[00241] Os seguintes métodos foram usados nos estudos descritos no Exemplo 10.

[00242] SDS-PAGE: Os sobrenadantes do meio e os construtos de Fc purificados foram desnaturados durante 10 min a 95 °C na presença de tampão Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA). As amostras foram separadas em géis pré-moldados de acrilamida livre de corante 4%-15% TGX (Bio-Rad) usando a célula vertical de eletroforese em gel Bio-Rad Criterion seguindo as instruções do fabricante. As proteínas foram

visualizadas por detecção fluorescente rápida ou por coloração com coloração azul brilhante Coomassie R-250 (Bio-Rad). As imagens foram adquiridas com o sistema de produção de imagem ChemiDoc MP (Bio-Rad).

[00243] Cromatografia por exclusão de tamanho analítica (SEC): As amostras foram analisadas na concentração de 1 mg/mL em um sistema Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) usando uma coluna de tamanho de partícula Zenix-C 4,6 c 300 mm 3 mih (Sepax Technologies, Newark, DE) em um fluxo isocrático de 0,35 mL/min com fosfato de sódio 150 mM (pH 7,0) como o tampão de execução e coluna termostaticada a 30°C. O tempo total da corrida foi de cerca de 12-15 min com detecção de UV a 280 nm. O volume totalmente excluído foi de aproximadamente 4 min.

[00244] Ensaio CDC: As células alvo usadas no ensaio CDC anti-CD20 são as linhagens de células B humanas linfoblastoides de Daudi. As células Daudi foram removidas da cultura em suspensão por centrifugação e ressuspensas em meio X-VIVO 15 a 6×10^5 células/ml. As células Daudi foram transferidas para uma placa de ensaio de fundo plano de 96 poços em um volume de 100 µl por poço (6×10^4 células/poço). Cada um dos anticorpos monoclonais anti-CD20 (mAbs) e "SIF Bodies" foram diluídos para 3,33 mM em meio XVIVO15. Diluições em série 1:3 foram então realizadas com cada um dos mAbs anti-CD20 e "SIFBodies" em tubos de polipropileno de 1,5 ml, resultando em uma série de diluição de 11 pontos. Cada diluição dos mAbs anti-CD20 e "SIF Bodies" foi transferida a 50 µl/poço para os poços apropriados na placa de ensaio. Imediatamente após a transferência dos mAbs anti-CD20 e "SIF Bodies", 50 µL do complemento de soro humano normal foram transferidos para cada poço da placa de ensaio. A placa de ensaio foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂ durante 2 h. Após a incubação de 2 h, 20 µL de reagente de proliferação WST-1 foram

adicionados a cada poço da placa de ensaio. A placa foi devolvida à incubadora de CO₂ a 5% a 37°C durante 14 h. Após a incubação de 14 h, a placa foi agitada por 1 min em um agitador de placa e a absorbância dos poços foi imediatamente determinada a 450 nm com correção de 600 nm usando um espectrofotômetro.

[00245] Repórter de Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCP): Células efectoras Jurkat/Fc γ RIIa-H (Promega) (3,5 x 10⁴ células/poço) e células Raji (para CD20) ou HEK-PD-L1 (Crown-Bio transfectada para PD-L1) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de IgG baixo a 4% (Promega) e semeado em uma placa de 96 poços com construtos anti-CD20 ou PD-L1 diluídos em série. Após incubação por 6 h a 37°C em CO₂ a 5%, a luminescência foi medida usando o Reagente de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante usando um luminômetro PHERAstar FS (BMG LABTECH).

[00246] Repórter de Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC): Células efectoras Jurkat/Fc γ RIIIa-H (Promega) (7,45 x 10⁴ células/poço) e células Raji (para CD20) ou HEK-PD-L1 (Crown-Bio transfectada para PD-L1) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de IgG baixo a 4% (Promega) e semeado em uma placa de 96 poços com construtos anti-CD20 ou anti-PD-L1 diluídos em série. Após incubação por 6 h a 37°C em CO₂ a 5%, a luminescência foi medida usando o Reagente de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante usando um luminômetro PHERAstar FS (BMG LABTECH).

[00247] Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (KILR ADCC): As células A549 (ATCC) foram obtidas e cultivadas em meio F-12K (Gibco), FBS a 10% (Hyclone) e 2mM glutamax (Gibco). Vinte e quatro horas antes do experimento, 150,000 células/mL de células A549 foram cultivadas em meios de crescimento, com 50ng/mL de IFN- γ

adicionados para estimular a expressão PD-L1. As células hemacare NK foram usadas como células efetoras neste ensaio e foram descansadas durante a noite em um frasco tratado de cultura não-tecidual (Falcon). As células A549 foram então colhidas com 3ml de Accutase (Corning) por 5 min. As células foram ressuspensas em $0,2 \times 10^6$ células/mL. Cinquenta μL de células A549 foram adicionados a cada poço de uma cultura de tecido de 96 poços tratada placa de fundo plano branca (Costar). Sem qualquer tempo de incubação, 10 μL de construtos foram adicionados a cada poço. Imediatamente depois, 50 μL de células NK a 1×10^6 células/mL foram adicionadas a cada poço da placa. A placa foi incubada a 37°C por 5 horas. Em seguida, 50 μL de reagente Cytotox glo (Promega) foi adicionado seguido de incubação em 37°C por 15 minutos. A luminescência foi lida usando um PHERAstar FS (BMG Labtech).

Outras Modalidades

[00248] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados nesse relatório descritivo estão incorporados ao presente documento por referência na mesma medida, como se cada publicação ou pedido de patente independente fossem especificamente e individualmente indicados como sendo incorporados por referência.

[00249] Embora a divulgação tenha sido descrita em relação às suas modalidades específicas, entende-se que ela seja capaz de modificações adicionais e que o presente pedido pretenda abranger quaisquer variações, usos ou adaptações da divulgação, seguindo, de modo geral, os princípios da divulgação e incluindo desvios da divulgação decorrentes de práticas conhecidas e comuns na técnica à qual a divulgação pertence e possam ser aplicados às características essenciais previamente estabelecidas no presente documento, e segue o escopo das reivindicações.

[00250] Outras modalidades estão incluídas nas reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, **caracterizado** pelo fato de que compreende um domínio de ligação ao antígeno; um ligante; um primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3; um segundo ligante; um segundo monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3; um terceiro ligante opcional; e um terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 opcional compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3,

em que pelo menos um monômero do domínio Fc compreende mutações que formam uma protuberância manipulada,

e em que pelo menos um outro monômero do domínio Fc compreende pelo menos uma, duas ou três mutações de carga inversa.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo e, opcionalmente, um domínio CH1.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia leve do anticorpo.

4. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreende mutações que formam uma protuberância manipulada e o segundo monômero do domínio Fc de IgG1 compreende pelo menos duas mutações de carga inversa.

5. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende um terceiro ligante e um terceiro monômero do domínio Fc de IgG1, em que o primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreende mutações que formam

uma protuberância manipulada.

6. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende um terceiro ligante e um terceiro monômero do domínio Fc de IgG1, em que o primeiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreende mutações que formam uma protuberância manipulada e tanto o segundo monômero do domínio Fc de IgG1 quanto o terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 compreendem, cada um, pelo menos duas mutações de carga inversa.

7. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que os monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo que compreendem mutações de carga inversa possuem, cada um, mutações de carga inversa idênticas.

8. Polipeptídeos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizados** pelo fato de que os monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo compreendendo mutações que formam uma protuberância manipulada compreendem adicionalmente pelo menos uma mutação de carga inversa.

9. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que os monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo compreendendo mutações que formam uma protuberância manipulada e pelo menos uma mutação de carga inversa compreendem uma mutação de carga inversa que é diferente da(s) mutação(ões) de carga inversa dos monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo que compreende mutações de carga inversa, mas nenhuma mutação de formação de protuberância.

10. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que as mutações que formam uma protuberância manipulada e as mutações de carga inversa estão no domínio CH3.

11. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 10,

17. Polipeptídeo, de acordo com as reivindicações 1 a 16, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos monômeros do domínio Fc compreende uma mutação de único aminoácido na posição I253 de EU.

18. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que cada mutação de aminoácido na posição I253 de EU é independentemente selecionada a partir do grupo consistindo em I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W e I253Y.

19. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que cada mutação de aminoácido na posição I253 é I253A.

20. Polipeptídeo, de acordo com as reivindicações 1 a 19, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos monômeros do domínio Fc compreende uma mutação de único aminoácido na posição R292 de EU.

21. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que cada mutação de aminoácido na posição R292 de EU é independentemente selecionada a partir do grupo consistindo em R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T e R292Y.

22. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que cada mutação de aminoácido na posição R292 é R292P.

23. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado** pelo fato de que a dobradiça de cada monômero do domínio Fc compreende ou consiste independentemente em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em EPKSCDKTHTCPPPELL e

DKTHTCPPCPAPELL.

24. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a porção de dobradiça do segundo monômero do domínio Fc e do terceiro monômero do domínio Fc possuem a sequência de aminoácidos DKTHTCPPCPAPELL.

25. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a porção de dobradiça do monômero do primeiro domínio Fc possui a sequência de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPEL.

26. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a porção de dobradiça do primeiro monômero do domínio Fc possui a sequência de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPEL e a porção de dobradiça do segundo monômero do domínio Fc, a sequência de aminoácidos DKTHTCPPCPAPELL.

27. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a porção de dobradiça do primeiro monômero do domínio Fc possui a sequência de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPEL e a porção de dobradiça do segundo monômero do domínio Fc e do terceiro monômero do domínio Fc possuem a sequência de aminoácidos DKTHTCPPCPAPELL.

28. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos: GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK com no máximo duas deleções ou substituições de único aminoácido.

29. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc são idênticos e compreendem a sequência de aminoácidos: GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK com no máximo duas deleções ou substituições de único aminoácido.

30. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc são idênticos e compreendem a sequência de aminoácidos: GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK com no máximo duas substituições de único aminoácido.

31. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH2 de cada monômero do domínio Fc são idênticos e compreendem a sequência de aminoácidos: GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK.

32. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH3 de cada monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos: GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG com no máximo 10 substituições de único aminoácido.

33. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH3 de cada monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos: GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 8 substituições de único aminoácido.

34. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH3 de cada monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos: GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 6 substituições de único aminoácido.

35. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que os domínios CH3 de cada monômero do domínio Fc compreendem independentemente a sequência de aminoácidos: GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG com no máximo 5 substituições de único aminoácido.

36. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 35, **caracterizado** pelo fato de que as substituições de único aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em: S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

37. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que cada um dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47 com até 10 substituições de único aminoácido.

38. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que até 6 das substituições de único aminoácido são mutações de carga inversa no domínio CH3 ou são mutações que formam uma protuberância manipulada.

39. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que as substituições de único aminoácido estão dentro da sequência desde a posição G341 de EU até a posição K447 de EU, inclusive.

40. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das mutações que formam uma protuberância manipulada é selecionada a partir do grupo que consiste em S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T e T394F.

41. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada dentre: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

42. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um scFv.

43. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1.

44. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno

compreende adicionalmente um domínio VL.

45. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas na Tabela 1A e 1B.

46. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio VH compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2.

47. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2 e a sequência de VH, excluindo-se a sequência de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% ou 98% idêntica à sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2.

48. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2.

49. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 indicadas na Tabela 1A e 1B.

50. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de um conjunto de uma sequência de VH e uma VL de um anticorpo indicado na Tabela 2.

51. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e

CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2 e um domínio VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de uma sequência de VL de um anticorpo indicado na Tabela 2, em que as sequências de domínio VH e VL, excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 são pelo menos 95% ou 98% idênticas às sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2.

52. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2.

53. Polipeptídeo, de acordo com as reivindicações 1 a 41, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio constante de anticorpo CL de IgG e um domínio constante de anticorpo CH1 de IgG.

54. Polipeptídeo, de acordo com as reivindicações 1 a 41, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1 e pode se ligar a um polipeptídeo compreendendo um domínio VL e um domínio CL para formar um Fab.

55. Complexo polipeptídico, **caracterizado** pelo fato de que compreende um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 54, unido a um segundo polipeptídeo compreendendo um monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3, em que o polipeptídeo e o segundo polipeptídeo são unidos por ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína dentro do domínio dobradiça do primeiro, segundo ou terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo e do domínio dobradiça do segundo polipeptídeo.

56. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação

55, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende mutações que formam uma cavidade manipulada.

57. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que as mutações que formam a cavidade manipulada são selecionadas a partir do grupo que consiste em: Y407T, Y407A, F405A, T394S, T394W/Y407A, T366W/T394S, T366S/L368A/Y407V/Y349C, S364H/F405A.

58. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que as mutações que formam a cavidade manipulada são T366S/L368A/Y407V/Y349C73.

59. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende adicionalmente pelo menos uma mutação de carga inversa.

60. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada dentre: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

61. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 60, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma mutação de carga inversa é K370D.

62. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 61, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende as mutações T366S, L368A, Y407V, Y349C e K370D.

63. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 62, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende adicionalmente um domínio de ligação ao antígeno.

64. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação

63, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia pesada do anticorpo.

65. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve do anticorpo.

66. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um scFv.

67. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH e um domínio CH1.

68. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende adicionalmente um domínio VL.

69. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas nas Tabelas 1A e 1B.

70. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende um CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio VH compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2.

71. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2 e a sequência de VH, excluindo-se a sequência de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% ou 98% idêntica à sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2.

72. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio VH compreende uma

sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2.

73. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 indicadas nas Tabelas 1A e 1B.

74. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de um conjunto de uma sequência de VH e de VL de um anticorpo indicado na Tabela 2.

75. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de VH de um anticorpo indicado na Tabela 2 e um domínio VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 de uma sequência de VL de um anticorpo indicado na Tabela 2, em que as sequências de domínio VH e VL, excluindo-se as sequências de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 são pelo menos 95% ou 98% idênticas às sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2.

76. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um conjunto de sequências de VH e VL de um anticorpo indicado na Tabela 2.

77. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio constante de anticorpo CL de IgG e um domínio constante de anticorpo CH1 de IgG.

78. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno

compreende um domínio VH e um domínio CH1 e pode se ligar a um polipeptídeo compreendendo um domínio VL e um domínio CL para formar um Fab.

79. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 78, **caracterizado** pelo fato de que o complexo polipeptídico é unido adicionalmente a um terceiro polipeptídeo compreendendo um monômero do domínio Fc de IgG1 compreendendo um domínio dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3, em que o polipeptídeo e o terceiro polipeptídeo são unidos por ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína dentro do domínio dobradiça do primeiro, segundo ou terceiro monômero do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo e o domínio dobradiça do terceiro polipeptídeo, em que o segundo e o terceiro polipeptídeos unem-se a diferentes monômeros do domínio Fc de IgG1 do polipeptídeo.

80. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 79, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro monômero polipeptídico compreende pelo menos duas mutações de carga inversa.

81. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 80, **caracterizado** pelo fato de que as pelo menos duas mutações de carga inversa são selecionadas dentre: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

82. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 79, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende pelo menos uma mutação de carga inversa selecionada a partir do grupo que consiste em K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K e o terceiro monômero polipeptídico compreende pelo menos duas mutações de carga inversa selecionadas a partir do grupo que consiste em K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K, em que o segundo e o terceiro monômeros polipeptídicos compreendem

diferentes mutações de carga inversa.

83. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 82, **caracterizado** pelo fato de que o segundo polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47 com até 10 substituições de único aminoácido.

84. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 83, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47 com até 10 substituições de único aminoácido.

85. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 84, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo compreende dois monômeros de Fc, em que um monômero de Fc compreendendo mutações S354C e T366W e um monômero de Fc compreendendo mutações D356K e D399K.

86. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 85, **caracterizado** pelo fato de que o monômero de Fc compreendendo as mutações S354C e T366W compreende adicionalmente uma mutação E357K.

87. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 84, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo compreende três monômeros de Fc, em que um monômero de Fc compreendendo mutações S354C e T366W e dois monômeros de Fc compreendendo, cada um, as mutações D356K e D399K.

88. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 87, **caracterizado** pelo fato de que o monômero de Fc compreendendo as mutações S354C e T366W compreende adicionalmente uma mutação E357K.

89. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma

das reivindicações 79 a 88, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende as mutações Y349C, T366S, L368A e Y407V.

90. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 89, **caracterizado** pelo fato de que o segundo polipeptídeo compreende adicionalmente uma mutação K370D.

91. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 88, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro monômero polipeptídico compreende as mutações K392D e K409D.

92. Complexo polipeptídico, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o segundo monômero polipeptídico compreende as mutações Y349C, T366S, L368A, Y407V e K370D e o terceiro monômero polipeptídico compreende as mutações K392D e K409D.

93. Complexo polipeptídico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5- a 92, **caracterizado** pelo fato de que compreende a função efetora potencializada em um ensaio de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), uma fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) e/ou ensaio de citotoxicidade dependente do complemento (CDC) em relação a um complexo polipeptídico com um único domínio Fc e pelo menos um domínio de ligação ao antígeno.

94. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- a) um primeiro polipeptídeo compreendendo
 - i) um primeiro monômero do domínio Fc,
 - ii) um segundo monômero do domínio Fc; e
 - iii) um ligante que une o primeiro monômero do domínio Fc ao segundo monômero do domínio Fc;
- b) um segundo polipeptídeo compreendendo um terceiro monômero do domínio Fc;

monômero do domínio Fc compreende adicionalmente pelo menos uma mutação de carga inversa.

98. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, **caracterizado** pelo fato de que as mutações são alterações de único aminoácido.

99. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, **caracterizado** pelo fato de que cada um dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47 com até 10 substituições de único aminoácido.

100. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 99, **caracterizado** pelo fato de que até 6 das substituições de único aminoácido são mutações de carga inversa no domínio CH3 ou são mutações que formam uma protuberância manipulada.

101. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 100, **caracterizado** pelo fato de que as substituições de único aminoácido estão dentro da sequência desde a posição G341 de EU até a posição K447 de EU, inclusive.

102. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das mutações que formam uma protuberância manipulada é selecionada a partir do grupo que consiste em S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T e T394F.

103. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada dentre: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

104. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo

com qualquer uma das reivindicações 96 a 103, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro monômero do domínio Fc compreende as mutações S354C, T366W e E357K e o segundo monômero do domínio Fc compreende as mutações D356K e D399K.

105. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 104, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro monômero do domínio Fc compreende as mutações Y349C, T366S, L368A, Y407V e K370D.

106. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 105, **caracterizado** pelo fato de que o quarto monômero do domínio Fc compreende as mutações K392D e K409D.

107. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 94 a 106, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um Fab.

108. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 94 a 106, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um scFv.

109. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 94 a 106, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio V_H e um domínio C_H1.

110. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 109, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende adicionalmente um domínio V_L.

111. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 110, **caracterizado** pelo fato de que o construto de domínio de ligação Fc-antígeno compreende um quarto polipeptídeo compreendendo um domínio V_L.

112. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo

com a reivindicação 109, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas nas Tabelas 1A e 1B.

113. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 109, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio V_H compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2.

114. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 109, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2, e a sequência de V_H, excluindo-se a sequência de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% idêntica à sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2.

115. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 109, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2.

116. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- a) um primeiro polipeptídeo compreendendo
 - i) um primeiro monômero do domínio Fc,
 - ii) um segundo monômero do domínio Fc,
 - iii) um terceiro monômero do domínio Fc,
 - iv) um ligante que une o primeiro monômero do domínio Fc ao segundo monômero do domínio Fc; e
 - v) um ligante que une o segundo monômero do domínio Fc ao terceiro monômero do domínio Fc;
- b) um segundo polipeptídeo compreendendo um quarto monômero do domínio Fc;
- c) um terceiro polipeptídeo compreendendo um quinto

monômero do domínio Fc; e

d) um domínio de ligação ao antígeno unido ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo;

em que o primeiro monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc;

em que o segundo monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc; e

em que o terceiro monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc.

117. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 116, **caracterizado** pelo fato de que o ligante compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGS GGS, GGS GGS GGS, GGS GGS GGS GGS, GGSG, GGSG, GGS GGS GGS, GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS, GGS GGS GGS GGS GGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGS GGS GGS GGS GGS GGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG e GGGGGGGGGGGGGGGGGGG.

118. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 116, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro monômero do domínio Fc compreende mutações que formam uma

protuberância manipulada e o segundo e o terceiro monômeros do domínio Fc, cada um, compreendem pelo menos duas mutações de carga inversa.

119. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 118, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro monômero do domínio Fc compreende adicionalmente pelo menos uma mutação de carga inversa.

120. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com as reivindicações 118 e 119, **caracterizado** pelo fato de que as mutações são alterações de único aminoácido.

121. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com as reivindicações 118 e 119, **caracterizado** pelo fato de que cada um dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47 com até 10 substituições de único aminoácido.

122. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 121, **caracterizado** pelo fato de que até 6 das substituições de único aminoácido são mutações de carga inversa no domínio CH3 ou são mutações que formam uma protuberância manipulada.

123. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 122, **caracterizado** pelo fato de que as substituições de único aminoácido estão dentro da sequência desde a posição G341 de EU até a posição K447 de EU, inclusive.

124. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com as reivindicações 118 e 119, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das mutações que formam uma protuberância manipulada é selecionada a partir do grupo que consiste em S354C, T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T e T394F.

125. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo

com as reivindicações 118 e 119, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma mutação de carga inversa é selecionada dentre: K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R e D356K.

126. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 118 a 125, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro monômero do domínio Fc compreende as mutações S354C, T366W e E357K e o segundo e o terceiro monômeros do domínio Fc compreendem, cada um, as mutações D356K e D399K.

127. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 118 a 126, **caracterizado** pelo fato de que o quarto monômero do domínio Fc compreende as mutações Y349C, T366S, L368A, Y407V e K370D.

128. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 118 a 127, **caracterizado** pelo fato de que o quinto monômero do domínio Fc compreende as mutações K392D e K409D.

129. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 128, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um Fab.

130. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 128, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um scFv.

131. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 128, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio V_H e um domínio C_H1 .

132. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 131, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno compreende adicionalmente um domínio V_L .

133. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 131, **caracterizado** pelo fato de que o construto de domínio de ligação Fc-antígeno compreende um quarto polipeptídeo compreendendo um domínio V_L.

134. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 131, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende um conjunto de sequências de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 indicadas nas Tabelas 1A e 1B.

135. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 131, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de um domínio V_H compreendendo uma sequência de um anticorpo indicado na Tabela 2.

136. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 131, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 de uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2, e a sequência de V_H, excluindo-se a sequência de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, é pelo menos 95% idêntica à sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2.

137. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 131, **caracterizado** pelo fato de que o domínio V_H compreende uma sequência de V_H de um anticorpo indicado na Tabela 2.

138. Método de fabricação de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) cultivar uma célula hospedeira que expresse:

(1) um primeiro polipeptídeo compreendendo

i) um primeiro monômero do domínio Fc,

ii) um segundo monômero do domínio Fc; e

iii) um ligante que une o primeiro monômero do domínio

Fc ao segundo monômero do domínio Fc;

(2) um segundo polipeptídeo compreendendo um terceiro monômero do domínio Fc;

(3) um terceiro polipeptídeo compreendendo um quarto monômero do domínio Fc; e

(4) um domínio de ligação ao antígeno;

em que o primeiro monômero do domínio Fc e o terceiro monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc e o segundo monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc;

em que o domínio de ligação ao antígeno é unido ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo, formando, assim, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno; e

b) purificar o construto de domínio de ligação Fc-antígeno a partir do sobrenadante da cultura celular.

139. Método, de acordo com a reivindicação 138, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos 50% dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno no sobrenadante da cultura de células, em uma base molar, são estruturalmente idênticos.

140. Método de fabricação de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) cultivar uma célula hospedeira que expresse:

(1) um primeiro polipeptídeo compreendendo

i) um primeiro monômero do domínio Fc,

ii) um segundo monômero do domínio Fc,

iii) um terceiro monômero do domínio Fc,

iv) um ligante que une o primeiro monômero do domínio Fc ao segundo monômero do domínio Fc;

v) um ligante que une o segundo monômero do domínio Fc e o terceiro monômero do domínio Fc;

(2) um segundo polipeptídeo compreendendo um quarto

monômero do domínio Fc;

(3) um terceiro polipeptídeo compreendendo um quinto monômero do domínio Fc; e

(4) um domínio de ligação ao antígeno;

em que o primeiro monômero do domínio Fc e o quarto monômero do domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero do domínio Fc e o quinto monômero do domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc;

em que o domínio de ligação ao antígeno é unido ao primeiro polipeptídeo e ao segundo polipeptídeo, formando, assim, um construto de domínio de ligação Fc-antígeno; e

b) purificar o construto de domínio de ligação Fc-antígeno a partir do sobrenadante da cultura celular.

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos 50% dos construtos do domínio de ligação Fc-antígeno no sobrenadante da cultura de células, em uma base molar, são estruturalmente idênticos.

142. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) um primeiro polipeptídeo compreendendo:

i) um primeiro monômero do domínio Fc,

ii) um segundo monômero do domínio Fc

iii) um primeiro domínio de ligação de cadeia pesada, e

iv) um ligante que une o primeiro e o segundo monômeros

do domínio Fc;

b) um segundo polipeptídeo compreendendo:

i) um terceiro monômero do domínio Fc,

ii) um segundo domínio de ligação de cadeia pesada e

iii) um ligante que une o terceiro e o quarto monômeros do domínio Fc;

c) um terceiro polipeptídeo compreendendo um primeiro domínio de ligação de cadeia leve;

d) um quarto polipeptídeo compreendendo um segundo domínio de ligação de cadeia leve;

e) um quinto polipeptídeo compreendendo um quarto monômero do domínio Fc; e

em que o primeiro e o quarto monômeros do domínio Fc formam juntos um primeiro domínio Fc, o segundo e o terceiro monômeros do domínio Fc formam juntos um segundo domínio Fc, o primeiro domínio de ligação de cadeia pesada e o primeiro domínio de ligação de cadeia leve formam juntos um primeiro Fab; e o segundo domínio de ligação de cadeia pesada e o segundo domínio de ligação de cadeia leve formam juntos um segundo Fab.

