



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

(21) BR 112019022751-2 A2



(22) Data do Depósito: 07/05/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 19/05/2020

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO CONSTRUTOS DE ANTICORPOS BIESPECÍFICOS PARA ARMAZENAMENTO E ADMINISTRAÇÃO MELHORADOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/395; C07K 16/28; A61K 47/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/05/2017 US 62/502,578.

(71) **Depositante(es):** AMGEN INC..

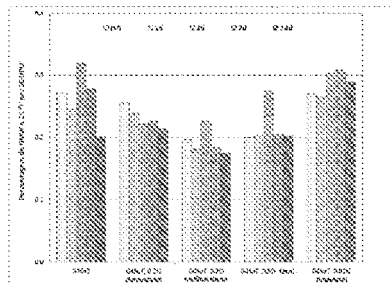
(72) **Inventor(es):** JEFF ABEL; LINGWEN CUI; DEVRISHI GOSWAMI; JOON HUH; BHARADWAJ JAGANNATHAN; SEKHAR KANAPURAM; ARNOLD MCAULEY; MICHAEL SCHNEIDER; ANANTHAKRISHNAN G. SETHURAMAN; MICHAEL TREUHEIT; JUN ZHANG.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018031347 de 07/05/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/204907 de 08/11/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 30/10/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção fornece uma composição farmacêutica melhorada para armazenamento e administração compreendendo (a) um construto de anticorpo biespecífico compreendendo um primeiro domínio de ligação a um antígeno da superfície da célula alvo e um segundo domínio de ligação a um segundo antígeno, em que o construto de anticorpo biespecífico está presente a uma concentração na gama de cerca de 0,5 µg/mL a 20 mg/mL, (b) um conservante a uma concentração eficaz para inibir o crescimento de micróbios e (c) um diluente em que o construto de anticorpo biespecífico é estável e recuperável.



**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO CONSTRUTOS DE
ANTICORPOS BIESPECÍFICOS PARA ARMAZENAMENTO E ADMINISTRAÇÃO
MELHORADOS**

Antecedentes

[001] Proteínas terapêuticas, incluindo produtos farmacêuticos à base de proteínas, já têm um papel significativo em quase todas as áreas da medicina e estão entre os agentes terapêuticos de crescimento mais rápidos no desenvolvimento (pré-)clínico e como produtos comerciais (Leader, *Nature Reviews Drug Discovery* 7 de janeiro de 2008, 21-39) Em comparação com pequenos fármacos químicos, os produtos farmacêuticos de proteína têm elevada especificidade e atividade em concentrações relativamente baixas, e normalmente fornecem uma terapia para doenças de elevado impacto, tal como vários tipos de câncer, doenças autoimunes e distúrbios metabólicos (Roberts, *Trends Biotechnol.* 2014 Jul;32(7):372-80, Wang, *Int J Pharm.* 20 de agosto de 1999;185(2):129-88).

[002] Os produtos farmacêuticos à base de proteína, tais como proteínas recombinantes, podem agora ser obtidos em elevada pureza quando fabricados pela primeira vez devido aos avanços nos processos de purificação à escala comercial. No entanto, as proteínas são apenas marginalmente estáveis e são altamente suscetíveis à degradação, tanto química quanto física. A degradação química refere-se a modificações envolvendo ligações covalentes, tais como desamidação, oxidação, clivagem ou formação de novas pontes dissulfureto, hidrólise, isomerização ou desglicosilação. A degradação física inclui desdobramento de proteínas, adsorção indesejável a superfícies e agregação. Lidar com essas

instabilidades físicas e químicas é uma das tarefas mais desafiadoras no desenvolvimento de produtos farmacêuticos proteicos (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Set 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80).

[003] Produtos farmacêuticos interessantes à base de proteína incluem construtos de anticorpo biespecífico, tal como construtos de anticorpo BiTE® (acoplante de células T biespecíficas) que são construtos de proteínas recombinantes feitos a partir de dois domínios de ligação de anticorpos ligados de forma flexível derivada. Um domínio de ligação de construtos de anticorpo BiTE® é específico para um antígeno de superfície associado a tumor selecionado em células alvo; o segundo domínio de ligação é específico para CD3, uma subunidade do complexo receptor de células T nas células T. Pelo seu desenho particular, os construtos de anticorpo BiTE® são especialmente adequados para ligar transitoriamente células T a células alvo e, ao mesmo tempo, ativam potentemente o potencial citolítico inerente das células T contra células alvo. Um desenvolvimento adicional importante de primeira geração de construtos de anticorpo BiTE® (ver WO 99/54440 e WO 2005/040220) desenvolvidos para a clínica como AMG 103 e AMG 110 foi o fornecimento de construtos de anticorpos biespecíficos que se ligam a um epítipo independente do contexto no terminal N da cadeia CD3ε (WO 2008/119567). Os construtos de anticorpo BiTE® que se ligam a este epítipo eleito não mostram apenas a especificidade de espécies cruzadas para a cadeia CD3ε humana e de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* ou *Saimiri sciureus*, mas também, devido ao reconhecimento deste epítipo específico em vez dos

epítomos descritos anteriormente para ligantes CD3 em moléculas acoplado de células T biespecíficas, não ativam as células T de forma não específica, no mesmo grau observado para a geração anterior de anticorpos acoplado células T. Essa redução na ativação das células T foi relacionada com menor ou reduzida redistribuição de células T em pacientes, o que foi identificado como um risco para efeitos colaterais.

[004] Os construtos de anticorpos, tal como descrito em WO 2008/119567, provavelmente sofrerão de liberação rápida no corpo; assim, enquanto eles são capazes de atingir a maior parte do corpo rapidamente, e são rápidos de produzir e mais fáceis de manusear, suas aplicações in vivo podem ser limitadas por sua breve persistência in vivo. A administração prolongada por infusão intravenosa contínua é usada para obter efeitos terapêuticos, devido à curta meia-vida in vivo desta molécula de cadeia única pequena. No entanto, tais infusões intravenosas contínuas são classificadas como inconvenientes para os pacientes, por exemplo, porque as bolsas de infusão precisam ser trocadas com frequência, pelo menos a cada dois dias, para evitar contaminação microbiana e, portanto, efeitos colaterais como sepse.

[005] A adição de conservantes é vista como uma solução para esse problema. Sua função primária é inibir o crescimento microbiano e garantir esterilidade ao longo da vida de prateleira ou prazo de uso do produto farmacêutico. Conservantes comumente usados incluem álcool benzílico, fenol e m-cresol. Embora conservantes tenha um longo histórico de uso com parenterais de pequena molécula, o desenvolvimento de formulações de proteína que incluem conservantes é desafiador. Os conservantes quase sempre têm

um efeito desestabilizador (agregação) em proteínas, e isso se tornou um fator importante na limitação do seu uso em formulações de proteínas. Assim, a maioria dos fármacos de proteína hoje em dia foi formulada para uso único apenas. Até agora, poucas formulações compreendendo conservantes eram possíveis, tal como hormônio do crescimento humano (hGH) em que o desenvolvimento de formulações conservadas levou à comercialização de apresentações em caneta de injeção de múltiplas doses. Pelo menos quatro destes tais dispositivos de caneta contendo formulações conservadas de hGH estão atualmente disponíveis no mercado. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) & Genotropin (liofilizado--cartucho de câmara dupla, Pharmacia & Upjohn) contêm fenol enquanto Somatropo (Eli Lilly) é formulado com m-cresol. Diversos aspectos precisam ser considerados durante a formulação e o desenvolvimento de formas de dosagem conservadas. A concentração de conservante eficaz no produto de fármaco precisa ser otimizada. Isto exige teste de um dado conservante na forma de dosagem com faixas de concentração que conferem eficácia antimicrobiana sem comprometer estabilidade de proteína. Um ponto importante a ser observado é que a eficácia de conservante deveria ser demonstrada na formulação final contendo o fármaco ativo e todos os componentes de excipiente.

[006] Portanto, é um objetivo da presente invenção fornecer composições farmacêuticas melhoradas compreendendo construtos de anticorpo biespecífico que são preferencialmente conservadas de tal maneira que infusões contínuas possam ser conduzidas em intervalos mais longos, isto é, para aumentar o conforto do paciente e ao mesmo tempo

serem estáveis durante o armazenamento e a administração. No entanto, uma composição farmacêutica conservada adequada compreendendo um construto de anticorpo biespecífico também seria vantajosa para esses construtos de anticorpo biespecífico que não requerem infusão contínua durante dias, mas apenas algumas horas, porque também as infusões desses construtos de anticorpo biespecífico de meia-vida prolongada (HLE) podem levar várias horas dentro do qual o risco de contaminação microbiana e, portanto, infecção, deve ser reduzido. Ao mesmo tempo, também a recuperação da composição farmacêutica e do construto de anticorpo biespecífico nela compreendida também é um objeto da presente invenção.

[007] Uma meia-vida aumentada é geralmente útil em aplicações in vivo de imunoglobulinas, especialmente anticorpos e mais especialmente fragmentos de anticorpo de tamanho pequeno. Abordagens descritas na técnica para conseguir tal efeito compreendem a fusão do construto de anticorpo biespecífico pequeno a proteínas maiores, que preferencialmente não interferem com o efeito terapêutico do construto de anticorpo BiTE®. Exemplos de tais desenvolvimentos adicionais de acoplantes de células T compreendem moléculas Fc biespecíficas, por exemplo, descritas em US 2014/0302037, US 2014/0308285, WO 2014/144722, WO 2014/151910 e WO 2015/048272.

[008] No entanto, evitar a agregação de proteínas é um grande obstáculo para a conservação. A agregação de proteínas representa um evento importante de instabilidade física de proteínas e ocorre devido à tendência inerente de minimizar a interação termodinamicamente desfavorável entre o solvente e os resíduos proteicos hidrofóbicos. Ela é particularmente

problemática porque é encontrada rotineiramente durante os processos de redobrimento, purificação, esterilização, transporte e armazenamento. A agregação pode ocorrer mesmo sob condições de solução onde o estado nativo da proteína é altamente favorecido em termos de termodinâmica (por exemplo, pH neutro e 37 °C) e na ausência de tensões (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, N° 9, Set 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80, Wang, Int J Pharm. 1999 Agosto 20;185(2):129-88, Mahler J Pharm Sci. 2009 Set;98(9):2909-34.).

[009] Também construtos de anticorpo de meia-vida prolongada, tais como de acoplantes de células T biespecíficas compreendendo uma modalidade de meia-vida prolongada, tal como moléculas Fc têm de ser protegidas contra a agregação da proteína e/ou outros eventos de degradação. A agregação de proteínas é problemática, pois pode prejudicar a atividade biológica das proteínas terapêuticas. Ademais, a agregação de proteínas leva a uma estética indesejável do medicamento e diminui o rendimento do produto devido a etapas elaboradas de purificação que são necessárias para remover os agregados do produto final. Mais recentemente, tem havido também uma crescente preocupação e evidência de que a presença de proteínas agregadas (mesmo humanizadas ou totalmente humanas) pode aumentar significativamente o risco de um paciente desenvolver uma resposta imunológica ao monômero ativo da proteína, resultando na formação de anticorpos neutralizantes e em resistência a fármacos, ou outros efeitos colaterais adversos (Mahler J Pharm Sci. 2009 Set;98(9):2909-34.

[0010] No geral, vários esforços têm sido relatados na

literatura para minimizar a agregação de proteínas por vários mecanismos. As proteínas podem ser estabilizadas e, assim, protegidas da formação de agregados e outras alterações químicas, modificando sua estrutura primária, aumentando assim a hidrofobicidade interior e reduzindo a hidrofobicidade externa. No entanto, a engenharia genética de proteínas pode resultar em uma funcionalidade prejudicada e/ou no aumento da imunogenicidade. Outra abordagem enfoca a dissociação de agregados (denominada "desagregação") para recuperar monômeros funcionais nativos, usando vários mecanismos, como temperatura, pressão, pH e sais. Atualmente, os agregados proteicos são removidos como impurezas, principalmente nas etapas de polimento do processamento posterior. No entanto, em casos de elevados níveis de elevado peso molecular (HMW), a remoção de uma quantidade significativa de HMW não apenas resulta em uma perda substancial de rendimento, mas também torna desafiadora a concepção de um processo robusto à jusante (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, N°. 9, Set 2003, pp. 1325-1336).

[0011] Conservar uma formulação de construto de anticorpo biespecífico em uma ampla gama de concentração, mantendo sua estabilidade e garantindo sua recuperação quantitativa do recipiente de administração apresenta sérios desafios. Existe uma necessidade na técnica de composições farmacêuticas otimizadas que forneçam uma estabilização melhorada de formulações de proteínas terapêuticas conservadas. É o objetivo da presente invenção atender a essa necessidade, tanto no que diz respeito aos construtos de anticorpo biespecífico sem meia-vida prolongada e

construtos de anticorpo biespecífico com meia-vida prolongada, tais como os acoplantes de células T biespecíficos que compreendem uma modalidade de extensão da meia-vida, tal como moléculas de Fc.

SUMÁRIO

[0012] A administração segura, quantitativa e opcionalmente prolongada de produtos farmacêuticos à base de proteínas, tal como construtos de anticorpo biespecífico, incluindo construtos de anticorpos de acoplamento de células T biespecíficas, tipicamente através da via i.v., é um desafio. Para este fim, no contexto da presente invenção, é fornecida uma composição farmacêutica, compreendendo:

i. um construto de anticorpo biespecífico, ligando-se a um antígeno da superfície da célula alvo através de um primeiro domínio de ligação e ao antígeno de superfície da célula T CD3 através de um segundo domínio de ligação, em que o construto de anticorpo de cadeia está presente em uma concentração na gama de 0,5 µg/mL a 20 mg/mL, preferencialmente 0,5 µg/mL a 10 ou 5 mg/mL;

ii. pelo menos um conservante selecionado a partir de álcool benzílico, clorobutanol, fenol, meta-cresol, metilparabeno, fenoxietanol, propilparabeno e tiomerosal a uma concentração eficaz para inibir o crescimento de micróbios;

iii. um diluente, em que o construto de anticorpo biespecífico é estável.

[0013] Está previsto no contexto da presente invenção que o construto de anticorpo biespecífico está presente a uma concentração na gama selecionada da lista consistindo em:

(a) 0,5 a 200 µg/mL a um pH de 6,5 a 7,5; ou

(b) 0,5 a 1000 µg/mL a um pH de 4,0 a 6,0; ou

(c) 0,5 µg a 2 mg na presença de um agente estabilizador do domínio de ligação a CD3, preferencialmente citrato, a um pH de 4,0 a 7,5; ou

(d) 0,5 µg a 20 mg, preferencialmente 0,5 µg a 10 ou 5 mg/mL a um pH de 4,0 a 7,5, em que o anticorpo biespecífico compreende um terceiro domínio de ligação que compreende dois monômeros polipeptídicos, cada um compreendendo uma dobradiça, um domínio CH2 e um CH3, em que os referidos dois monômeros polipeptídicos são fundidos um ao outro através de um ligante peptídico, e em que o referido terceiro domínio de ligação compreende numa ordem amino a carboxila:

dobradiça-CH2-CH3-ligante-dobradiça-CH2-CH3.

[0014] Está também previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica compreende um construto de anticorpo biespecífico que é um construto de anticorpo biespecífico de cadeia única.

[0015] Está ainda previsto no contexto da presente invenção que o construto de anticorpo biespecífico está presente em uma concentração na gama de 1,0 a 20 mg/ml, ou 1,0 a 10 mg/ml, ou 1,0 µg/ml a 5 mg/ml ou 1,0 µg/ml a 4 mg/ml ou 1,0 µg/ml a 3 mg/ml, ou 1,0 µg/ml a 2 mg/ml ou 1,0 µg/ml a 1 mg/ml ou 1,5 a 5 mg/ml ou 1,5 µg/ml a 4 mg/ml ou 1,5 µg/ml a 3 mg/ml, ou 1,5 µg/ml a 2 mg/ml ou 1,5 µg/ml a 1 mg/ml ou 1,5 a 200 µg/ml.

[0016] Está também previsto no contexto da presente invenção que o pelo menos um conservante está presente em uma concentração na gama de 0,001 a 1,0% (p/v).

[0017] Está ainda mais previsto no contexto da presente invenção que o conservante está presente em uma concentração

na gama de 0,009 a 0,9% (p/v), preferencialmente 0,11 a 0,9%, ou 0,5 a 0,75% (p/v) ou 0,6 a 0,74% (p/v).

[0018] Está previsto no contexto da presente invenção que o diluente é um tampão compreendendo um sal selecionado do grupo consistindo em fosfato, acetato, citrato, succinato e tartarato e/ou em que o tampão compreende histidina, glicina, TRIS glicina, Tris ou suas misturas.

[0019] Está ainda previsto no contexto da presente invenção que o diluente é um tampão selecionado do grupo consistindo em fosfato de potássio, ácido acético/acetato de sódio, ácido cítrico/citrato de sódio, ácido succínico/succinato de sódio, ácido tartárico/tartarato de sódio e histidina/histidina HCl ou suas misturas.

[0020] Também está previsto no contexto da presente invenção que o diluente é um tampão presente a uma concentração na gama de 0,1 a 150 mM, preferencialmente na gama de 0,25 a 50 mM.

[0021] É ainda mais previsto no contexto da presente invenção que o diluente é um tampão compreendendo citrato a uma concentração na gama de 0,25 a 50 mM.

[0022] Está previsto no contexto da presente invenção que o pH da composição está na gama de 4,0 a 8,0, preferencialmente na gama de pH 4,0 a 5,0 ou pH 6,5 a 7,5, ou preferencialmente a pH 7,0.

[0023] É ainda previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica compreende ainda um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em sacarose, trealose, manitol, sorbitol, arginina, lisina, polissorbato 20, polissorbato 80, poloxâmero 188, plurônico e suas combinações.

[0024] Também está previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica compreende ainda polissorbato, preferencialmente polissorbato 80 e/ou lisina HCL.

[0025] É ainda previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica não compreende polissorbato, preferencialmente polissorbato 80 e/ou lisina HCL, se a concentração do construto de anticorpo biespecífico for pelo menos 10 µg/mL, preferencialmente 15 µg/mL ou 20 µg/mL.

[0026] É ainda mais previsto no contexto da presente invenção que o primeiro domínio de ligação do construto de anticorpo biespecífico se liga a pelo menos um antígeno da superfície da célula alvo selecionado do grupo consistindo em CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA e PSMA.

[0027] É previsto no contexto da presente invenção que o primeiro domínio de ligação compreende uma região VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 e uma região VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 selecionada do grupo consistindo em:

(a) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 1, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 2, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 3, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 4, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 5 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 6;

(b) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 29, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 30, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 31, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 34, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 35 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 36;

(c) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 42, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 43, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 44, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 45, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 46 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 47;

(d) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 53, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 54, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 55, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 56, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 57 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 58;

(e) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 65, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 66, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 67, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 68, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 69 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 70;

(f) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 83, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 84, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 85, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 86, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 87 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 88;

(g) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 94, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 95, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 96, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 97, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 98 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 99;

(h) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 105, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 106, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 107, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 109, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 110 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID

NO: 111;

(i) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 115, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 116, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 117, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 118, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 119 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 120;

(j) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 126, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 127, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 128, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 129, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 130 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 131;

(k) CDR-H1 conforme representado na SEQ ID NO: 137, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 138, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 139, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 140, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 141 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 142;

(l) CDR-H1 conforme representado na SEQ ID NO: 152, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 153, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 154, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 155, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 156 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 157; e

(m) CDR-H1 conforme representado na SEQ ID NO: 167, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 168, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 169, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 107, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 171 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID

NO: 172.

[0028] Está ainda previsto no contexto da presente invenção que o construto de anticorpo biespecífico é fornecido com uma porção de extensão de meia-vida (HLE), preferencialmente um domínio scFc.

[0029] É também previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica é líquida, liofilizada ou congelada.

[0030] É ainda mais previsto no contexto da presente invenção que a composição compreende < 5% de multímeros do construto de anticorpo biespecífico, preferencialmente <1%.

[0031] Está previsto no contexto da presente invenção que os multímeros são dímeros.

[0032] É ainda previsto no contexto da presente invenção que a composição compreende < 5% de multímeros do construto de anticorpo biespecífico, preferencialmente < 1% por um período de tempo de pelo menos 4 dias, preferencialmente pelo menos 10 dias, mais preferencialmente pelo menos 14 dias à temperatura ambiente.

[0033] Também está previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica é colocada em um recipiente de administração de plástico, de preferência feito de EVA, poliolefina e/ou PVC.

[0034] É ainda mais previsto no contexto da presente invenção que o construto de anticorpo biespecífico de cadeia única é recuperado em pelo menos 90%, preferencialmente pelo menos 95, 96, 97, 98 ou mesmo pelo menos 99% da diluição do recipiente de administração de plástico compreendendo pelo menos um dos tampões e/ou excipientes, de acordo com as reivindicações 6 a 13.

[0035] Está previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica compreende pelo menos 0,25 mM de citrato, pelo menos 0,0125 mM de lisina e/ou pelo menos 0,001% de polissorbato 80 a um pH de 6,5 a 7,5.

[0036] É ainda previsto que a composição farmacêutica no contexto da presente invenção é uma solução de armazenamento armazenada a -50 °C, preferencialmente a -40, -30 °C ou -20 °C.

[0037] Também está previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica fornecida como uma solução de armazenamento armazenada a -50 °C, preferencialmente a -40, -30 °C ou -20 °C compreenda o anticorpo biespecífico compreendendo um terceiro domínio de ligação que compreende dois monômeros polipeptídicos, cada um compreendendo um domínio de dobradiça, um CH2 e um CH3, em que os referidos dois monômeros polipeptídicos são fundidos um ao outro através de um ligante peptídico, e em que o referido terceiro domínio de ligação compreende em uma ordem amino a carboxila:

dobradiça-CH2-CH3-ligante-dobradiça-CH2-CH3.

[0038] É ainda previsto no contexto da presente invenção que o construto de anticorpo biespecífico é fornecido como um liofilizado, o liofilizado compreendendo preferencialmente um lioprotetor, um tampão e/ou um tensoativo, e em que o liofilizado é reconstituído por um diluente, compreendendo um conservante e preferencialmente compreendendo um tampão e/ou um excipiente.

[0039] É especialmente previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica é armazenada até ser utilizada como solução, como solução no estado congelado ou

como liofilizado, e é então administrada, opcionalmente após diluição ou reconstituição, sem a necessidade de adicionar outros excipientes selecionados de conservantes, estabilizadores ou tensoativos.

[0040] Também está previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica é para uso no tratamento de uma doença maligna.

[0041] Ainda mais previsto no contexto da presente invenção é um método para o tratamento ou melhoria de uma doença maligna, compreendendo a etapa de administração a um indivíduo em necessidade da composição farmacêutica de acordo com a presente invenção ou produzida de acordo com o método de presente invenção.

[0042] Está previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é administrada por via intravenosa, preferencialmente continuamente, por 1 a 24 horas, preferencialmente 1 a 10 ou 2 a 5 horas.

[0043] É ainda previsto no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é administrada intravenosamente continuamente por 2 a 14 dias, preferencialmente por 2 a 10 dias, mais preferencialmente por 4 a 7 dias.

[0044] Também está previsto no contexto da presente invenção um kit que compreende o construto de anticorpo biespecífico como um liofilizado, o liofilizado preferencialmente compreendendo um lioprotetor, um tampão e/ou um tensoativo e um diluente, compreendendo um conservante e preferencialmente compreendendo um tampão e/ou um excipiente de acordo com a presente invenção.

Descrição das Figuras

[0045] **Figura 1:** Diagrama de estabilidade conforme as espécies de elevado peso molecular percentual (HMW) dos construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3, conforme determinado por SEC-HPLC para os conservantes clorobutanol, metilparabeno, fenol e tiomerosal a 25 °C e pH 4.

[0046] **Figura 2:** Diagrama de estabilidade conforme as espécies de elevado peso molecular percentual (HMW) dos construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3, conforme determinado por SEC-HPLC para o conservante álcool benzílico, dependendo da concentração dos construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3 a 25 °C e pH 7.

[0047] **Figura 3:** Diagrama de estabilidade conforme o percentil do pico principal (A) e as espécies de elevado peso molecular percentual (HMW) dos construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3, como determinado por SEC-HPLC para o conservante álcool benzílico, dependendo da concentração de conservante a 25 °C (B) e dependendo do material do recipiente de administração (C). Diagrama de estabilidade como o percentil do pico principal (monômero) dos construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3, como determinado por SEC-HPLC para o conservante álcool benzílico, dependendo da concentração do conservante a 25 °C, dependendo do material do recipiente de administração (D).

[0048] **Figura 4:** Diagrama de desnaturação dos construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3 a uma concentração de 1 mg/ml na presença ou ausência do conservante álcool benzílico, conforme determinado por espectrometria de fluorescência a pH 4.

[0049] **Figura 5:** Diagramas de crescimento microbiano para

E. coli (A), *P. aruginosa* (B), *E. cloace*, (C), *S. aureus* (D), *M. luteus* (E) e *C. albicans* (F) em formulações compreendendo construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3 e álcool benzílico 0, 0,5, 0,6 ou 0,7%.

[0050] **Figura 6:** Efeitos de estabilização do citrato - onde aplicável na presença de álcool benzílico - em FAP α (A), domínio anti-CD3, em que o peptídeo 108-112 no domínio anti-CD3 (YISYW) corresponde ao peptídeo 367-370 em FAP α (B), construtos de anticorpo biespecífico CD33xCD3 em que o peptídeo 364-368 em construtos de anticorpo biespecífico CD33xCD3 (YISYW) corresponde ao peptídeo 366-370 em FAP α (C) e construtos de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 em que o peptídeo 365-369 em construtos de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 (YISYW) corresponde ao peptídeo 366-370 em FAP α (D). As Figuras 6E e F mostram o efeito do citrato e álcool benzílico individualmente e as Figuras 6G e H em combinação, cada uma em um construto de anticorpo biespecífico ou concentração de domínio único de 600 $\mu\text{g/mL}$ cada. Os resultados são os mesmos para o domínio anti-CD3, construtos de anticorpo biespecífico CD33xCD3, FAP α e construtos de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3.

[0051] **Figura 7:** Cromatograma de fase reversa após injeções de 50 μL de construto de anticorpo biespecífico não HLE EGFRvIII x CD3 em uma coluna C8 diluída para 1 $\mu\text{g/mL}$ em 0 a 10% de IVSS, respectivamente, em solução salina a 0,9% (A). A área do pico para cada amostra de construto de anticorpo biespecífico não HLE EGFRvIIIxCD3 eluído é plotada em função da concentração percentual de IVSS [% IVSS] incluída na solução de diluição (B).

[0052] **Figura 8:** O impacto e a necessidade dos

excipientes em relação à recuperação percentual são avaliados. Observada por 24 horas a 25 °C, não é necessária a adição de uma combinação de citrato, lisina e polissorbato 80 (combinação aqui abreviada como IVSS) para garantir a recuperação quantitativa do construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 se a concentração do construto for de pelo menos 15 µg/mL (8A). O agente que facilita a recuperação quantitativa é o polissorbato 80, enquanto os excipientes não tensoativos não são necessários para esse efeito (8B). 0,002% de polissorbato 80 garantem a recuperação do construto do anticorpo biespecífico CD19xCD3 na bolsa IV, mesmo em concentrações muito baixas de 1 e 0,05 µg/mL (8C). 0,02% de polissorbato 80 corresponde à concentração típica em IVSS.

[0053] **Figura 9:** O conservante álcool benzílico melhora a estabilidade congelada das composições farmacêuticas compreendendo construtos de anticorpo biespecífico CD19xCD3, CD33xCD3, BCMAxCD3 e DLL3xCD3 compreendendo um terceiro domínio (domínio HLE) a uma concentração de 1 mg/mL a pH 4 como mostrado após armazenamento durante 4 semanas a -20 °C.

[0054] **Figura 10:** O efeito estabilizador do conservante álcool benzílico em relação à estabilidade congelada é melhor em uma concentração acima de 0,1% e garante uma redução nas espécies HMW mesmo em altas concentrações de construto de anticorpo biespecífico de 5 mg/mL, como exemplificado com DLL3xCD3 a pH 4 após armazenamento em - 20 °C durante 4 semanas.

Descrição Detalhada

[0055] Um conceito geral subjacente à presente invenção é a surpreendente descoberta de que a estabilidade de uma composição farmacêutica, tanto no estado líquido como

congelado, compreendendo um construto de anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção é melhorada pela adição de um conservante à composição farmacêutica líquida, tipicamente dependendo da concentração do construto de anticorpo biespecífico e do conservante. Surpreendentemente, verificou-se que uma composição farmacêutica que compreende um construto de anticorpo biespecífico, que é de preferência um construto de anticorpo de cadeia única, tal como um construto de anticorpo BiTE®, tanto quando compreende um terceiro domínio como aqui definido, ou seja, um construto de anticorpo biespecífico com meia-vida prolongada (HLE) ou não, se presente a uma certa concentração de cerca de 0,5 µg/mL a 5 mg/mL, não é apenas estável na presença de um conservante, mas pode até ser estabilizado por esse conservante. Isto é particularmente surpreendente, uma vez que era conhecido na técnica que conservantes como álcool benzílico, m-cresol e fenoxietanol promovem a agregação de proteínas, tal como anticorpos. Contudo, dependendo, por exemplo, do tipo de concentração de anticorpo biespecífico, e opcionalmente do pH e da presença de um agente estabilizador complementar adicional, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é estável. Nele, o primeiro domínio de ligação descrito aqui (domínio de direcionamento) é de menor importância porque a ação estabilizadora de um conservante e um excipiente complementar adicional de estabilização opcional, tal como o citrato, está principalmente associada à interação com o segundo domínio de ligação (domínio de ligação a CD3). Vantajosamente, o conservante pode servir para estabilizar fisicamente e microbiologicamente a

composição farmacêutica durante o armazenamento, por exemplo, no estado congelado e, após o ajuste opcional do pH e/ou diluição, quando administrada. Portanto, convenientemente a mesma composição farmacêutica pode ser usada, apesar do ajuste de pH opcional, por exemplo de pH baixo, como 4,0 a 6,5, a um pH neutro, de 6,5 a 7,5, e diluição com a finalidade de administração i.v.. Ao longo, a concentração de construto de anticorpo biespecífico está, no entanto, na gama de 0,5 µg/mL a 5 mg/mL, ou em algumas circunstâncias, na gama de 0,3 µg/mL a 10, 20 ou mesmo 30 mg/mL. Deste modo, composição farmacêutica compreendendo recipientes, tal como bolsas de infusão i.v., só é requerido ser trocada com intervalos de tempo mais longos, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou mesmo 14 dias, devido à reduzida contaminação microbiana, o que aumenta o conforto do paciente.

[0056] Conservantes estabilizadores e microbiologicamente eficazes incluem, mas não estão limitados a, álcool benzílico, clorobutanol, metilparabeno, fenol e tierosal. Os conservantes úteis para a formulação de composições farmacêuticas incluem geralmente antimicrobianos (por exemplo, agentes antibacterianos ou antifúngicos), antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes e similares; os exemplos incluem: cloreto de benzalcônio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerossal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio). Os conservantes antimicrobianos são substâncias utilizadas para prolongar o prazo de validade dos medicamentos, reduzindo a proliferação microbiana. Os conservantes particularmente úteis para formular a

composição farmacêutica da invenção incluem álcool benzílico, clorobutanol, fenol, meta-cresol, metilparabeno, fenoxietanol e tiomerossal propilparabeno. A estrutura e a concentração típica para o uso desses conservantes estão descritas na Tabela 1 de Meyer et al. J Pharm Sci. 96(12), 3155.