143. Construto de domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que o domínio CH3 de cada um dos monômeros do domínio Fc inclui até 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de único aminoácido.

144. Construto de domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que o domínio CH3 de cada um dos monômeros do domínio Fc inclui até 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de único aminoácido em comparação com a sequência de aminoácidos da IgG1 humana.

145. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que cada um dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43, 45 e 47 com até 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de único aminoácido.

146. Monômero do domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que as substituições de único aminoácido estão apenas no domínio CH3.

147. Construto de domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que as substituições que promovem a homodimerização são selecionadas dentre as substituições nas Tabelas 4A e 4B.

148. Construto de Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que cada domínio de ligação da cadeia leve compreende um domínio VL e um domínio CL e cada domínio de ligação da cadeia pesada compreende um domínio VH e um domínio CH1.

149. Construto de antígeno, de acordo com a reivindicação 142, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro e o segundo domínios de ligação da cadeia leve são idênticos em sequência e o primeiro e o segundo domínios de ligação da cadeia pesada são idênticos em sequência.

150. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) um primeiro polipeptídeo compreendendo:

i) um primeiro monômero do domínio Fc,

ii) um segundo monômero do domínio Fc,

iii) um terceiro monômero do domínio Fc,

iv) um primeiro domínio de ligação de cadeia pesada, e

i) um ligante que une o primeiro e o segundo monômeros do domínio Fc;

vi) um ligante que une o segundo e o terceiro monômeros do domínio Fc;

b) um segundo polipeptídeo compreendendo:

i) um sexto monômero do domínio Fc,

- ii) um segundo domínio de ligação de cadeia pesada;
- c) um terceiro polipeptídeo compreendendo um quarto monômero do domínio Fc;
- d) um quarto polipeptídeo compreendendo um quinto monômero do domínio Fc;
- e) um quinto polipeptídeo compreendendo um primeiro domínio de ligação de cadeia leve; e
- f) um sexto polipeptídeo compreendendo um segundo domínio de ligação de cadeia leve

em que o primeiro e o quarto monômeros do domínio Fc juntos formam um primeiro domínio Fc, o segundo e o quinto monômeros do domínio Fc juntos formam um segundo domínio Fc, o terceiro e o sexto monômeros de domínio Fc juntos formam um terceiro domínio Fc, o primeiro domínio de ligação de cadeia pesada e o primeiro domínio de ligação de cadeia leve formam juntos um primeiro Fab; e o segundo domínio de ligação de cadeia pesada e o segundo domínio de ligação de cadeia leve formam juntos um segundo Fab.

151. Construto de domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que o domínio CH3 de cada um dos monômeros do domínio Fc inclui até 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de único aminoácido.

152. Construto de domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que o domínio CH3 de cada um dos monômeros do domínio Fc inclui até 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de único aminoácido em comparação com a sequência de aminoácidos da IgG1 humana.

153. Construto de domínio de ligação Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que cada um dos monômeros do domínio Fc compreende, independentemente, a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 42, 43,

45 e 47 com até 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de único aminoácido.

154. Monômero do domínio Fc-antígeno, como definido na reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que as substituições de único aminoácido estão apenas no domínio CH3.

155. Construto de domínio Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que as substituições que promovem a homodimerização são selecionadas dentre as substituições nas Tabelas 4A e 4B.

156. Construto de Fc-antígeno, de acordo com a reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que cada domínio de ligação da cadeia leve compreende um domínio VL e um domínio CL e cada domínio de ligação da cadeia pesada compreende um domínio VH e um domínio CH1.

157. Construto de antígeno, de acordo com a reivindicação 150, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro e o segundo domínios de ligação da cadeia leve são idênticos em sequência e o primeiro e o segundo domínios de ligação da cadeia pesada são idênticos em sequência.

158. Uso de um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 59 e 82, e/ou de um complexo polipeptídico, como definido em qualquer uma das reivindicações 55 a 81 e 83 a 93, e/ou de um construto de domínio de ligação Fc-antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 94 a 137 e 142 a 157, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica, produto, cavina ou medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças imunológicas e inflamatórias e/ou cânceres e doenças autoimunes.

159. Invenção, caracterizada pelo fato de que está sob qualquer forma das suas concretizações ou em qualquer categoria de

reivindicação que se possa reivindicar, por exemplo, produto, ou processo, ou uso abrangido pelo objeto inicialmente descrito, revelado, ou ilustrado no pedido de patente,

Composição farmacêutica compreendendo um ou mais construtos do domínio de ligação Fc-antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 94 a 137 e 142 a 157, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