[0057] Os conservantes supramencionados podem estar presentes na composição farmacêutica a diferentes concentrações. Por exemplo, o álcool benzílico pode estar presente em uma concentração que varia entre 0,2 e 1,1% (p/v), preferencialmente, 0,5 a 0,9% (p/v), clorobutanol em uma concentração que varia entre 0,3-0,5% (p/v), fenol em uma concentração que varia entre 0,07 e 0,5% (p/v), meta-cresol em uma concentração que varia entre 0,17 e 0-32% (p/v) ou tiomerossal em uma concentração que varia entre 0,003 e 0,01% (p/v). As concentrações preferidas do metilparabeno encontram-se na gama de 0,05 e 0,5% (p/v); para o fenoxietanol, na gama de 0,1 e 3% (p/v); e para o propilparabeno, na gama de 0,05 e 0,5% (p/v).

[0058] Sem querer ficar vinculado à teoria, conservantes, tal como álcool benzílico, se ligam a sítios de dimerização de construtos de anticorpo biespecífico, tal como o construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3, a uma concentração apropriada e, assim, reduzem a possibilidade de formar dímeros ou outros multímeros. Desse modo, o risco de agregação é significativamente reduzido, por exemplo, no construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3, BCMAxCD3, PSAMxCD3, CD33xCD3 ou EGFRvIIIxCD3. Isto é particularmente surpreendente, porque várias regiões de desdobramento sugerem que um conservante, tal como o álcool benzílico,

está desestabilizando o monômero do construto de anticorpo biespecífico, o que deve levar ao aumento da formação de dímero/agregado. No entanto, algumas dessas regiões se sobrepõem às regiões que provavelmente estão envolvidas na formação de dímeros. Este desdobramento regional pode estar atrapalhando a formação do dímero com a conversão de volta ao monômero e um efeito estabilizador geral enquanto a concentração de anticorpo biespecífico permanecer dentro de certos limites.

[0059] Em certas modalidades, um tampão e/ou excipiente pode ser aplicado para aumentar a estabilidade do construto de anticorpo biespecífico na presença de um conservante em uma composição farmacêutica para administração i.v. de acordo com a presente invenção. Um tal excipiente é aqui referido como agente estabilizante complementar que interage com o domínio de ligação de CD3. Em modalidades específicas, por exemplo, em um pH neutro e/ou no construto de anticorpo biespecífico que não possui o terceiro domínio de ligação como aqui descrito e está presente na composição farmacêutica a uma concentração mais alta, por exemplo, acima de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou 1000 µg/ml, tipicamente pelo menos 50 µg/mL ou 200 µg/mL, esse agente estabilizador complementar pode ser preferido para garantir a estabilidade do construto de anticorpo biespecífico na presença de um conservante. Este pode ser o caso, por exemplo, de construtos de anticorpo biespecífico sem um terceiro domínio de ligação, como descrito aqui, por exemplo, construto de anticorpo biespecífico de CD33xCD3. Prevê-se que não sejam necessários agentes estabilizadores complementares, tal como o citrato,

se a concentração de construto de anticorpo biespecífico for, por exemplo, 200, 150, 100 ou 50 µg/mL ou inferior. No entanto, outros tampões/excipientes tais como polissorbatos, por exemplo o polissorbato 80, podem ser preferidos a uma concentração de 20, 15 ou 10 µg/mL de construto de anticorpo biespecífico, a fim de permitir a recuperação quantitativa, isto é, a perda, por exemplo, devido à adsorção para o recipiente de administração ser baixa e a quantidade recuperada percentual corresponder a pelo menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou até 99,5%. Isso é particularmente vantajoso, pois os excipientes excessivos são economizados tanto por razões práticas (manuseio) quanto por razões médicas (alergias, efeitos colaterais).

[0060] Um pH baixo complementa a estabilização do construto de anticorpo biespecífico por um conservante também a uma concentração mais alta que em um pH neutro, razão pela qual uma composição farmacêutica compreendendo concentrações mais altas, tal como pelo menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 µg/mL, é estável, ou seja, mostra de preferência uma baixa concentração percentual de HMW abaixo de 5, 4, 3, 2, 1 ou mesmo 0,5%.

[0061] Os tampões e/ou excipientes usados em certas modalidades para estabilizar o construto de anticorpo biespecífico na presença de um conservante podem incluir, mas não estão limitados a, citrato, lisina e polissorbato 80. Qualquer um desses compostos individualmente ou em qualquer combinação ou composto comparável quanto à sua função ou estrutura pode ser usado para obter um efeito estabilizador para o construto de anticorpo biespecífico na presença de um conservante de acordo com a presente invenção

e/ou aumentar a recuperação, também na ausência de um conservante em que este último não é necessário para estabilidade ou estabilidade microbiológica.

[0062] Os tampões e/ou excipientes usados em certas modalidades para estabilizar o construto de anticorpo biespecífico na presença de um conservante também podem ser e/ou simultaneamente utilizados de forma surpreendente para melhorar a recuperação do construto de anticorpo biespecífico a partir do recipiente (plástico) que é usado para administrar a composição farmacêutica ao paciente. Como os fármacos de acordo com a presente invenção são tipicamente doseados a uma concentração muito baixa, por exemplo, adsorção para o recipiente de administração, tal como uma bolsa de infusão i.v., pode ter influência significativa na dosagem eficaz. Portanto, é muito benéfico que a adição de tais tampões e/ou excipientes possa aumentar a recuperação do fármaco a partir do recipiente. Por exemplo, a adição de uma combinação de citrato, lisina e/ou polissorbato 80 à composição farmacêutica administrada ao paciente pode aumentar a recuperação em até 250% em comparação com a concentração do fármaco na ausência desses compostos. Quantidades relativamente baixas, por exemplo, de pelo menos 0,25 a 1 mM de citrato, 0,0125 M de lisina e/ou 0,001% de polissorbato 80 podem ser suficientes para esse fim. Isso significa 1% da solução IVSS a ser administrada ao paciente, o que pode ser suficiente. Resultados ainda melhores podem ser obtidos com quantidades maiores, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% de IVSS. IVSS a 4% pode ser preferido. No entanto, nem todos os componentes de IVSS podem ser necessários para obter o efeito de recuperação melhorada.

Por exemplo, o polissorbato sozinho pode reduzir suficientemente a adsorção do fármaco no recipiente de administração. O referido aspecto da presente invenção contribui para melhorar a confiabilidade da dose para fármacos muito potentes, tais como construtos de anticorpo biespecífico. Por conseguinte, a segurança do paciente também é melhorada pela presente invenção.

[0063] No entanto, acima de um certo limite, esses tampões e/ou excipientes podem não ser mais necessários para melhorar a recuperação. Esse limiar é, por exemplo, 10 µg/mL, 15 µg/mL ou 20 µg/mL, preferencialmente 15 µg/mL. No entanto, geralmente, é preferida uma composição farmacêutica que compreende pelo menos um tensoativo como excipiente em relação à recuperação, tal como polissorbato, especialmente polissorbato 80.

[0064] Em outro aspecto da presente invenção, com base nas descobertas de HDX, conservantes, tal como o álcool benzílico, podem desestabilizar especificamente o segundo domínio de ligação (domínio anti-CD3) dos construtos de anticorpos biespecíficos, de acordo com a presente invenção, por interação (hidrofóbica), se o construto do anticorpo biespecífico está presente acima de um certo limiar que depende da ausência da presença do terceiro domínio de ligação, de acordo com a presente invenção, e/ou o pH da composição farmacêutica. Tipicamente, o limiar é mais alto se um terceiro domínio de ligação como descrito aqui estiver presente e/ou o pH for ácido, tal como pH 4,0 a 6,5. Sem querer estar limitado pela teoria, essa desestabilização de construto de anticorpo biespecífico pode estar associada a um aumento da dinâmica conformacional que, por sua vez, pode

geralmente estar associada a uma menor estabilidade da molécula. No entanto, foi surpreendentemente encontrado aqui que tampões e/ou excipientes, tal como citrato, compreendendo tampões ou excipientes, podem contrabalançar esse efeito desestabilizador. Os efeitos que contrariam entre tais tampões e/ou excipientes e o conservante podem aplicar-se a todos os construtos de anticorpos biespecíficos (em relação à conformação) com um domínio anti-CD3 caracterizado por CDRs representado nas SEQ ID Nos 18 a 23. Como foi observado em relação a esses construtos de anticorpos biespecíficos, em concentrações mais baixas (por exemplo, abaixo de 50 µg/mL), nenhum excipiente estabilizador é necessário na presença de um conservante, tal como o álcool benzílico, quando o conservante, tal como o álcool benzílico, pode surpreendentemente ter propriedades estabilizantes por si só devido à supressão ou redução de dímeros. Tipicamente, este não é o caso em concentrações mais altas, por exemplo, a uma concentração superior a 200 µg/mL, desde que a composição farmacêutica tenha um pH acima de 6,5 e/ou o construto de anticorpo biespecífico compreenda um terceiro domínio, como aqui descrito. No caso de um efeito desestabilizador do conservante superar o seu efeito estabilizador com base na concentração de construto de anticorpo biespecífico, um excipiente tal como o citrato pode ser usado como excipiente estabilizador adicional e complementar. Portanto, a adição de um agente estabilizador adicional, tal como o citrato, permite um uso mais versátil (gama de concentração) de construtos de anticorpos biespecíficos na presença de um conservante, tal como o álcool benzílico.

[0065] Alternativamente, é considerado no contexto da presente invenção que a composição farmacêutica é, por exemplo, para infusão durante 7 dias, utilizando cloreto de sódio bacteriostático a 0,9%, USP (contendo álcool benzílico a 0,9%). Prevê-se, em particular, que esta opção esteja disponível para pacientes com peso maior ou igual a um determinado limite por razões de segurança. Esse limite pode ser 20, 22 ou 25 kg.

[0066] Está previsto em uma modalidade específica no contexto da presente invenção, que o construto de anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção é fornecido em um frasco de dose única, tal como um pó liofilizado estéril, isento de conservantes, branco a esbranquiçado, para administração intravenosa. Cada frasco de dose única de um construto de anticorpo CD19xCD3 contém 35 mcg de construto de anticorpo biespecífico, de acordo com a presente invenção, mono-hidrato de ácido cítrico (3,35 mg), cloridrato de lisina (23,23 mg), polissorbato 80 (0,64 mg), di-hidrato de trealose (95,5 mg) e hidróxido de sódio para ajustar o pH a 7,0. Após reconstituição com 3 mL de Cloreto de Sódio a 0,9%, USP (contendo álcool benzílico a 0,9%), a concentração resultante é de 12,5 mcg/mL de construto de anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção. I.v. A Solução Estabilizadora (IVSS) é fornecida em um frasco de dose única como uma solução clara estéril, isenta de conservantes, incolor a ligeiramente amarelada. Cada frasco de dose única da Solução Estabilizadora IV contém mono-hidrato de ácido cítrico (52,5 mg), cloridrato de lisina (2283,8 mg), polissorbato 80 (10 mg), hidróxido de sódio para ajustar o pH a 7,0 e água para injeção.

[0067] Quanto à presente invenção, o termo "estabilidade" ou "estabilização" refere-se à estabilidade da composição farmacêutica no total e em particular à estabilidade do ingrediente ativo (isto é, a construção de anticorpo de cadeia simples biespecífica), especificamente durante a formulação, o enchimento, o transporte, o armazenamento e a administração. Os termos "estabilidade" ou "estável" no contexto da composição farmacêutica da invenção e do construto de anticorpo de cadeia única biespecífico referem-se particularmente à redução ou prevenção da formação de agregados de proteína (HMWS). Especificamente, o termo "estabilidade" também se relaciona com a estabilidade coloidal dos construtos de anticorpo (cadeia única) biespecíficos compreendidas na composição farmacêutica aqui descrita. "Estabilidade coloidal" é a capacidade de partículas coloidais (como proteínas) permanecerem dispersas em líquidos por um período prolongado de tempo (de dias a anos). No que diz respeito à estabilidade em relação à conservação, é utilizado o termo estabilidade microbiológica.

[0068] O termo "agregado de (proteína)", conforme usado aqui, geralmente engloba espécies de proteínas de maior peso molecular, tais como "oligômeros" ou "multímeros", em vez das espécies definidas desejadas (por exemplo, um monômero). O termo é utilizado aqui intercambiavelmente com os termos "espécies de elevado peso molecular" e "HMWS". Os agregados de proteína geralmente podem diferir em tamanho (variando de pequenos (dímeros) a grandes conjuntos (partículas subvisíveis ou visíveis) e da gama de nanômetro a micrômetro), morfologia (de aproximadamente esféricos a

fibrilares), estrutura proteica (nativa versus não-nativa/desnaturada), tipo de ligação intermolecular (covalente versus não-covalente), reversibilidade e solubilidade. Os agregados solúveis cobrem a gama de tamanho de aproximadamente 1 a 100 nm e as partículas proteicas cobrem gamas subvisíveis (~0,1-100 .m) e visíveis (>100 .m). Todos os tipos supramencionados de agregados de proteína geralmente são englobados pelo termo. O termo "agregado (de proteína)" refere-se, assim, a todos os tipos de espécies não-nativas fisicamente associadas ou quimicamente ligadas de dois ou mais monômeros de proteína.

[0069] O termo "agregação de proteína" ou "agregação não-nativa" denota, assim, o(s) processo(s) pelo(s) qual(is) as moléculas de proteínas se agrupam em complexos compostos de duas ou mais proteínas, com as proteínas individuais indicadas como monômero. Existem diversas vias que levam à agregação de proteínas que podem ser induzidas por uma ampla variedade de condições, incluindo temperatura, tensão mecânica, como agitar e sacudir, bombeamento, congelamento e/ou descongelamento e formulação.

[0070] Um aumento na temperatura acelera as reações químicas, como oxidação e desamidação de proteínas, que por sua vez pode promover a agregação. A temperatura mais alta também influencia diretamente a conformação de proteínas no nível da estrutura quaternária, terciária e secundária e pode levar a um desdobramento induzido pela temperatura que pode promover a agregação. As temperaturas referidas no presente pedido são tipicamente temperaturas de congelamento profunda para armazenamento a longo prazo de produtos farmacêuticos à base de proteínas delicadas (-70 °C),

temperatura de congelação regular (-20 °C), temperatura de refrigeração (4 °C), temperatura ambiente (25 °C) e temperatura fisiológica (37 °C).

[0071] Por isso, foi surpreendente descobrir que a adição de um conservante à composição farmacêutica da presente invenção pode suprimir a agregação de estado congelado em relação aos construtos de anticorpos biespecífico da presente invenção. Tais construtos anticorpos biespecíficos podem, portanto, ser armazenados a -50 °C, -40 °C ou, de preferência, até -30 ° ou -20 °C em vez de -70 °C sem mostrar agregação no estado congelado, ou seja, a presença de agregados como espécies de alto peso molecular (HMW), permanecem abaixo de 1% ou mesmo abaixo de 0,8%, 0,6%, 0,4% ou mesmo abaixo de 0,3% durante um período de armazenamento de pelo menos 1 mês, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 ou 24 meses. Vantajosamente, a energia pode ser economizada quando o armazenamento de -70 °C pode ser substituído pelo armazenamento a uma temperatura mais alta de congelamento ou a capacidade de armazenamento de -70 °C pode ser alocada para outros itens de armazenamento mais delicados. Ao mesmo tempo, os desafios de transporte são reduzidos se apenas uma temperatura de armazenamento no congelamento regular, em vez da gama de congelamento profundo, for necessária para armazenar a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção. Sem querer estar vinculado pela teoria, os agregados de estado congelado provavelmente são formados devido a interações hidrofóbicas entre regiões específicas do primeiro domínio de ligação e o segundo domínio de ligação do construto de anticorpo biespecífico. A adição de um

conservante, tal como álcool benzílico, pode manter baixa a agregação do estado congelado, por exemplo, abaixo de 1% de espécies HMW em relação à quantidade total de construto de anticorpo biespecífico em solução (congelada), ligando-se a um adesivo hidrofóbico no segundo domínio de ligação do construto de anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção. Isto é particularmente verdadeiro para construtos de anticorpos biespecíficos compreendendo um terceiro domínio, de acordo com a presente invenção, tal como um domínio scFc HLE.