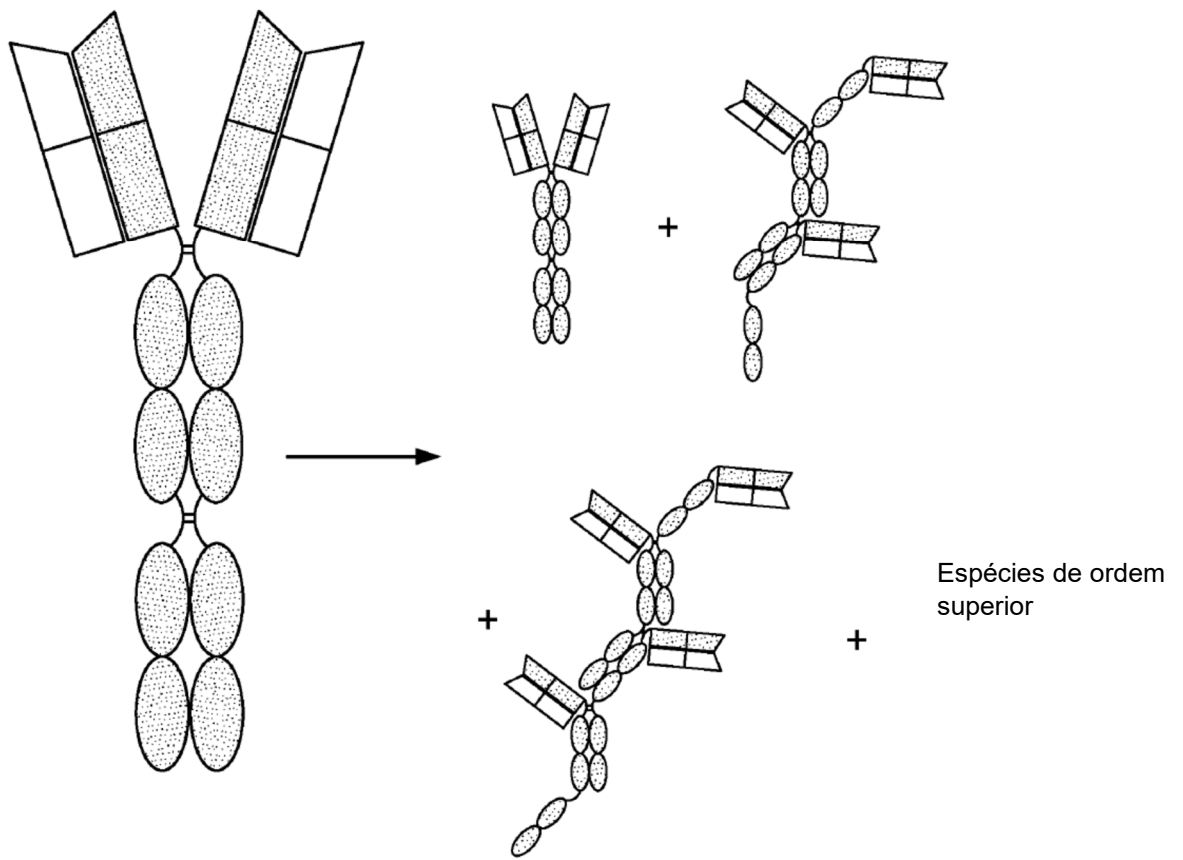


FIG. 1

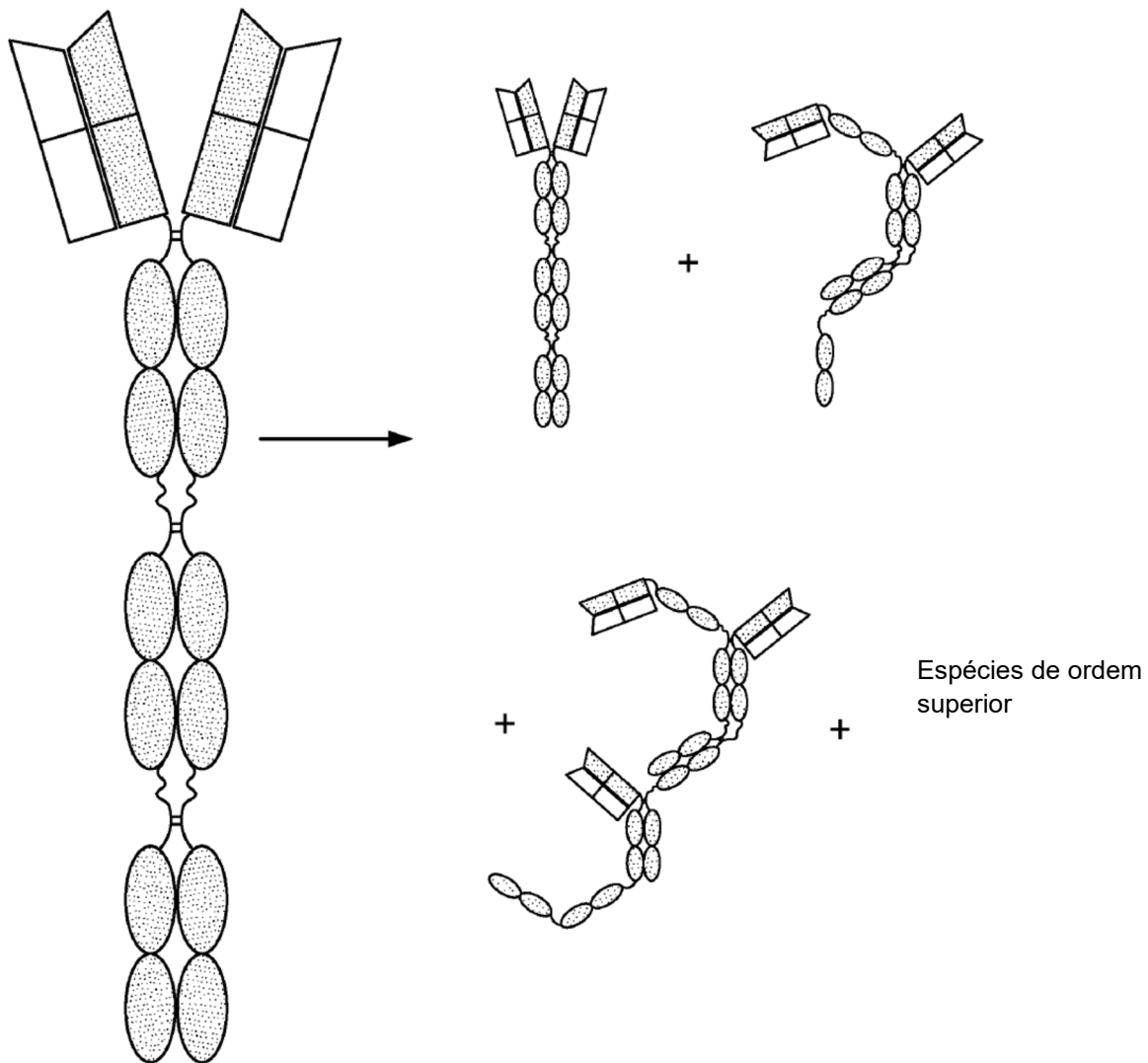


FIG. 2

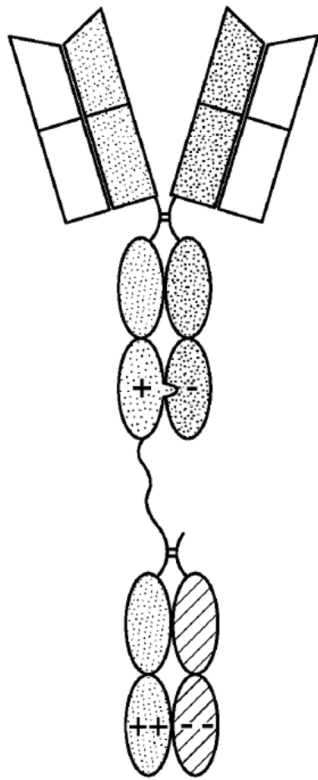


FIG. 3A

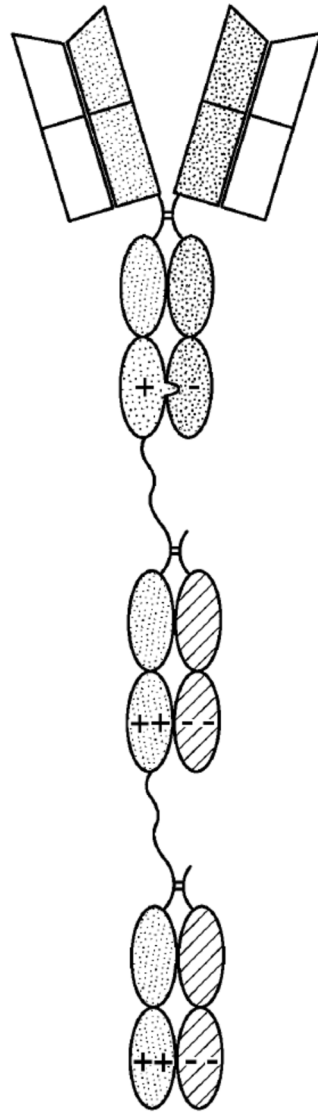
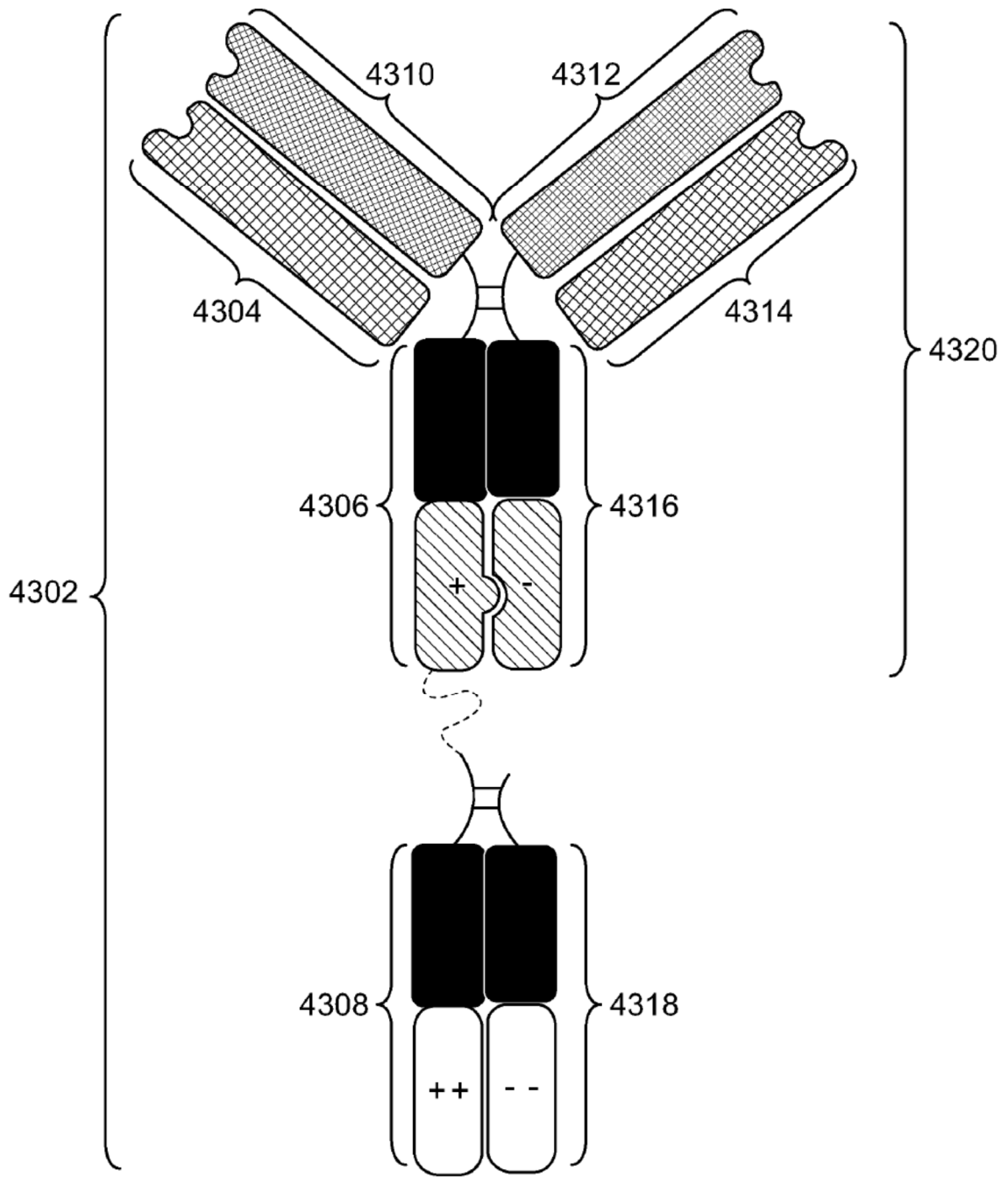
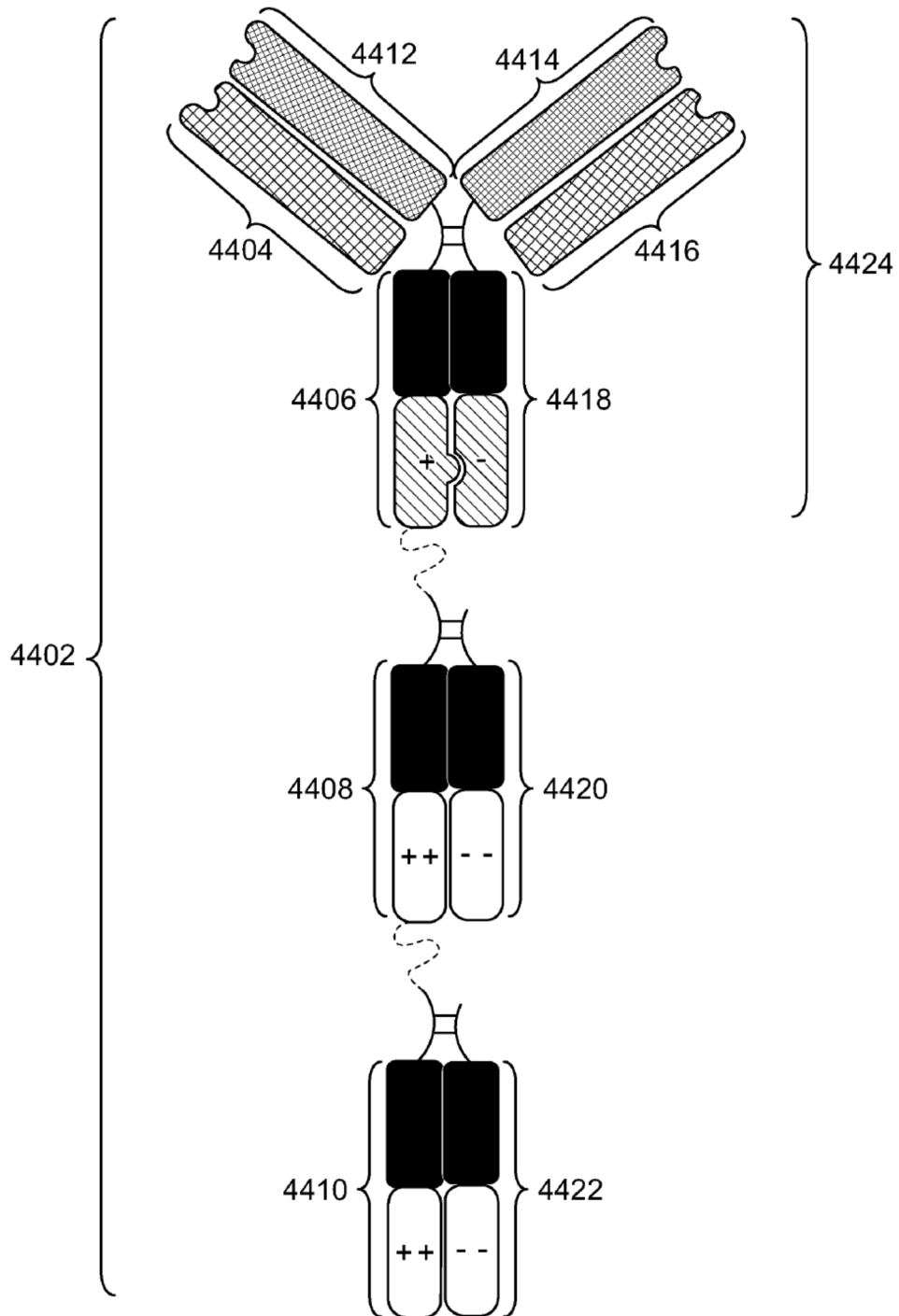