[0072] Preferencialmente, a composição farmacêutica de armazenamento no estado congelado tem um pH na gama de pH 4,0 a 6,5, preferencialmente 4,2 a 4,8. Antes da administração a um paciente, o pH pode ser aumentado para melhor compatibilidade i.v.. No entanto, tipicamente, a composição farmacêutica pode ser utilizada sem a necessidade de remover componentes particulares, tais como excipientes, antes da administração. Por conseguinte, o conservante que funcionou como um agente estabilizador físico durante, por exemplo, o armazenamento em estado congelado, pode atuar subsequentemente, como agente estabilizador na composição farmacêutica administrada por líquido, opcionalmente após diluição e/ou ajuste de pH, e também pode servir como conservante para garantir a estabilidade microbiológica da composição farmacêutica, de acordo com a presente invenção.

[0073] A desnaturação e a agregação de proteínas podem ocorrer durante o congelamento/degelo devido a complexas alterações físicas e químicas, como a criação de novas interfaces de gelo/solução, adsorção a superfícies de recipientes, crioconcentração da proteína e solutos e

alterações de pH devido à cristalização dos componentes do tampão.

[0074] Um aumento na concentração de proteína também pode melhorar a formação de agregados proteicos. Em altas concentrações proteicas, ocorre a aglomeração macromolecular, um termo usado para descrever o efeito da ocupação de volume total elevado por solutos macromoleculares sobre o comportamento de cada espécie macromolecular naquela solução. De acordo com essa teoria do volume excluído, a automontagem e, assim, a agregação potencial podem ser favorecidas.

[0075] Os conservantes antimicrobianos, tais como álcool benzílico e fenol, são conhecidos em formulações líquidas para garantir a esterilidade durante a sua vida de prateleira, e adicionalmente, necessários em formulações de diversas doses e certos sistemas de administração de fármaco, por exemplo, canetas de injeção, minibombas e aplicações tópicas. Muitos conservantes foram relatados para induzir a agregação de proteínas, embora o mecanismo subjacente não seja bem compreendido. Tem sido proposto que os conservantes se ligam e preenchem estados de proteína desdobrados que são propensos à agregação.

[0076] Vantajosamente, as composições farmacêuticas da invenção são consideradas estáveis, isto é, permanecerem livres ou substancialmente isentas de agregados proteicos mesmo quando submetidas a tensão, em particular tensão térmica, armazenamento, tensão induzida por superfície (como ciclos de congelamento/degelo, formação de espuma), concentração (por ultra e diafiltração) ou mistura com compostos orgânicos, como conservantes antimicrobianos.

Preferencialmente, as composições farmacêuticas podem ter características semelhantes ou mesmo melhoradas em comparação com as composições tendo um baixo pH que foram avaliadas nos Exemplos em anexo. As composições farmacêuticas da invenção são preferencialmente soluções homogêneas de produtos farmacêuticos à base de proteínas, tal como construtos de anticorpos biespecíficos de cadeia única monomérica dispersa com meia-vida prolongada.

[0077] Aqueles versados na técnica apreciarão que, embora a composição farmacêutica proporcione a estabilização do ingrediente ativo (isto é, reduza ou iniba a formação de agregados proteicos do construto de anticorpo de cadeia simples biespecífica) com eficácia, alguns agregados ou conformadores podem ocasionalmente formar, mas sem comprometer substancialmente a usabilidade da composição farmacêutica. Nesse contexto, "substancialmente livre" de agregados significa que a quantidade de agregados permanece inferior a 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% (p/v), também particularmente quando submetidos à tensão do ambiente, por exemplo, conforme avaliado nos Exemplos em anexo.

[0078] Os métodos para determinar a presença de agregados proteicos solúveis e insolúveis foram, inter alia, revistos por Mahler et al., *J Pharm Sci.* 2009 Sep;98(9):2909-34. A formação de agregados de proteína solúvel pode ser avaliada por cromatografia líquida de desempenho ultra elevado de exclusão de tamanho (SE-UPLC), como descrito nos Exemplos em anexo. A SEC é um dos métodos analíticos mais utilizados para a detecção e quantificação de agregados proteicos. A análise de SEC permite o dimensionamento de agregados e a

sua quantificação. Com o SEQ-UPLC, é possível a separação seletiva e rápida de macromoléculas com base em sua forma e tamanho (raio hidrodinâmico) em uma gama de peso molecular de cerca de 5-1000 kDa.

[0079] As soluções de proteínas mostram uma propriedade óptica, chamada opalescência ou turbidez. A propriedade óptica de uma solução é uma função das partículas presentes para dispersar e absorver luz. As proteínas são coloides naturais e a turbidez das formulações aquosas depende da concentração de proteínas, da presença de partículas não-dissolvidas, do tamanho das partículas e do número de partículas por unidade de volume. A turbidez pode ser medida por espectroscopia UV-Vis como a densidade óptica na gama de 340 a 360 nm e pode ser usada para detectar agregados solúveis e insolúveis.

[0080] Além disso, a inspeção de amostras por meios visuais ainda é um aspecto importante da avaliação de agregados de proteínas. A avaliação visual quanto à ausência ou presença de agregados visíveis é preferencialmente realizada de acordo com o Teste 5 do Deutscher Arzneimittel Codex (DAC).

[0081] Como estabelecido em outra parte deste documento, considera-se a composição farmacêutica da invenção - muito provavelmente pela ação de um pH baixo e opcionalmente outros agentes estabilizadores lá compreendidos - favorecendo um aumento da estabilidade coloidal dos construtos de anticorpo de cadeia única biespecíficos e, assim, exibindo uma redução ou mesmo ausência de separação líquido-fase líquida (LLPS). A LLPS é um evento conduzido em âmbito termodinâmico, em que uma solução de proteína homogênea se separa em uma fase

escassa em proteína (geralmente a camada superior) e uma fase rica em proteína (geralmente a camada inferior) com temperaturas decrescentes. A LLPS é, tipicamente, totalmente reversível, simplesmente misturando as duas fases e elevando a temperatura da solução. A ocorrência da LLPS tem sido atribuída a interações proteína-proteína atraentes de curto alcance, tornando-a uma medida da força da atração proteína-proteína. Descobriu-se que as composições farmacêuticas compreendendo as β ciclodextrinas de acordo com a invenção compreendem concentrações mais elevadas da construção de anticorpo de cadeia simples biespecífica na fase escassa em proteína de LLPS, em comparação com composições farmacêuticas que não compreendem as β ciclodextrinas. Conseqüentemente, as composições farmacêuticas da invenção são consideradas como apresentando uma LLPS reduzida ou sem LLPS em comparação com controles, promovendo assim uma estabilidade coloidal aumentada das construções de anticorpo de cadeia simples biespecíficas da presente invenção. A LLPS pode ser induzida e o teor de proteína das diferentes fases pode ser examinado conforme descrito nos Exemplos em anexo.

[0082] A tensão do ambiente também pode, em particular devido à desnaturação térmica e/ou química, levar a alterações conformacionais, que por sua vez favorecem a agregação. Surpreendentemente, os presentes inventores verificaram que as construções de anticorpos de cadeia simples biespecífica também são estabilizadas em relação às alterações conformacionais, conforme avaliadas medindo-se a intensidade da emissão de fluorescência intrínseca dos aminoácidos aromáticos. A composição farmacêutica da presente invenção, portanto, preferencialmente também reduz

ou inibe a formação de conformadores (isto é, espécies proteicas não-nativas, dobradas de forma anormal).

[0083] Como explicado anteriormente, a composição farmacêutica estável da presente invenção compreende uma construção de anticorpo de cadeia simples biespecífica, ligando-se a um antígeno de superfície da célula alvo através de um domínio de ligação e ao CD3 de antígeno de superfície de células T através de um segundo domínio de ligação.

[0084] O termo "construto de anticorpo" refere-se a uma molécula na qual a estrutura e/ou função é/são baseada(s) na estrutura e/ou função de um anticorpo, por exemplo, de uma molécula de imunoglobulina inteira ou de comprimento completo e/ou é/são desenhada(s) a partir dos domínios de cadeia leve variável (VL) de um anticorpo ou cadeia pesada variável (VH) ou seu fragmento. Um construto de anticorpo é, por conseguinte, capaz de se ligar a seu antígeno ou alvo específico. Adicionalmente, um domínio de ligação de um construto de anticorpo de acordo com a invenção compreende os requisitos estruturais mínimos de um anticorpo que permitem a ligação alvo. Este requisito mínimo pode, por exemplo, ser definido pela presença das pelo menos três CDRs de cadeias leves (isto é, CDR1, CDR2 e CDR3 da região VL) e/ou das três CDRs de cadeia pesada (isto é, CDR1, CDR2 e CDR3 da região VH), de preferência, todas as seis CDRs. Uma abordagem alternativa para definir os requisitos de estrutura mínima de um anticorpo é a definição do epítopo do anticorpo dentro da estrutura do alvo específico, respectivamente, do domínio de proteína da proteína alvo compondo a região de epítopo (aglomerado de epítopo) ou por referência a um anticorpo específico competindo com o epítopo

do anticorpo definido. Os anticorpos nos quais os construtos de acordo com a invenção são baseados incluem, por exemplo, anticorpos monoclonais, recombinantes, quiméricos, desimunizados, humanizados e humanos.

[0085] O domínio de ligação de um construto de anticorpo, de acordo com a invenção pode, por exemplo, compreender os grupos de CDR acima referidos. De preferência, esses CDRs são compreendidos na estrutura de uma região variável de cadeia leve de anticorpo (VL) e uma região variável de cadeia pesada de anticorpo (VH); no entanto, não tem que compreender ambos. Fragmentos Fd, por exemplo, têm duas regiões de VH e, com frequência, retêm alguma função de ligação a antígeno do domínio de ligação a antígeno intacto. Exemplos adicionais do formato de fragmentos de anticorpo ligação, variantes de anticorpo ou domínios de ligação incluem (1) um fragmento Fab, um fragmento monovalente tendo os domínios de VL, VH, CL e CH1; (2) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente tendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (3) um fragmento Fd tendo os dois domínios de VH e CH1; (4) um fragmento Fv tendo os domínios de VL e VH de um braço único de um anticorpo, (5) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que tem um domínio de VH; (6) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR), e (7) um Fv de cadeia única (scFv), o último sendo preferencial (por exemplo, derivado de uma biblioteca de scFV). Exemplos de modalidades de construtos de anticorpo de acordo com a invenção são, por exemplo, descritos nos documentos WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO

2014/144722, WO 2014/151910 e WO 2015/048272.

[0086] Também dentro da definição de "domínio de ligação" ou "domínio que se liga" estão fragmentos de anticorpos de comprimento total, tal como VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ ou "r IgG" ("meio anticorpo"). Os construtos de anticorpo, de acordo com a invenção, também podem compreender fragmentos modificados de anticorpos, também denominados variantes de anticorpo, como scFv, di-scFv ou bi(s)-scFv, scFv-Fc, zíper de scFv, scFab, Fab₂, Fab₃, diacorpos, diacorpos de cadeia única, diacorpos em tandem (Tandab's), di-scFv em tandem, tri-scFv em tandem, "multicorpos", tais como triacorpos ou tetracorpos, e anticorpos de domínio simples, tais como nanocorpos ou anticorpos de domínio variável simples, compreendendo apenas um domínio variável, que pode ser VHH, VH ou VL, que se liga especificamente a um antígeno ou epítipo independentemente de outras regiões ou domínios V.

[0087] Como aqui utilizado, os termos "Fv de cadeia única", "anticorpos de cadeia única" ou "scFv" referem-se a fragmentos de anticorpo de cadeia polipeptídica únicos que compreendem as regiões variáveis de ambas as cadeias pesada e leve, mas não possuem as regiões constantes. Geralmente, um anticorpo de cadeia única compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios VH e VL que permite formar a estrutura desejada que permitiria a ligação ao antígeno. Os anticorpos de cadeia única são discutidos em detalhe por Pluckthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds. Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994). Vários métodos de geração de anticorpos de cadeia única são conhecidos, incluindo aqueles descritos

em Pat US N° 4,694,778 e 5,260,203; Publicação de Pedido Internacional de Patente N° WO 88/01649; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883; Ward et al. (1989) Nature 334:54454; Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041. Em modalidades específicas, os anticorpos de cadeia única também podem ser biespecíficos, multiespecíficos, humanos, e/ou humanizados e/ou sintéticos.

[0088] Além disso, a definição do termo "construto de anticorpo" inclui construtos monovalentes, bivalentes e polivalentes/multivalentes e, assim, construtos biespecíficos, ligando-se especificamente a apenas duas estruturas antigênicas, bem como construtos poliespecíficos/multiespecíficos, que ligam especificamente a mais de duas estruturas de antígenos, por exemplo três, quatro ou mais, através de domínios de ligação distintos. Além disso, a definição do termo "construto de anticorpo" inclui moléculas que consistem em apenas uma cadeia polipeptídica, bem como moléculas que consistem em mais de uma cadeia polipeptídica, cadeias as quais que podem ser idênticas (homodímeros, homotrímeros ou homo-oligômeros) ou diferentes (heterodímero, heterotrímero ou hetero-oligômero). Exemplos para os anticorpos identificados acima e variantes ou derivados dos mesmos são descritos, *inter alia* em Harlow e Lane, Antibodies a laboratory manual, CSHL Press (1988) e Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999), Kontermann e Dübel, Antibody Engineering, Springer, 2ª ed. 2010 e Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009.

[0089] O termo "biespecífico", como aqui utilizado,

refere-se a um construto de anticorpo que é "pelo menos biespecífico", isto é, compreende pelo menos um primeiro domínio de ligação e um segundo domínio de ligação, em que o primeiro domínio de ligação se liga a um antígeno ou alvo (aqui: o antígeno da superfície da célula alvo) e o segundo domínio de ligação se liga a outro antígeno ou alvo (aqui: CD3). Conseqüentemente, construtos de anticorpo de acordo com a invenção compreendem especificidades para pelo menos dois diferentes antígenos ou alvos. Por exemplo, o primeiro domínio de preferência não se liga a um epítopo extracelular de CD3ε de uma ou mais das espécies, tal como aqui descrito. O termo "antígeno da superfície da célula alvo" refere-se a uma estrutura antigênica expressa por uma célula e que está presente na superfície da célula de tal modo que é acessível para um construto de anticorpo como descrito aqui. Pode ser uma proteína, de preferência, a porção extracelular de uma proteína, ou uma estrutura de carboidrato, de preferência, uma estrutura de carboidrato de uma proteína, tal como uma glicoproteína. É preferencialmente um antígeno tumoral. O termo "construto de anticorpo biespecífico" da invenção também abrange construtos de anticorpo multiespecíficos como construtos de anticorpo triespecíficos, estes últimos incluindo três domínios de ligação, ou construtos tendo mais que três (por exemplo, quatro, cinco...) especificidades.

[0090] Dado que os construtos de anticorpo de acordo com a invenção são (pelo menos) biespecíficos, os mesmos não ocorrem naturalmente e são marcadamente diferentes de produtos de ocorrência natural. Um construto de anticorpo ou imunoglobulina "biespecífica" é, daí, um anticorpo ou imunoglobulina híbrida artificial tendo pelo menos dois

lados de ligação distintos com diferentes especificidades. Construtos de anticorpo biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

[0091] Os pelo menos dois domínios de ligação e os domínios variáveis (VH / VL) do construto de anticorpo da presente invenção podem, ou não, compreenderem ligantes peptídicos (peptídeos espaçadores). O termo "ligante peptídico" compreende de acordo com a presente invenção uma sequência de aminoácidos pela qual as sequências de aminoácidos de um domínio (variável e/ou de ligação) e outro domínio (variável e/ou de ligação) do construto de anticorpo da invenção são ligados entre si. Os ligantes peptídicos podem também ser utilizados para fundir o terceiro domínio com os outros domínios do construto de anticorpo da invenção. Um recurso técnico essencial de tal ligante peptídico é que não compreende nenhuma atividade de polimerização. Dentre os ligantes peptídicos adequados estão aqueles descritos nas Patentes US N° 4,751,180 e 4,935,233 ou WO 88/09344. Os ligantes peptídicos também podem ser usados para fixar outros domínios ou módulos ou regiões (tais como domínios prolongadores de meia-vida) ao construto de anticorpo da invenção.

[0092] Os construtos de anticorpo da presente invenção são, de preferência, "construtos de anticorpo gerados *in vitro*". Este termo se refere a um construto de anticorpo de acordo com a definição acima onde a totalidade ou parte da região variável (por exemplo, pelo menos uma CDR) é gerada numa seleção de célula não imune, por exemplo, uma exibição

de fago *in vitro*, chip de proteína ou qualquer outro método no qual sequências candidatas podem ser testadas para sua capacidade de se ligar a um antígeno. Este termo, desta forma, de preferência, exclui sequências geradas apenas por redistribuição genômica numa célula imune num animal. Um "anticorpo recombinante" é um anticorpo feito através do uso de tecnologia de DNA recombinante ou modificação genética.

[0093] O termo "anticorpo monoclonal" (mAb) ou construto de anticorpo monoclonal conforme usado no presente documento se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto por mutações de ocorrência possivelmente natural e/ou modificações pós-tradução (por exemplo, isomerizações, amidações) que podem estar presentes em menores quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um lado antigênico simples ou determinante no antígeno, em contraste a preparações de anticorpo convencionais (policlonal) que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (ou epítomos). Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos visto que os mesmos são sintetizados pela cultura de hibridoma, por conseguinte, não contaminados por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por nenhum método particular.

[0094] Para a preparação de anticorpos monoclonais,

qualquer técnica fornecendo anticorpos produzidos por culturas de linha celular contínua pode ser usada. Por exemplo, anticorpos monoclonais a serem usados podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiro descrito por Koehler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante (consulte, por exemplo, a Patente US N° 4,816,567). Exemplos de técnicas adicionais para produzir anticorpos monoclonais humanos incluem a técnica de trioma, a técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) e a técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

[0095] Hibridomas podem ser, então, varridos usando métodos padrão, como ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) e análise por ressonância de plásmon de superfície (BIAcore™), para identificar um ou mais hibridomas que produzem um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno especificado. Qualquer forma do antígeno relevante pode ser usada como o imunogênio, por exemplo, antígeno recombinante, formas de ocorrência natural, quaisquer variantes ou fragmentos dos mesmos, bem como um peptídeo antigênico dos mesmos. A ressonância de plasmon de superfície conforme empregada no sistema BIAcore pode ser usada para aumentar a eficiência de anticorpos de fago que se ligam a um epítipo de um antígeno da superfície da célula alvo, (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

[0096] Outro método exemplificador de produção de anticorpos monoclonais inclui varrer bibliotecas de expressão de proteína, por exemplo, bibliotecas de exibição

de fago ou de exibição de ribossoma. A exibição de fago é descrita, por exemplo, em Ladner *et al.*, Patente US N° 5,223,409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

[0097] Além do uso de bibliotecas de exibição, o antígeno relevante pode ser usado para imunizar um animal não humano, por exemplo, um roedor (como um camundongo, hamster, coelho ou rato). Em uma modalidade, o animal não humano inclui pelo menos uma parte de um gene de imunoglobulina humana. Por exemplo, é possível modificar cepas de camundongo deficientes em produção de anticorpo de camundongo com grandes fragmentos dos loci de Ig (imunoglobulina) humana. Usando a tecnologia de hibridoma, anticorpos monoclonais específicos para antígeno derivados dos genes com a especificidade desejada podem ser produzidos e selecionados. Ver, por exemplo, XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096 e WO 96/33735.

[0098] Um anticorpo monoclonal também pode ser obtido de um animal não humano e, então, modificado, por exemplo, humanizado, desimunizado, quimérico renderizado, etc., usando técnicas de DNA recombinante conhecidas na técnica. Exemplos de construtos de anticorpos modificados incluem variantes humanizadas de anticorpos não humanos, anticorpos "de afinidade maturada" (ver, por exemplo, Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) e Lowman *et al.*, *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) e mutantes de anticorpo com funções efetoras alteradas (ver, por exemplo, Patente US 5,648,260, Kontermann e Dübel (2010), *loc. cit.* e Little (2009), *loc. cit.*).

[0099] Em imunologia, a maturação de afinidade é o processo pelo qual células B produzem anticorpos com afinidade aumentada para antígeno durante o curso de uma imunorresposta. Com exposições repetidas ao mesmo antígeno, um hospedeiro produzirá anticorpos de afinidades sucessivamente maiores. Como o protótipo natural, a maturação de afinidade *in vitro* é baseada nos princípios de mutação e seleção. A maturação de afinidade *in vitro* vem sendo usada com sucesso para otimizar anticorpos, construídos de anticorpo e fragmentos de anticorpo. Mutações aleatórias dentro das CDRs são introduzidas usando radiação, mutagênese química ou PCR inclinada ao erro. Além disso, a diversidade genética pode ser aumentada por embaralhamento de cadeia. Dois ou ciclos de mutação e seleção usando os métodos de exibição como exibição de fago usualmente resultam em fragmentos de anticorpo com afinidades na baixa faixa nanomolar.

[00100] Um tipo preferencial de uma variação de substituição de aminoácido dos construídos de anticorpo envolve substituir um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Em geral, a variante resultante (ou variantes) selecionada para desenvolvimento adicional terá propriedades biológicas aprimoradas em relação ao anticorpo parental a partir do qual as mesmas foram geradas. Uma forma conveniente para tais variantes substitucionais envolve a maturação de afinidade usando exibição de fago. Em suma, diversos lados de região hipervariável (por exemplo, lados 6 a 7) são mutados para gerar todas as substituições de aminoácido possíveis em cada

lado. As variantes de anticorpo geradas deste modo são exibidas de uma forma monovalente de partículas de fago filamentosas como fusões ao produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As variantes de fago exibido são, então, varridas para sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) como divulgado no presente documento. A fim de identificar lados de região hipervariável candidatos para modificação, a mutagênese por varredura de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de região hipervariável contribuindo significativamente para a ligação de antígeno. Alternativa ou adicionalmente, pode ser benéfico para analisar uma estrutura de cristal do complexo de antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o domínio de ligação e, por exemplo, antígeno da superfície da célula alvo humano. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas no presente documento. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido à varredura conforme descrito no presente documento e anticorpos com propriedades superiores num ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

[00101] Os anticorpos monoclonais e construtos de anticorpo da presente invenção especificamente incluem anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados a partir de uma espécie particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o resto da(s) cadeia(s) é idêntico a ou homólogo a sequências

correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que as mesmas exibam a atividade biológica desejada (Patente US N° 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81: 6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse no presente documento incluem anticorpos "primatizados" compreendendo sequências de ligação a antígeno de domínio variável derivadas a partir de um primata não humano (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, Símio, etc.) e sequências de região constante humana. Uma variedade de abordagens para produzir anticorpos quiméricos foi descrita. Ver, por exemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., Patente US N° 4,816,567; Boss et al., Patente US N° 4,816,397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494; e GB 2177096.

[00102] Um anticorpo, construto de anticorpo, fragmento de anticorpo ou variante de anticorpo também pode ser modificado por deleção específico de epítomos de célula T humana (um método chamado "desimunização") pelos métodos divulgados, por exemplo, em WO 98/52976 ou WO 00/34317. Em suma, os domínios variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo podem ser analisados para peptídeos que se ligam à classe II de MHC; estes peptídeos representam epítomos de célula T em potencial (conforme definido em WO 98/52976 e WO 00/34317). Para a detecção de epítomos de célula T em potencial, uma abordagem de modelagem por computador denominada "encadeamento de peptídeo" pode ser aplicada e, além disto, um banco de dados de peptídeos de ligação de

classe II de MHC humano pode ser pesquisada para motivos presentes nas sequências de VH e VL, conforme descrito em WO 98/52976 e WO 00/34317. Estes motivos se ligam a qualquer um dos 18 alótipos de DR de major classe II de MHC principais e, deste modo, constituem epítomos de célula T em potencial. Epítomos de célula T em potencial detectados podem ser eliminados substituindo pequenos números de resíduos de aminoácido nos domínios variáveis ou, de preferência, por substituições de aminoácido simples. Tipicamente, são feitas substituições conservativas. Com frequência, mas não exclusivamente, um aminoácido comum a uma posição nas sequências de anticorpo de linha germinativa humana pode ser usado. Sequências de linha germinativa humana são divulgadas, por exemplo, em Tomlinson, *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G.P. *et al.* (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; e Tomlinson *et al.* (1995) *EMBO J.* 14: 14:4628-4638. O diretório V BASE fornece um diretório abrangente de sequências de região variável de imunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, LA. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, RU). Estas sequências podem ser usadas como uma fonte de sequência humana, por exemplo, para regiões estruturais e CDRs. Regiões estruturais humanas consenso também podem ser usadas, por exemplo, conforme descrito na Patente US N° 6,300,064.

i. Anticorpos "humanizados", construídos de anticorpo, variantes ou fragmentos dos mesmos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação a antígeno de anticorpos) são anticorpos ou imunoglobulinas de sequências principalmente humanas, que contêm (a) sequência mínima (ou sequências) derivada de imunoglobulina não humana. Para a

maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região hipervariável (também CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (por exemplo, roedor) (anticorpo doador) como camundongo, rato, hamster ou coelho tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos de região estrutural (FR) de Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Adicionalmente, "anticorpos humanizados" conforme usado no presente documento também podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente tampouco no anticorpo de doador. Estas modificações são feitas para refinar e otimizar adicionalmente o desempenho de anticorpo. O anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[00103] Anticorpos humanizados ou fragmentos dos mesmos podem ser gerados substituindo sequências do domínio variável de Fv que não estão diretamente envolvidos na ligação a antígeno por sequências equivalentes de domínios variáveis de Fv humano. Métodos exemplificativos para gerar anticorpos humanizados ou seus fragmentos são fornecidos por Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; por Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; e por US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; e US 6,407,213. Aqueles métodos incluem isolar, manipular e expressar as sequências de ácido

nucleico que codificam a totalidade ou parte de domínios variáveis de Fv de imunoglobulina de pelo menos uma dentre uma cadeia pesada ou leve. Tais ácidos nucleicos podem ser obtidos de um hibridoma produzindo um anticorpo contra alvo predeterminado, conforme descrito acima, bem como de outras fontes. O DNA recombinante que codifica a molécula de anticorpo humanizado pode ser, então, clonado formando um vetor de expressão apropriado.

[00104] Anticorpos humanizados também podem ser produzidos usando animais transgênicos como camundongos que expressam genes de cadeia pesada e leve humana, mas são incapazes de expressar os genes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina de camundongo endógeno. Winter descreve um método de enxerto de CDR exemplificador que pode ser usado para preparar os anticorpos humanizados descritos no presente documento (Patente US N° 5,225,539). Todas as CDRs de um anticorpo humano particular podem ser substituídas por pelo menos uma porção de uma CDR não humana, ou apenas algumas das CDRs podem ser substituídas por CDRs não humanas. É apenas necessário substituir o número de CDRs exigido para a ligação do anticorpo humanizado a um antígeno predeterminado.

[00105] Um anticorpo humanizado pode ser otimizado pela introdução de substituições conservativas, substituições de sequência consenso, substituições de linha germinativa e/ou retromutações. Tais moléculas de imunoglobulina alteradas podem ser produzidas por qualquer uma de diversas técnicas conhecidas na arte, (por exemplo, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth.

Enzymol., 92: 3-16, 1982, e EP 239 400).

[00106] O termo "anticorpo humano", "construto de anticorpo humano" e "domínio de ligação humano" inclui anticorpos, construtos de anticorpo e domínios de ligação tendo regiões de anticorpo como regiões ou domínios variáveis ou constantes que correspondem substancialmente a sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana conhecidas na técnica, incluindo, por exemplo, aquelas descritas por Kabat *et al.* (1991) (*loc. cit.*). Os anticorpos humanos, construtos de anticorpo ou domínios de ligação da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou lado-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs e, em particular, em CDR3. Os anticorpos humanos, construtos de anticorpo ou domínios de ligação podem ter pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco ou mais posições substituídas por um resíduo de aminoácido que não é codificado pela sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana. A definição de anticorpos humanos, construtos de anticorpo e domínios de ligação conforme aqui usado, no entanto, também contempla "anticorpos totalmente humanos", que incluem apenas sequências humanas não artificial e/ou geneticamente alteradas de anticorpos visto que as mesmas podem ser derivadas usando tecnologias ou sistemas como o *Xenomouse*. De preferência, um "anticorpo totalmente humano" não inclui resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana.

[00107] Em algumas modalidades, os construtos de

anticorpo da invenção são construtos de anticorpo "isolados" ou "substancialmente puros". "Isolado" ou "substancialmente puro" quando usados para descrever os construtos de anticorpo divulgados no presente documento significa um construto de anticorpo que foi identificado, separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente de produção. De preferência, o construto de anticorpo é livre ou substancialmente livre de associação com todos os outros componentes de seu ambiente de produção. Componentes contaminantes de seu ambiente de produção, como aqueles que resultam de células transfectadas recombinantes, são materiais que tipicamente interfeririam no diagnóstico ou usos terapêuticos para o polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Os construtos de anticorpo podem, por exemplo, constituir pelo menos cerca de 5%, ou pelo menos cerca de 50% em peso da proteína total numa dada amostra. Compreende-se que a proteína isolada pode constituir de 5% a 99,9% em peso do teor de proteína total, dependendo das circunstâncias. O polipeptídeo pode ser produzido a uma concentração significativamente maior através do uso de um promotor induzível ou promotor de alta expressão, de tal modo que seja feito a níveis de concentração aumentada. A definição inclui a produção de um construto de anticorpo numa ampla variedade de organismos e/ou células hospedeiras que são conhecidas na técnica. Em modalidades preferenciais, o construto de anticorpo será purificado (1) a um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de terminal N ou sequência de aminoácido interno pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (2) até homogeneidade por SDS-PAGE condições não redutoras ou

reduzidas usando mancha azul Coomassie ou, de preferência, prata. Normalmente, entretanto, um construto de anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[00108] O termo "domínio de ligação" caracteriza em conjunto com a presente invenção um domínio que (especificamente) se liga a/interage com/ reconhece um dado epítopo-alvo ou um dado lado-alvo nas moléculas-alvo (antígenos), por exemplo, CD33 e CD3, respectivamente. A estrutura e função do primeiro domínio de ligação (reconhecendo, por exemplo, CD33), e de preferência também a estrutura e/ou função do segundo domínio de ligação (reconhecendo CD3), é/são baseada(s) na estrutura e/ou função de um anticorpo, por exemplo, de uma molécula de imunoglobulina inteira ou de comprimento completo e/ou é/são desenhada(s) a partir dos domínios de cadeia leve variável (VL) de um anticorpo ou cadeia pesada variável (VH) ou seu fragmento. Preferencialmente, o primeiro domínio de ligação é caracterizado pela presença de três CDRs de cadeia leve (isto é, CDR1, CDR2 e CDR3 da região VL) e/ou três CDRs de cadeia pesada (isto é, CDR1, CDR2 e CDR3 da região VH). O segundo domínio de ligação, de preferência, também compreende os requisitos estruturais mínimos de um anticorpo que permitem a ligação-alvo. Com mais preferência, o segundo domínio de ligação compreende pelo menos três CDRs de cadeia leve (isto é, CDR1, CDR2 e CDR3 da região VL) e/ou três CDRs de cadeia pesada (isto é, CDR1, CDR2 e CDR3 da região VH). Prevê-se que o primeiro e/ou segundo domínio de ligação é produzido por ou obtível por métodos de exibição de fago ou de varredura de biblioteca ao invés de enxertar sequências

de CDR de um anticorpo (monoclonal) pré-existente num arcabouço.