FIG. 3B



Construto 43

FIG. 4



Construto 44

FIG. 5

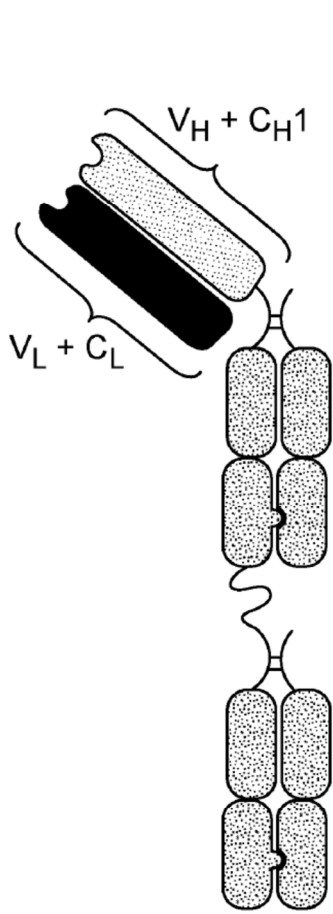


FIG. 6A

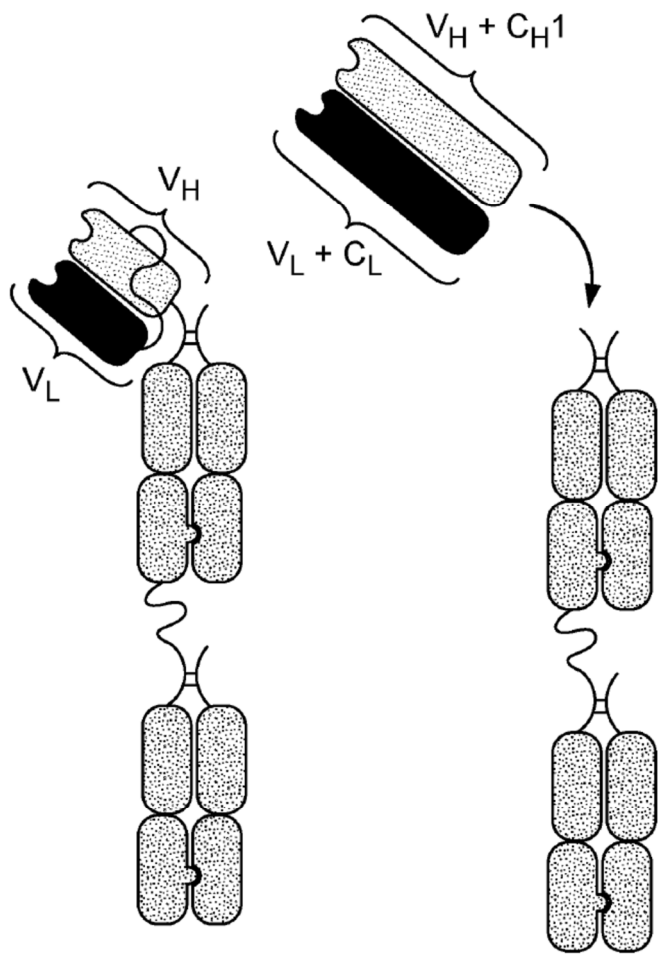


FIG. 6B

FIG. 6C

216	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u>	280	(A)
281	<u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u>	344	(SEQ ID NO:43)
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK</u>	409	
410	<u>LTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>		447
221	<u>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u>	280	(B)
281	<u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u>	344	(SEQ ID NO:45)
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK</u>	409	
410	<u>LTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>		446
216	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u>	280	(C)
281	<u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u>	344	(SEQ ID NO:47)
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK</u>	409	
410	<u>LTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>		446
221	<u>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u>	280	(D)
281	<u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u>	344	(SEQ ID NO:42)
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK</u>	409	
410	<u>LTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>		447

FIG. 7

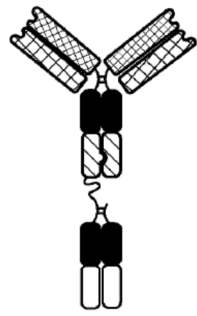
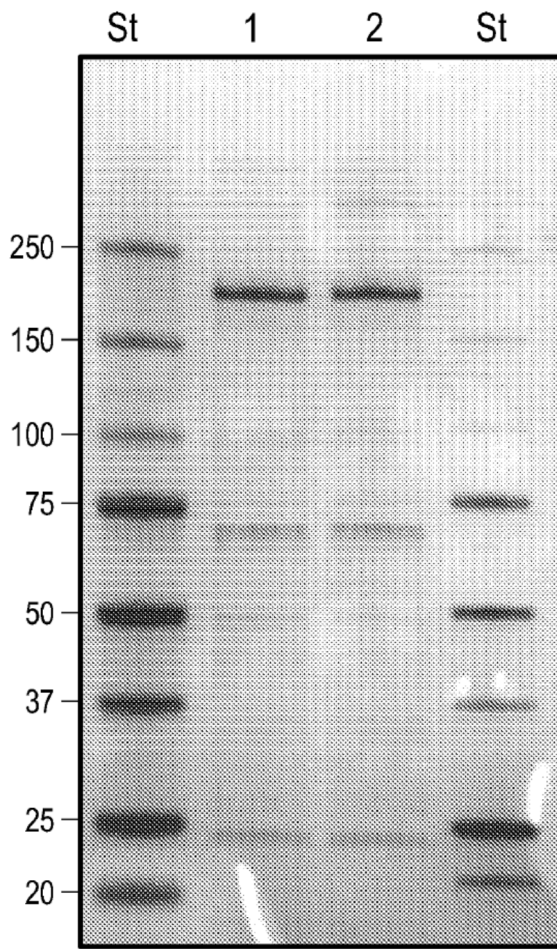