[00109] De acordo com a presente invenção, domínios de ligação estão sob a forma de um ou mais polipeptídeos. Tais polipeptídeos podem incluir partes proteínáceas e partes não proteínáceas (por exemplo, ligantes químicos ou agente de reticulação químicos como glutaraldeído). Proteínas (incluindo fragmentos das mesmas, de preferência, fragmentos biologicamente ativos e peptídeos, usualmente tendo menos que 30 aminoácidos) compreendem dois ou mais aminoácidos acoplados entre si através de uma ligação peptídica covalente (resultando numa cadeia de aminoácidos).

[00110] O termo "polipeptídeo" conforme usado no presente documento descreve um grupo de moléculas, que geralmente consistem em mais de 30 aminoácidos. Polipeptídeos podem, ainda, formar multímeros como dímeros, trímeros e oligômeros superiores, isto é, consistindo em mais de uma molécula de polipeptídeo. Moléculas de polipeptídeo formando tais dímeros, trímeros, etc. podem ser idênticas ou não idênticas. As estruturas de ordem maior correspondentes de tais multímeros são, conseqüentemente, denominadas homo ou heterodímeros, homo ou heterotrímeros, etc. Um exemplo para um heteromultímero é uma molécula de anticorpo, que, em sua forma de ocorrência natural, consiste em duas cadeias de polipeptídeo leve idênticas e duas cadeias de polipeptídeo pesado idênticas. Os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" também se referem a peptídeos/polipeptídeos/proteínas naturalmente modificados, em que a modificação é efetuada, por exemplo, por modificações pós-translacionais como glicosilação,

acetilação, fosforilação e similares. Um "peptídeo", "polipeptídeo" ou "proteína" quando referido no presente documento também pode ser quimicamente modificado como peguilado. Tais modificações são bem conhecidas na técnica e descritas no presente documento abaixo.

[00111] De preferência, o domínio de ligação que se liga ao antígeno da superfície da célula alvo e/ou o domínio de ligação que se liga a CD3ε é domínio de ligação humano. Anticorpos e construtos de anticorpo compreendendo pelo menos um domínio de ligação humano evitam alguns dos problemas associados a anticorpos ou construtos de anticorpo que possuem regiões variáveis e/ou constantes não humanas como roedor (por exemplo, murino, rato, hamster ou coelho). A presença de tais proteínas derivadas de roedor pode levar à absorção rápida dos anticorpos ou construtos de anticorpo ou pode levar à geração de uma imunorresposta contra o anticorpo ou construto de anticorpo por um paciente. A fim de evitar o uso de anticorpos ou construtos de anticorpo derivados de roedor, anticorpos/construtos de anticorpo humanos ou totalmente humanos podem ser gerados através da introdução de função de anticorpo humano num roedor de modo que o roedor produza anticorpos totalmente humanos.

[00112] A capacidade de clonar e reconstruir loci humanos com tamanho de megabase em YACs e de introduzir os mesmos na linha germinativa de camundongo fornece uma potente abordagem para elucidar os componentes funcionais de loci muito grandes ou grosseiramente mapeado bem como gerar modelos úteis de doença humana. Ademais, o uso de tal tecnologia para substituição de loci de camundongo por seus equivalentes humanos forneceria intuições exclusivas na

expressão e regulação de produtos de gene humano durante desenvolvimento, sua comunicação com outros sistemas e seu envolvimento na indução e progressão de doença.

[00113] Uma aplicação prática importante de tal estratégia é a "humanização" do sistema de imunidade humoral de camundongo. A introdução de loci de imunoglobulina humana (Ig) em camundongos nos quais os genes de Ig endógeno foram inativados oferece a oportunidade de estudar os mecanismos básicos para expressão programada e conjunto de anticorpos bem como seu papel no desenvolvimento de célula B. Ademais, tal estratégia forneceria uma fonte ideal para a produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos (mAbs) - um marco importante para o cumprimento da promessa de terapia de anticorpo em doença humana. Espera-se que anticorpos ou construtos de anticorpo totalmente humanos minimizem as respostas alérgica e imunogênica intrínsecas a mAbs derivadas de camundongo ou camundongo e, deste modo, aumentem a eficácia e a segurança dos anticorpos/construtos de anticorpo administrados. Pode-se esperar que o uso de anticorpos ou construtos de anticorpo totalmente humanos forneça uma vantagem substancial no tratamento de doenças humanas crônicas e recorrentes, como inflamação, autoimunidade e câncer, que exigem administrações repetidas de composto.

[00114] Uma abordagem para este objetivo era modificar cepas de camundongo deficientes em produção de anticorpo de camundongo com grandes fragmentos dos loci de Ig humano na expectativa de que tais camundongos produziram um grande repertório de anticorpos humanos na ausência de anticorpos de camundongo. Grandes fragmentos de Ig humano preservariam

a grande diversidade de gene variável bem como a regulação apropriada de produção e expressão de anticorpo. Explorando o maquinário de camundongo para diversificação e seleção de anticorpo e a carência de tolerância imunológica a proteínas humanas, o repertório de anticorpo humano reproduzido nestas cepas de camundongo renderia anticorpos de alta afinidade contra qualquer antígeno de interesse, incluindo antígenos humanos. Usando tecnologia de hibridoma, mAbs humanos específicos de antígeno com a especificidade desejada poderiam ser prontamente produzidos e selecionados. Esta estratégia geral foi demonstrada em conjunto com a geração das primeiras cepas de camundongo XenoMouse (consulte Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)). As cepas de XenoMouse foram modificadas com cromossomas artificiais de levedura (YACs) contendo fragmentos de configuração de linha germinativa com 245 kb e 190 kb de tamanho do locus de cadeia pesada humana e locus de cadeia leve kappa, respectivamente, que continha sequências de região variável e constante de núcleo. As YACs contendo Ig humana se provaram compatíveis com o sistema de camundongo tanto para redistribuição como expressão de anticorpos e foram capazes de substituir os genes de Ig de camundongo inativados. Isto foi demonstrado por sua capacidade de induzir desenvolvimento de célula B, de produzir repertório humano tipo adulto de anticorpos totalmente humanos, e de gerar mAbs humanos específicos de antígeno. Estes resultados também sugeriram que a introdução de maiores porções dos loci de Ig humano contendo números maiores de genes V, elementos reguladores adicionais e regiões constantes de Ig humano podem recapitular substancialmente todo o repertório que é característico da

resposta humoral humana à infecção e imunização. O trabalho de Green et al. foi recentemente estendido à introdução de mais de aproximadamente 80% do repertório de anticorpo humano através da introdução de fragmentos de YAC de configuração de linha germinativa com tamanho de megabase dos loci de cadeia pesada humana e loci de cadeia leve kappa, respectivamente. Ver Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997) e pedido de patente US N° 08/759,620.

[00115] A produção dos camundongos XenoMouse é adicionalmente discutida e delineada nos pedidos de patente US N° 07/466,008, 07/610,515, 07/919,297, 07/922,649, 08/031,801, 08/112,848, 08/234,145, 08/376,279, 08/430,938, 08/464,584, 08/464,582, 08/463,191, 08/462,837, 08/486,853, 08/486,857, 08/486,859, 08/462,513, 08/724,752 e 08/759,620; e Patente US N° 6,162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181, e 5,939,598 e Patentes JP N° 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, e 3 068 507 B2. Ver também Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997) e Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 e WO 03/47336.

[00116] Em uma abordagem alternativa, outros, incluindo GenPharm International, Inc., utilizaram uma abordagem de "minilocus". Na abordagem de minilocus, um locus de Ig exógeno é simulado através da inclusão de pedaços (genes individuais) do locus de Ig. Deste modo, um ou mais genes de VH, um ou mais genes de DH, um ou mais genes de JH, uma região constante de mu, e uma segunda região constante (de preferência, uma região constante gama) são formados num construto para inserção num animal. Esta abordagem é descrita na Patente US N° 5,545,807 por Surani et al. e Pat US. N°

5,545,806; 5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; 5,770,429; 5,789,650; 5,814,318; 5,877,397; 5,874,299; e 6,255,458 cada uma por Lonberg e Kay, Pat. US N° 5,591,669 e 6,023.010 por Krimpenfort e Berns, Pat. US N° 5,612,205; 5,721,367; e 5,789,215 por Berns *et al.*, e Pat. US N° 5,643,763 por Choi e Dunn, e pedidos de patente da GenPharm International US N° 07/574,748, N° 07/575,962, N° 07/810,279, N° 07/853,408, N° 07/904,068, N° 07/990,860, N° 08/053,131, N° 08/096,762, N° 08/155,301, N° 08/161,739, N° 08/165,699, N° 08/209,741. Ver também EP 0 546 073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 e WO 98/24884 e Patente US N° 5,981,175. Ver ainda Taylor *et al.* (1992), Chen *et al.* (1993), Tuailon *et al.* (1993), Choi *et al.* (1993), Lonberg *et al.* (1994), Taylor *et al.* (1994), e Tuailon *et al.* (1995), Fishwild *et al.* (1996).

[00117] Kirin também demonstrou a geração de anticorpos humanos de camundongos em que, através de fusão microcelular, grandes pedaços de cromossomos, ou cromossomos inteiros, foram introduzidos. Consulte os Pedidos de Patente EP N° 773 288 e 843 961. Xenerex Biosciences está desenvolvendo uma tecnologia para a geração potencial de anticorpos humanos. Nesta tecnologia, camundongos SCID são reconstituídos com células linfáticas humanas, por exemplo, células B e/ou T. Os camundongos são, então, imunizados com um antígeno e podem gerar uma imunorresposta contra o antígeno. Consulte as Patentes US N° 5,476,996; 5,698,767; e 5,958,765.

[00118] As respostas de anticorpo anticamundongo humano (HAMA) conduziram a indústria ao preparo de anticorpos

quiméricos ou anticorpos de outro modo humanizados. Espera-se, entretanto, que certas respostas de anticorpo anti-quimérico humano (HACA) sejam observadas, particularmente em utilizações crônicas ou de múltiplas doses do anticorpo. Deste modo, seria desejável fornecer construtos de anticorpo compreendendo um domínio de ligação humano contra antígeno da superfície da célula alvo e um domínio de ligação humano contra CD3ε a fim de invalidar preocupações e/ou efeitos de resposta de HAMA ou HACA.

[00119] Os termos "(especificamente) se liga a", "(especificamente) reconhece", "é (especificamente) direcionado para" e "(especificamente) reage com" significam, de acordo com esta invenção, que um domínio de ligação interage ou especificamente interage com um dado epítopo ou um dado lado-alvo nas moléculas-alvo (antígenos), aqui: antígeno da superfície da célula alvo e CD3ε, respectivamente.

[00120] O termo "epítopo" se refere a um lado num antígeno ao qual um domínio de ligação, tal como um anticorpo ou imunoglobulina, ou um derivado, fragmento ou variante de um anticorpo ou uma imunoglobulina, especificamente se liga. Um "epítopo" é antigênico e, deste modo, o termo epítopo é, às vezes, também chamado no presente documento de "estrutura antigênica" ou "determinante antigênico". Deste modo, o domínio de ligação é um "lado de interação de antígeno". Também é entendido que a referida ligação/interação define um "reconhecimento específico".

i. "Epítopos" podem ser formados por aminoácidos contíguos ou não contíguos justapostos pela dobra terciária de uma proteína. Um "epítopo linear" é um epítopo em que uma

sequência primária de aminoácidos compreende o epítopo reconhecido. Um epítopo linear tipicamente inclui pelo menos 3 ou pelo menos 4, e mais usualmente, pelo menos 5 ou pelo menos 6 ou pelo menos 7, por exemplo, cerca de 8 a cerca de 10 aminoácidos numa sequência exclusiva.

[00121] Um "epítopo conformacional", ao contrário de um epítopo linear, é um epítopo em que a sequência primária dos aminoácidos compreendendo o epítopo não é o único componente definidor epítopo reconhecido (por exemplo, um epítopo em que a sequência primária de aminoácidos não é necessariamente reconhecida pelo domínio de ligação). Tipicamente, um epítopo conformacional compreende um número aumentado de aminoácidos em relação a um epítopo linear. Em relação ao reconhecimento de epítopos conformacionais, o domínio de ligação reconhece uma estrutura tridimensional do antígeno, de preferência, um peptídeo ou proteína ou fragmento do mesmo (no contexto da presente invenção, a estrutura antigênica para um dos domínios de ligação está compreendida dentro da proteína do antígeno da superfície da célula alvo). Por exemplo, quando uma molécula de proteína se dobra para formar uma estrutura tridimensional, certos aminoácidos e/ou a estrutura principal de polipeptídeo formando o epítopo conformacional se tornam justapostos, permitindo que o anticorpo reconheça o epítopo. Métodos de determinação da conformação de epítopos incluem, sem limitação, cristalografia de raios X, espectroscopia por ressonância magnética nuclear bidimensional (2D-NMR) e espectroscopia por etiquetagem giratória sítio-direcionada e por ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

[00122] Um método para mapeamento de epítopo é descrito

a seguir: Quando uma região (uma extensão de aminoácido contíguo) na proteína do antígeno da superfície da célula alvo humana é trocada/substituída por sua região correspondente de um antígeno da superfície da célula alvo não humano ou não primata (por exemplo, antígeno da superfície da célula alvo de camundongo, mas outros como galinha, rato, hamster, coelho, etc. também podem ser concebíveis), é esperada a ocorrência de uma diminuição na ligação do domínio de ligação, exceto se o domínio de ligação for de reação cruzada para o antígeno da superfície da célula alvo não humano, não primata usado. A referida diminuição é, de preferência, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40% ou 50%; com mais preferência pelo menos 60%, 70% ou 80%, e com máxima preferência 90%, 95% ou mesmo 100% em comparação com a ligação com a respectiva região na proteína de antígeno da superfície da célula alvo humana, em que a ligação à respectiva região na proteína de antígeno da superfície da célula alvo humana é definida em 100%. É previsto que as quimeras de antígeno da superfície da célula alvo humano/antígeno da superfície da célula alvo não humano mencionadas acima são expressas em células de CHO. É previsto também que as quimeras de antígeno da superfície da célula alvo humano/antígeno da superfície da célula alvo não humano são fundidas com um domínio transmembranar e/ou domínio citoplásmico de uma proteína ligada à membrana diferente como EpCAM.

[00123] Em um método alternativo ou adicional para mapeamento de epítipo, diversas versões truncadas do domínio extracelular de antígeno da superfície da célula alvo humano podem ser geradas a fim de determinar uma região específica

que é reconhecida por um domínio de ligação. Nestas versões truncadas, os diferentes domínios/subdomínios ou regiões de antígeno da superfície da célula alvo extracelular são deletados gradualmente, iniciando do terminal N. É previsto que as versões de antígeno da superfície da célula alvo truncadas podem ser expressas em células de CHO. É previsto também que as versões de antígeno da superfície da célula alvo truncadas podem ser fundidas com um domínio transmembranar e/ou domínio citoplasmático de uma proteína ligada à membrana diferente como EpCAM. É previsto também que as versões de antígeno da superfície da célula alvo truncadas abrangem um domínio de peptídeo de sinalização em seus N-terminais, por exemplo, um peptídeo de sinalização derivado de peptídeo de sinalização de cadeia pesada de IgG de camundongo. É adicionalmente previsto que as versões de antígeno da superfície da célula alvo truncadas abrangem um domínio v5 sem seus N-terminais (seguindo o peptídeo de sinalização) o que permite verificar sua expressão correta na superfície de célula. É esperada a ocorrência de uma diminuição ou uma perda de ligação com quais versões de antígeno da superfície da célula alvo truncadas que não abrangem nenhuma outra região de antígeno da superfície da célula alvo que é reconhecida pelo domínio de ligação. A diminuição da ligação é, de preferência, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; com mais preferência, pelo menos 60%, 70%, 80%, e com máxima preferência, 90%, 95% ou mesmo 100%, em que a ligação à totalidade da proteína de antígeno da superfície da célula alvo humana (ou sua região ou domínio extracelular) é ajustada em 100.

[00124] Um método adicional para determinar a

contribuição de um resíduo específico de um antígeno da superfície da célula alvo para o reconhecimento por um construto de anticorpo ou domínio de ligação é varredura de alanina (ver por exemplo, Morrison KL & Weiss GA. *Curr Opin Chem Biol.* Jun 2001;5(3):302-7), em que cada resíduo a ser analisado é substituído por alanina, por exemplo, através de mutagênese sítio-direcionada. A alanina é usada devido a seu grupo funcional metila quimicamente inerte não volumoso que, todavia, imita as referências de estrutura secundária que muitos dos outros aminoácidos possuem. Às vezes, aminoácidos volumosos como valina ou leucina podem ser usados em casos em que a conservação do tamanho de resíduos mutados é desejada. A varredura de alanina é uma tecnologia madura que foi usada por um longo período de tempo.

[00125] A interação entre o domínio de ligação e o epítopo ou a região que compreende o epítopo implica que um domínio de ligação apresenta afinidade apreciável para o epítopo / a região que compreende o epítopo de uma proteína ou antígeno particular (aqui: antígeno de superfície da célula alvo e CD3, respectivamente) e, geralmente, não apresenta reatividade significativa com proteínas ou outros antígenos do que o antígeno da superfície da célula alvo ou CD3. "Afinidade apreciável" inclui ligação com uma afinidade de cerca de 10^{-6} M (KD) ou mais forte. De preferência, a ligação é considerada específica quando a afinidade de ligação é de cerca de 10^{-12} a 10^{-8} M, 10^{-12} a 10^{-9} M, 10^{-12} a 10^{-10} M, 10^{-11} a 10^{-8} M, de preferência de cerca de 10^{-11} a 10^{-9} M. Se um domínio de ligação especificamente reage com ou se liga a um alvo pode ser testado prontamente, *inter alia*, comparando a reação do referido domínio de ligação com uma

proteína ou antígeno-alvo com a reação do referido domínio de ligação com proteínas ou antígenos além de antígeno da superfície da célula alvo ou CD3. De preferência, um domínio de ligação da invenção não se liga essencial ou substancialmente a proteínas ou antígenos além de antígeno da superfície da célula alvo ou CD3 (isto é, o primeiro domínio de ligação não é capaz de se ligar a proteínas além de antígeno da superfície da célula alvo e o segundo domínio de ligação não é capaz de se ligar a proteínas além de CD3). É uma característica prevista dos construtos de anticorpo, de acordo com a presente invenção, ter características de afinidade superiores em comparação com outros formatos de HLE. Tal afinidade superior, em consequência, sugere uma meia-vida prolongada in vivo. A meia-vida mais longa dos construtos de anticorpo de acordo com a presente invenção pode reduzir a duração e a frequência da administração, o que tipicamente contribui para uma melhor condição do paciente. Isto é de particular importância, uma vez que os construtos de anticorpo da presente invenção são particularmente benéficas para pacientes com cancro altamente enfraquecidos ou mesmo multimórbidos.

[00126] O termo "não se liga essencial/substancialmente" ou "não é capaz de ligação" significa que um domínio de ligação da presente invenção não se liga a uma proteína ou antígeno além de antígeno da superfície da célula alvo ou CD3, isto é, não mostra reatividade maior que 30%, de preferência, não maior que 20%, com mais preferência não maior que 10%, particularmente, de preferência, não maior que 9%, 8%, 7%, 6% ou 5% com proteínas ou antígenos além de antígeno da superfície da célula alvo ou CD3, em que a

ligação a antígeno da superfície da célula alvo ou CD3, respectivamente, é definida como 100%.

[00127] Acredita-se que a ligação específica seja efetuada por motivos específicos na sequência de aminoácidos do domínio de ligação e do antígeno. Deste modo, a ligação é alcançada como um resultado de sua estrutura primária, secundária e/ou terciária bem como o resultado de modificações secundárias das referidas estruturas. A interação específica do lado de interação de antígeno com seu antígeno específico pode resultar numa ligação simples do referido lado ao antígeno. Ademais, a interação específica do lado de interação de antígeno com seu antígeno específico pode alternativa ou adicionalmente resultar na iniciação de um sinal, por exemplo, devido à indução de uma mudança da conformação do antígeno, uma oligomerização do antígeno, etc.

[00128] O termo "variável" refere-se às porções do anticorpo ou domínios de imunoglobulina que apresentam uma variabilidade na sua sequência e que estão envolvidos na determinação da especificidade e da afinidade de ligação de um anticorpo em particular (isto é, o(s) "domínio(s) variável(is)"). O emparelhamento de uma cadeia pesada variável (VH) e uma cadeia leve variável (VL) juntas forma um lado de ligação a antígeno único.

[00129] A variabilidade não é uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis de anticorpos; é concentrada em subdomínios de cada uma dentre as regiões variáveis de cadeia pesada e leve. Estes subdomínios são chamados de "regiões hipervariáveis" ou "regiões determinantes de complementaridade" (CDRs). As porções mais conservadas (isto

é, não hipervariáveis) dos domínios variáveis são chamadas de regiões "estruturais" (FRM ou FR) e fornecem um arcabouço para as seis CDRs no espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação a antígeno. Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve de ocorrência natural compreendem, cada um, quatro regiões FRM (FR1, FR2, FR3 e FR4), amplamente adotando uma configuração de β -lâmina, conectada por três regiões hipervariáveis, que formam laços conectando e, em alguns casos, fazendo parte, da estrutura de β -lâmina. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade adjacente pela FRM e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do lado de ligação a antígeno (ver Kabat *et al.*, *loc. cit.*).

[00130] Os termos "CDR", e seu plural "CDRs", se referem à região determinante de complementaridade da qual três constituem o caráter ligante de uma região variável de cadeia leve (CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3) e três constituem o caráter ligante de uma região variável de cadeia pesada (CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3). CDRs contêm a maioria dos resíduos responsáveis por interações específicas do anticorpo com o antígeno e, daí, contribuem para a atividade funcional de uma molécula de anticorpo: as mesmas são os principais determinantes de especificidade de antígeno.

[00131] Os exatos e comprimentos e limites de CDR definidores são submetidos à sistemas de clarificação e numeração diferentes. CDRs podem, portanto, ser referidas por Kabat, Chothia, contato ou qualquer outra definições de limite, incluindo o sistema de numeração descrito no presente documento. Apesar dos diferentes limites, cada um desses sistemas tem algum grau de sobreposição no que constitui as

chamadas "regiões hipervariáveis" dentro das sequências variáveis. Definições de CDR de acordo com estes sistemas podem, portanto, diferir em comprimento e áreas de limite em relação à região estrutural adjacente. Ver, por exemplo, Kabat (uma abordagem baseada em variabilidade de sequência entre espécies), Chothia (uma abordagem baseada em estudos cristalográficos de complexos de antígeno-anticorpo) e/ou MacCallum (Kabat *et al.*, *loc. cit.*; Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917; e MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Ainda outro padrão para caracterizar o lado de ligação a antígeno é a definição de AbM usada pelo software de modelagem de anticorpo AbM da Oxford Molecular. Ver, por exemplo, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. Em: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. e Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Na medida em que duas técnicas de identificação de resíduo definem regiões de sobreposição, mas não regiões idênticas, as mesmas podem ser combinadas para definir uma CDR híbrida. Entretanto, a numeração de acordo com o denominado sistema de Kabat é preferencial.

[00132] Tipicamente, CDRs formam uma estrutura de laço que pode ser classificada como uma estrutura canônica. O termo "estrutura canônica" refere-se à conformação da cadeia principal que é adotada pelos loops de ligação ao antígeno (CDR). A partir de estudos estruturais comparativos, foi constatado que cinco dos seis laços de ligação a antígeno têm apenas um limitado repertório de conformações disponíveis. Cada estrutura canônica pode ser caracterizada pelos ângulos de torção da estrutura principal de polipeptídeo. Laços correspondentes entre anticorpos podem,

portanto, ter muito similar estruturas tridimensionais, apesar de alta variabilidade de sequência de aminoácidos na maioria das partes dos laços (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, *Nature* (1989) 342: 877; Martin e Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Ademais, existe uma relação entre a estrutura de laço adotada e das sequências de aminoácidos circundando a mesma. A conformação de uma classe canônica particular é determinada pelo comprimento do laço e pelos resíduos de aminoácido residindo em posições-chave no laço, bem como na estrutura conservada (isto é, fora do laço). A atribuição a uma classe canônica particular pode, portanto, ser feita com base na presença destes resíduos-chave de aminoácido.

[00133] O termo "estrutura canônica" também pode incluir considerações em relação à sequência linear do anticorpo, por exemplo, conforme catalogado por Kabat (Kabat *et al.*, loc. cit.). O esquema (sistema) de numeração de Kabat é um padrão amplamente adotado para numerar os resíduos de aminoácido de um domínio variável de anticorpo de maneira consistente e é o esquema preferencial aplicado na presente invenção conforme também mencionado em outro lugar no presente documento. Considerações estruturais adicionais também podem ser usadas para determinar a estrutura canônica de um anticorpo. Por exemplo, aquelas diferenças não totalmente refletidas pela numeração de Kabat podem ser descritas pelo sistema de numeração de Chothia *et al.* e/ou reveladas por outras técnicas, por exemplo, cristalografia e modelagem computacional bio ou tridimensional. Conseqüentemente, uma dada sequência de anticorpos pode ser colocada numa classe canônica que permite, dentre outras

coisas, identificar sequências de chassi apropriadas (por exemplo, com base num desejo de incluir uma variedade de estruturas canônicas numa biblioteca). A numeração de Kabat de sequências de aminoácidos de anticorpo e considerações estruturais conforme descrito por Chothia *et al.*, *loc. cit.* e suas implicações para interpretar aspectos canônicos de estrutura de anticorpo, são descritos na literatura. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas na técnica. Para uma análise da estrutura de anticorpo, ver *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988.

[00134] A CDR3 da cadeia leve e, particularmente, a CDR3 da cadeia pesada podem constituir os determinantes mais importantes na ligação a antígeno nas regiões variáveis de cadeia leve e pesada. Em alguns construtos de anticorpo, a CDR3 de cadeia pesada parece constituir a principal área de contato entre o antígeno e o anticorpo. Esquemas de seleção *in vitro* em que CDR3 sozinha é variada podem ser usados para variar as propriedades de ligação de um anticorpo ou determinar quais resíduos contribuem para a ligação de um antígeno. Daí, CDR3 é tipicamente a maior fonte de diversidade molecular no lado de ligação de anticorpo. H3, por exemplo, pode ser tão curto quanto dois resíduos de aminoácido ou maior que 26 aminoácidos.

[00135] Em uma imunoglobulina ou anticorpo de comprimento total clássico, cada cadeia leve (L) é ligada a uma cadeia pesada (H) por uma ligação de dissulfeto covalente, enquanto as duas cadeias H são ligadas entre si por uma ou mais ligações de dissulfeto dependendo do isótipo de cadeia H. O

domínio de CH mais próximo a VH é usualmente designado como CH1. Os domínios constantes ("C") não estão diretamente envolvidos na ligação ao antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tal como, citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos e da ativação de complemento. A região Fc de um anticorpo está compreendida nos domínios constantes da cadeia pesada e é, por exemplo, capaz de interagir com os receptores Fc localizados na superfície celular.

[00136] A sequência de genes de anticorpo após montagem e mutação somática é altamente variada, e estes genes variados são estimados codificando 10^{10} diferentes moléculas de anticorpo (Immunoglobulin Genes, 2ª ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Conseqüentemente, o sistema imune fornece um repertório de imunoglobulinas. O termo "repertório" se refere a pelo menos uma sequência de nucleotídeos derivada total ou parcialmente de pelo menos uma sequência que codifica pelo menos uma imunoglobulina. A sequência (ou sequências) pode ser gerada pela redistribuição *in vivo* dos segmentos V, D e J de cadeias pesadas, e dos segmentos V e J de cadeias leves. Alternativamente, a sequência (ou sequências) pode ser gerada de uma célula em resposta à ocorrência da redistribuição, por exemplo, estimulação *in vitro*. Alternativamente, parte ou a totalidade da sequência (ou sequências) pode ser obtida por *splicing* de DNA, síntese de nucleotídeo, mutagênese e outros métodos, consulte, por exemplo, a Patente US N° 5,565,332. Um repertório pode incluir apenas uma sequência ou pode incluir uma pluralidade de sequências, incluindo aquelas numa coleção geneticamente diversa.

[00137] O termo "porção Fc" ou "monômero Fc" significa, em conexão com esta invenção, um polipeptídeo compreendendo pelo menos um domínio com a função de um domínio CH2 e pelo menos um domínio com a função de um domínio CH3 de uma molécula de imunoglobulina. Como é evidente a partir do termo "monômero Fc", o polipeptídeo compreendendo esses domínios CH é um "monômero polipeptídico". Um monômero Fc pode ser um polipeptídeo que compreende pelo menos um fragmento da região constante de uma imunoglobulina excluindo o primeiro domínio da região constante de imunoglobulina de cadeia pesada (CH1), mas mantendo pelo menos uma parte funcional de um domínio CH2 e um elemento funcional de um domínio CH3, em que o domínio CH2 é amino terminal para o domínio CH3. Em um aspecto preferido da presente definição, um monômero Fc pode ser uma região constante de polipeptídeo compreendendo uma porção da região de Ig-Fc dobradiça, uma região CH2 e uma região CH3 em que a região de dobradiça é um grupo amino terminal para o domínio CH2. Está previsto que a região de dobradiça da presente invenção promova a dimerização. Tais moléculas de polipeptídeo Fc podem ser obtidas por digestão com papaína de uma região de imunoglobulina (resultando evidentemente em um dímero de dois polipeptídeos Fc), por exemplo e não limitando. Em outro aspecto desta definição, um monômero Fc pode ser uma região polipeptídica compreendendo uma porção de uma região CH2 e uma região CH3. Tais moléculas polipeptídicas Fc podem ser obtidas por digestão com pepsina de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo e não limitando. Em uma modalidade, a sequência polipeptídica de um monômero de Fc é substancialmente semelhante a uma sequência polipeptídica Fc de: uma região

Fc de IgG₁, uma região Fc de IgG₂, uma região Fc de IgG₃, uma região Fc de IgG₄, uma região Fc de IgM, uma região Fc de IgA, uma região Fc de IgD e uma região Fc de IgE. (Ver, por exemplo, Padlan, *Molecular Immunology*, 31(3), 169-217 (1993)). Porque existe alguma variação entre imunoglobulinas, e apenas para clareza, o monômero Fc refere-se aos dois últimos domínios de imunoglobulina da região constante da cadeia pesada de IgA, IgD e IgG, e os três últimos domínios de imunoglobulina da região constante da cadeia pesada de IgE e IgM. Como mencionado, o monômero Fc também pode incluir o terminal N da dobradiça flexível para estes domínios. Para IgA e IgM, o monômero Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, a porção Fc compreende os domínios de imunoglobulina CH2 e CH3 e a dobradiça entre os dois primeiros domínios e CH2. Embora os limites da porção Fc possam variar, um exemplo para uma porção Fc da cadeia pesada de IgG humana compreendendo uma dobradiça funcional, os domínios CH2 e CH3 podem ser definidos, por exemplo, compreendem os resíduos D231 (do domínio de charneira - correspondendo a D234 na Tabela 1 abaixo) a P476, respectivamente L476 (para IgG₄) do terminal carboxilo do domínio CH3, em que a numeração é de acordo com Kabat. As duas porções de Fc ou de monômeros de Fc, que estão fundidos uns com os outros através de um ligante peptídico, definem o terceiro domínio do construto de anticorpo da invenção, que também pode ser definido como domínio scFC.

[00138] Em uma modalidade da invenção prevê-se que um domínio scFC, como aqui revelado, respectivamente, os monômeros de Fc fundidos um com o outro são constituídos apenas no terceiro domínio do construto de anticorpos.