FIG. 8A

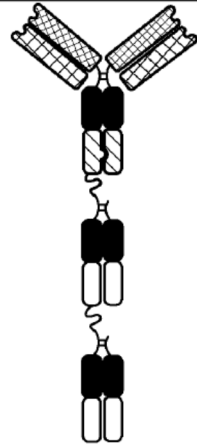
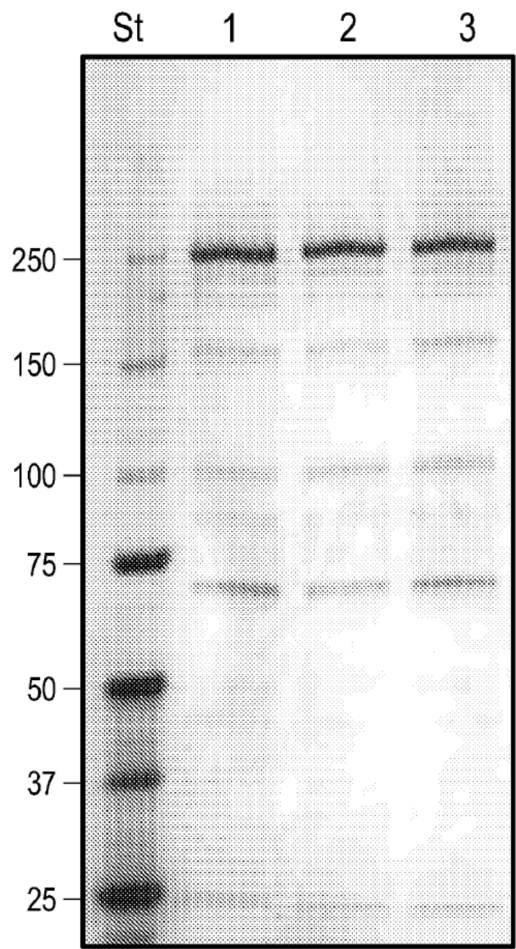


FIG. 8B

DAD1 A, Sig=280, 16 Ref=360, 100 (K:\BIOLOGI...\CHEMSTATION\RAM-000495\Y2017\DATA\20170517_1_MH\043-0201.D)

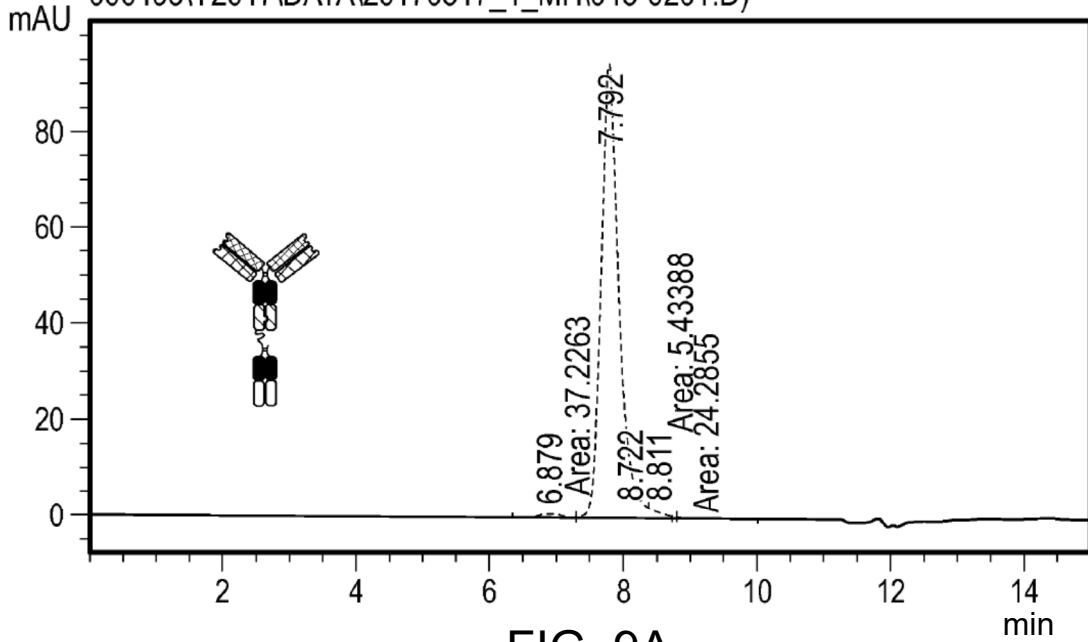


FIG. 9A

DAD1 A, Sig=280, 16 Ref=360, 100 (K:\BIOLOGI...TA\20180702_MH_1\20180628_RZ 2018-07-02 15-04-43\012-0601.D)

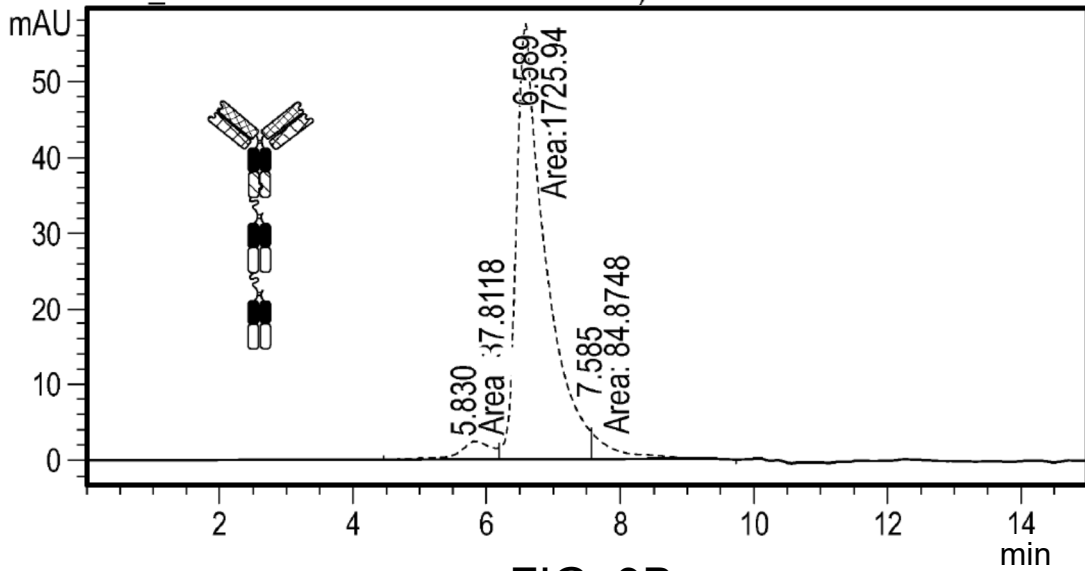
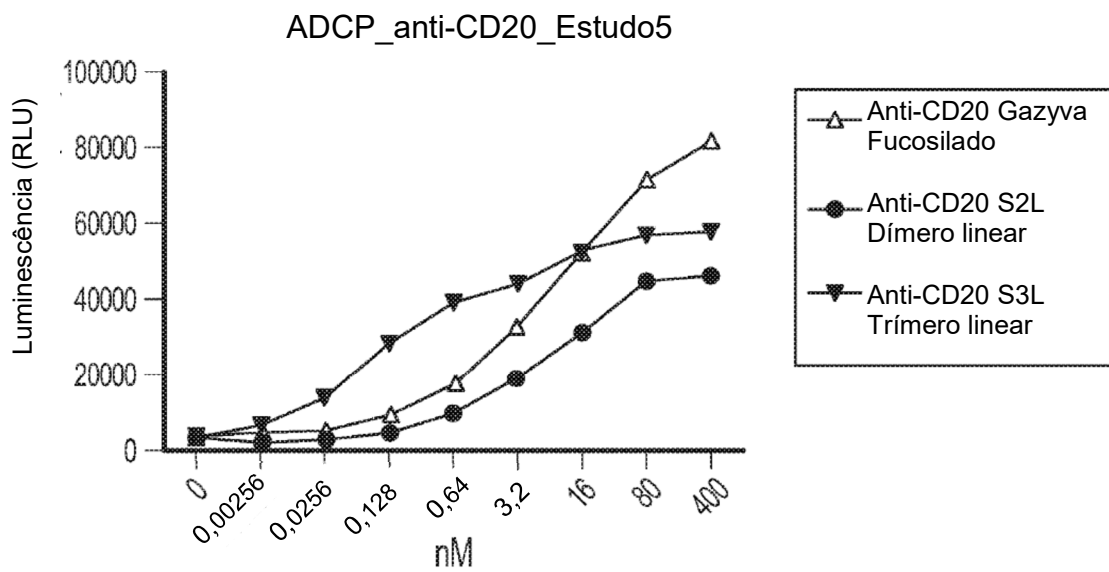
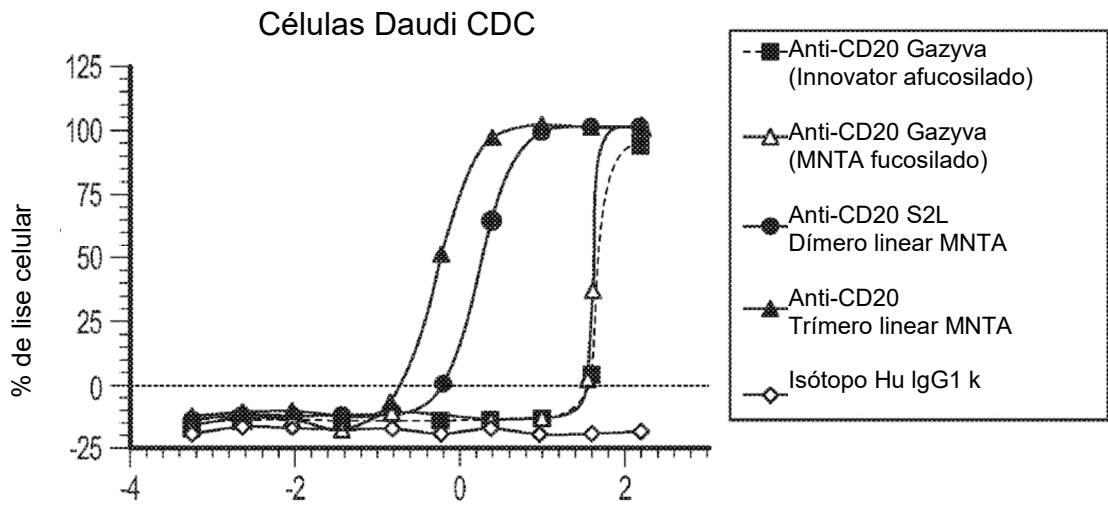
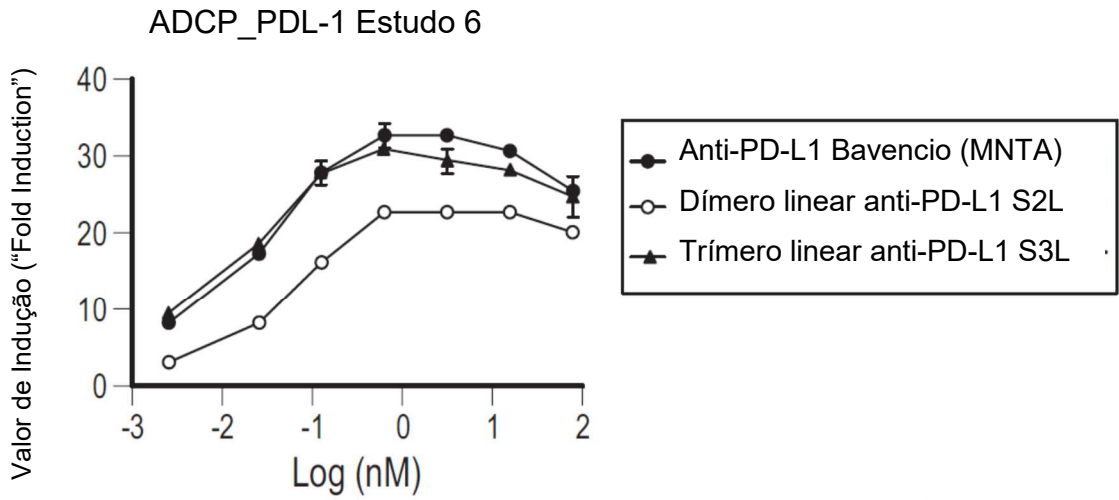


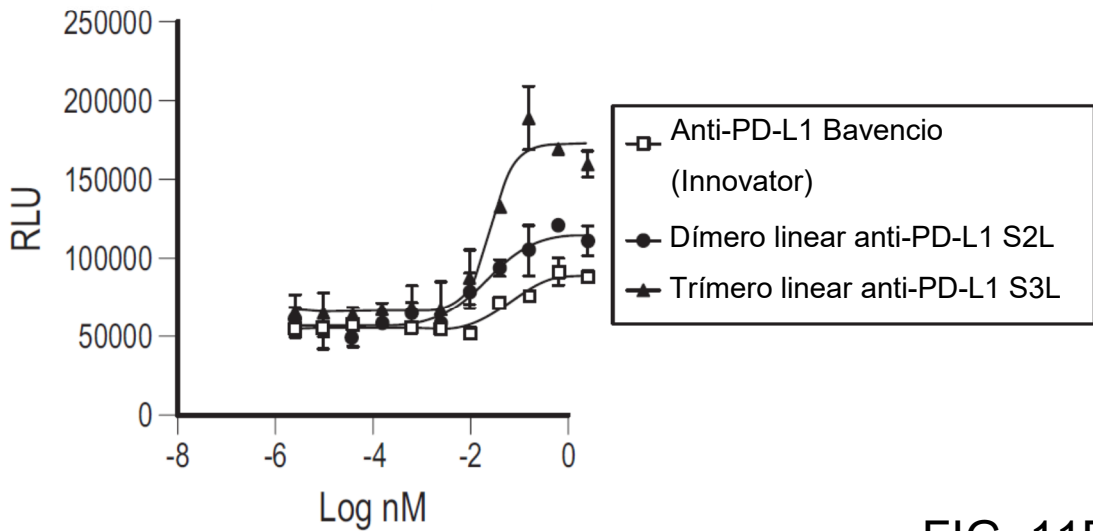
FIG. 9B





110217 A549 ensaio KILR ADCC Estudo 6

FIG. 11A



ADCP_PDL-1 Estudo 6

FIG. 11B

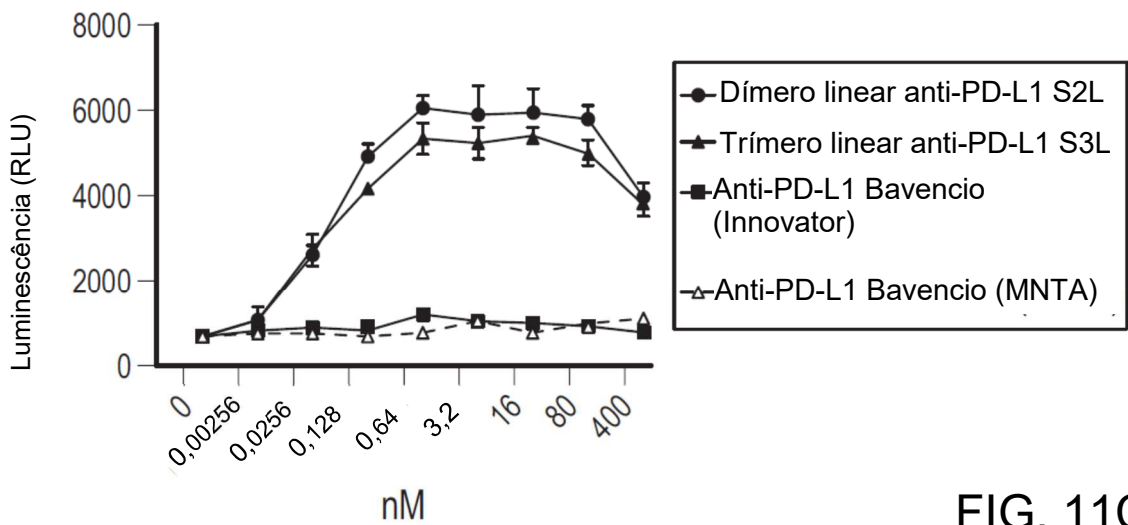


FIG. 11C

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO FC-ANTÍGENO MANIPULADOS"**.

A presente invenção refere-se a composições e métodos de construtos do domínio de ligação Fc-antígeno manipulado, em que os construtos do domínio de ligação Fc-antígeno incluem pelo menos dois domínios Fc e pelo menos um domínio de ligação ao 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 EMENDAS - 03-2021 -
- Data de Geração do Código: 09/03/2021
- Hora de Geração do Código: 09:54:20
- Código de Controle:
 - Campo 1: 55BFC7B7D4033A62
 - Campo 2: 82F792EE891918E0