[00139] De acordo com a presente invenção, uma região de dobradiça de IgG pode ser identificada por analogia utilizando a numeração de Kabat como apresentada na Tabela 1. Em conformidade com o acima exposto, prevê-se que um domínio/ região de dobradiça da presente invenção compreende os resíduos de aminoácidos correspondentes para a extensão da sequência IgG₁ de D234 a P243 de acordo com a numeração de Kabat. Do mesmo modo, é considerado que um domínio / região de dobradiça da presente invenção compreende ou consiste na sequência de dobradiça de IgG1 DKHTCPCPCP (SEQ ID NO: 1449) (correspondente à extensão D234 a P243 como mostrado na Tabela 1 abaixo - são também previstas variações da dita sequência desde que a região de dobradiça ainda promova a dimerização). Em uma modalidade preferida da invenção, o sítio de glicosilação na posição 314 de Kabat dos domínios CH2 do terceiro domínio do construto de anticorpo é removido por uma substituição N314X, em que X é qualquer aminoácido com exceção de Q. A referida substituição é de preferência uma substituição N314G. Em uma modalidade mais preferida, o referido domínio CH2 compreende, adicionalmente, as seguintes substituições (posição de acordo com Kabat) V321C e R309C (estas substituições introduzem a ponte de dissulfureto de cisteína de domínio intra em Kabat posições 309 e 321).

[00140] Está também previsto que o terceiro domínio do construto de anticorpo da invenção compreende ou consiste em uma ordem amino a carboxilo: DKHTCPCPCP (SEQ ID NO: 1449) (ou seja, dobradiça) -CH2-CH3-ligante- DKHTCPCPCP (SEQ ID NO: 1449) (ou seja, dobradiça) -CH2-CH3. O ligante peptídico do construto de anticorpo acima mencionado está em uma

modalidade preferida, caracterizado pela sequência de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, isto é Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), ou seus polímeros, isto é (Gly₄Ser) *x*, onde *x* é um número inteiro de 5 ou maior (por exemplo, 5, 6, 7, 8 etc. ou maior), sendo 6 preferido ((Gly₄Ser)₆). O referido construto pode ainda compreender as substituições acima mencionados N314X, de preferência, N314G, e/ou o mais substituições V321C e R309C. Em uma modalidade preferida dos construtos de anticorpo da invenção, tal como aqui definido anteriormente, é considerado que o segundo domínio se liga a um epítopo extracelular da cadeia CD3ε de *Macaca* e/ou humana.

Tabela 1: Numeração de Kabat dos resíduos de aminoácidos da região de dobradiça

Numeração IMGT para a dobradiça	Tradução de aminoácidos de IgG₁	Numeração Kabat
1	(E)	226
2	P	227
3	K	228
4	S	232
5	C	233
6	D	234
7	K	235
8	T	236
9	H	237
10	T	238
11	C	239
12	P	240
13	P	241
14	C	242
15	P	243

[00141] Em outras modalidades da presente invenção, o domínio/região de dobradiça compreende ou consiste na sequência de dobradiça do subtipo IgG2 ERKCCVECP (SEQ ID NO: 1450), a sequência de dobradiça do subtipo IgG3 ELKTPLDTHTCPRCP (SEQ ID NO: 1451) ou ELKTPLGDTHTCPRCP (SEQ ID NO: 1458), e/ou a sequência de dobradiça do subtipo IgG4

ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 1452). A sequência de dobradiça do subtipo IgG1 pode ser a seguinte EPKSCDKTHTCPPCP (como mostrado na Tabela 1 e SEQ ID NO: 1459). Estas regiões de dobradiça do núcleo são assim também previstas no contexto da presente invenção.

[00142] A localização e a sequência dos domínios IgG CH2 e IgG CD3 podem ser identificadas por analogia usando a numeração de Kabat como apresentada na Tabela 2:

Tabela 2: Numeração de Kabat dos resíduos de aminoácidos da região CH2 e CH3 da IgG

Subtipo de IgG	tradução aa de CH2	Numeração de Kabat CH2	tradução aa de CH3	Numeração de Kabat CH3
IgG₁	APE... ...KAK	244... ...360	GQP... ...PGK	361... ...478
IgG₂	APP... ...KTK	244... ...360	GQP... ...PGK	361... ...478
IgG₃	APE... ...KTK	244... ...360	GQP... ...PGK	361... ...478
IgG₄	APE... ...KAK	244... ...360	GQP... ...LGK	361... ...478

[00143] Em uma modalidade da invenção, os resíduos de aminoácidos enfatizados a negrito no domínio CH3 do primeiro ou ambos os monômeros Fc são eliminados.

[00144] O ligante peptídico, por meio do qual os monômeros polipeptídicos ("porção Fc" ou "monômero Fc") do terceiro domínio estão fundidos entre si, preferencialmente compreende pelo menos 25 resíduos de aminoácidos (25, 26, 27, 28, 29, 30 etc). Mais preferencialmente, este ligante peptídico compreende pelo menos 30 resíduos de aminoácidos (30, 31, 32, 33, 34, 35 etc.). É também preferido que o agente de ligação compreenda até 40 resíduos de aminoácidos, mais preferencialmente até 35 resíduos de aminoácidos, mais preferencialmente exatamente 30 resíduos de aminoácidos. Uma modalidade preferida de um tal ligante peptídico é caracterizado pela sequência de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, isto é Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), ou seus polímeros, isto

é $(\text{Gly}_4\text{Ser})_x$, onde x é um número inteiro de 5 ou maior (por exemplo, 6, 7 ou 8). De preferência, o número inteiro é 6 ou 7, mais preferencialmente o número inteiro é 6.

[00145] No evento que um ligante é usado para fundir o primeiro domínio ao segundo domínio, ou o primeiro ou segundo domínio ao terceiro domínio, este ligante é, de preferência, de um comprimento e sequência suficientes para garantir que cada um dos primeiros e dos segundos domínios possa, independentemente um do outro, reter suas especificidades de ligação diferenciais. Para ligantes peptídicos que conectam os pelo menos dois domínios de ligação (ou dois domínios variáveis) no construto de anticorpo da invenção, são preferenciais aqueles ligantes peptídicos que compreendem apenas um pequeno número de resíduos de aminoácido, por exemplo, 12 resíduos de aminoácido ou menos. Desta forma, ligantes peptídicos de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 ou 5 resíduos de aminoácido são preferenciais. Um ligante peptídico previsto com menos que 5 aminoácidos compreende 4, 3, 2 ou um aminoácido, em que ligantes ricos em Gly são preferenciais. Uma modalidade preferida do ligante peptídico para uma fusão do primeiro e segundo domínios é descrita na SEQ ID NO:1. Uma modalidade preferida do ligante peptídico para uma fusão do segundo e terceiro domínios é um ligante- $(\text{Gly})_4$, respectivamente ligante- G_4 .

[00146] Um aminoácido "único" particularmente preferencial no contexto de um do "ligante peptídico" acima descrito é Gly. Conseqüentemente, o referido ligante peptídico pode consistir no aminoácido único Gly. Em uma modalidade preferida da invenção, um ligante peptídico é caracterizado pela sequência de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-

Ser, isto é, Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), ou polímeros do mesmo, isto é, (Gly₄Ser)_x, em que x é um número inteiro de 1 ou mais (por exemplo, 2 ou 3). Ligantes preferenciais são representados na SEQ ID NOs: 1 a 12. As características do referido ligante peptídico, que compreendem a ausência de promoção de estruturas secundárias, são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo em Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) e Raag e Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Ligantes peptídicos que adicionalmente não promovem nenhuma estrutura secundária são preferenciais. A ligação dos referidos domínios entre si pode ser fornecida, por exemplo, por modificação genética, conforme descrito nos exemplos. Métodos para preparar construtos de cadeia única biespecíficos fundidos e ligados de maneira operacional e para expressar os mesmos em células de mamífero ou bactérias são bem conhecidos na técnica (por exemplo, WO 99/54440 ou Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York, EUA, 2001).

[00147] Em uma modalidade preferida do construto de anticorpo ou a presente invenção, o primeiro e segundo domínios formam um construto de anticorpo em um formato selecionado a partir do grupo que consiste em (scFv)₂, scFv-único domínio mAb, diacorpo e oligômeros de qualquer um daqueles formatos

[00148] De acordo com uma modalidade particularmente preferencial, e conforme documentado nos exemplos anexos, o primeiro e o segundo domínios do construto de anticorpo da invenção é um "construto de anticorpo de cadeia única

biespecífico”, com mais preferência, um “Fv de cadeia única” biespecífico (scFv). Embora os dois domínios dos fragmentos de Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético - conforme descrito anteriormente no presente documento - que permite que os mesmos sejam feitos como uma cadeia de proteína única na qual as regiões de VL e VH emparelham para formar uma molécula monovalente; consulte, por exemplo, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883). Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas pelos peritos na técnica, e os fragmentos são avaliados para função da mesma maneira que os anticorpos inteiros ou de comprimento total. Um fragmento variável de cadeia única (scFv) é, daí, uma proteína de fusão da região variável da cadeia pesada (VH) e da cadeia leve (VL) de imunoglobulinas, usualmente conectada com um curto peptídeo ligante de cerca de dez a cerca de 25 aminoácidos, de preferência, cerca de 15 a 20 aminoácidos. O ligante é usualmente rico em glicina para flexibilidade, bem como serina ou treonina para solubilidade, e pode conectar o terminal N da VH ao terminal C da VL, ou *vice versa*. Esta proteína retém a especificidade da imunoglobulina original, apesar da remoção das regiões constantes e da introdução do ligante.

[00149] Os construtos de anticorpo de cadeia única biespecífico são conhecidos na técnica e são descritos em WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426,

Kipriyanov, J. *Mol. Biol.*, (1999), 293, 41-56. Técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (ver, *inter alia*, Patente US N° 4,946,778, Kontermann e Dübel (2010), *loc. cit.* e Little (2009), *loc. cit.*) podem ser adaptadas para produzir construtos de anticorpo de cadeia única especificamente reconhecendo alvo eleito (ou alvos).

[00150] Fragmentos variáveis de cadeia bivalente (também chamada de divalente) ou de cadeia única (bi-scFvs ou di-scFvs tendo o formato (scFv)₂ podem ser geneticamente modificados ligando duas moléculas de scFv (por exemplo, com ligantes conforme descrito anteriormente no presente documento). Se estas duas moléculas de scFv tiverem a mesma especificidade de ligação, a molécula (scFv)₂ resultante será, de preferência, chamada de bivalente (isto é, tem duas valências para o mesmo epítipo-alvo). Se as duas moléculas scFv têm diferentes especificidades de ligação, a molécula (scFv)₂ resultante será, de preferência, chamada de biespecífica. A ligação pode ser feita produzindo uma cadeia de peptídeo simples com duas regiões de VH e duas regiões de VL, rendendo scFvs tandem (ver, por exemplo, Kufer P. et al., (2004) *Trends in Biotechnology* 22(5):238-244). Outra possibilidade é a criação de moléculas scFv com peptídeos ligantes que são muito curtos para as duas regiões variáveis para dobrar juntos (por exemplo, cerca de cinco aminoácidos), forçando as scFvs a dimerizar. Este tipo é conhecido como diacorpos (ver, por exemplo, Hollinger, Philipp et al., (Julho 1993) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14): 6444-8).

[00151] De acordo com esta invenção, o primeiro, o segundo ou o primeiro e o segundo domínios podem compreender

um anticorpo de domínio único, respectivamente o domínio variável ou pelo menos as CDRs de um anticorpo de domínio único. Anticorpos de domínio simples compreendem apenas um domínio variável de anticorpo (monomérico) que é capaz de se ligar seletivamente a um antígeno específico, independentemente de outras regiões ou domínios de V. Os primeiros anticorpos de domínio simples foram modificados de anticorpos de cadeia pesada encontrados em camelídeos, e estes são chamados de fragmentos V_{HH} . Peixes cartilagosos também têm anticorpos de cadeia pesada (IgNAR) a dos quais anticorpos de domínio simples chamados fragmentos V_{NAR} podem ser obtidos. Uma abordagem alternativa é dividir os domínios variáveis diméricos de imunoglobulinas comuns, por exemplo, de seres humanos ou roedores em monômeros, daí, obtendo V_H ou V_L como um domínio simples Ab. Embora grande parte da pesquisa de anticorpos de domínio simples seja atualmente baseada em domínios variáveis de cadeia pesada, também foi mostrado que nanocorpos derivados de cadeias leves se ligam especificamente a epítomos-alvo. Exemplos de anticorpos de domínio simples são chamados de sdAb, nanocorpos ou anticorpos de domínio simples.

[00152] Um (domínio simples mAb)₂ é, daí, um construto de anticorpo monoclonal composto por (pelo menos) dois anticorpos monoclonais de domínio simples, que são individualmente selecionados do grupo compreendendo V_H , V_L , V_{HH} e V_{NAR} . O ligante está, de preferência, sob a forma de um ligante peptídico. De modo similar, um "mAb de domínio único-scFv" é um construto de anticorpo monoclonal composto por pelo menos um anticorpo de domínio simples conforme descrito acima e uma molécula scFv conforme descrito acima. Novamente,

o ligante está, de preferência, sob a forma de um ligante peptídico.

[00153] A possibilidade de um construto de anticorpo competir, ou não, para ligação com outro dado construto de anticorpo pode ser medida num ensaio de competição como um ELISA competitivo ou um ensaio de competição à base de célula. Micropartículas (microesferas) acopladas a avidina também podem ser usadas. Similar a uma placa de ELISA revestida com avidina, quando reagido com uma proteína biotinizada, cada uma destas microesferas pode ser usada como um substrato sobre o qual um ensaio pode ser realizado. O antígeno é aplicado como revestimento sobre uma microesfera e, então, pré-revestido com um primeiro anticorpo. O segundo anticorpo é adicionado e toda ligação adicional é determinada. Meios possíveis para a leitura incluem citometria de fluxo.

[00154] Células T ou linfócitos T são um tipo de linfócito (um tipo de glóbulo branco) que desempenham um papel central na imunidade mediada por célula. Existem diversos subconjuntos de células T, cada um com uma função distinta. Células T podem ser distinguidas de outros linfócitos, como células B e células NK, pela presença de um receptor de célula T (TCR) na superfície celular. O TCR é responsável por reconhecer antígenos ligados a moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e é composto por duas cadeias de proteína diferentes. Em 95% das células T, o TCR consiste numa cadeia alfa (α) e beta (β). Quando o TCR se engata a um peptídeo antigénico e MHC (completo de peptídeo/MHC), o linfócito T é ativado através de uma série de eventos bioquímicos mediados por enzimas

associadas, correceptores, moléculas adaptadoras especializadas e fatores de transcrição ativado ou liberados.

[00155] O complexo de receptor de CD3 é um complexo de proteína e é composto por quatro cadeias. Em mamíferos, o complexo contém uma cadeia CD3 γ (gama), uma cadeia CD3 δ (delta) e duas cadeias CD3 ϵ (épsilon). Estas cadeias se associam ao receptor de célula T (TCR) e à chamada cadeia ζ (zeta) para formar o complexo de CD3 de receptor de célula T e para gerar um sinal de ativação em linfócitos T. As cadeias CD3 γ (gama), CD3 δ (delta) e CD3 ϵ (épsilon) são proteínas de superfície celular altamente relacionadas da superfamília de imunoglobulina contendo um único domínio de imunoglobulina extracelular. As caudas intracelulares das moléculas de CD3 contêm um único motivo conservado conhecido como motivo de ativação baseado em imunorreceptor tirosina ou ITAM abreviado, que é essencial para a capacidade de sinalização do TCR. A molécula épsilon CD3 é um polipeptídeo que, em seres humanos, é codificado pelo gene *CD3E* que reside no cromossomo 11. O epítipo mais preferencial de épsilon CD3 está compreendido dentro de resíduos de aminoácido 1 a 27 do domínio extracelular de épsilon CD3 humano. Está previsto que os construtos de anticorpo de acordo com a presente invenção exibam típica e vantajosamente menos ativação de células T inespecíficas, o que não é desejado em imunoterapia específica. Isso se traduz em um risco reduzido de efeitos colaterais.

[00156] A lise redirecionada de células-alvo através do recrutamento de células T por um construto de anticorpo multiespecífico, pelo menos biespecífico, envolve formação

de sinapse citolítica e entrega de perforina e granzimas. As células T engatadas são capazes de lise de célula-alvo em série, e não são afetadas por mecanismos de escape imune interferindo no processamento e apresentação de antígeno e peptídeo, ou diferenciação de célula T clonal; consulte, por exemplo, WO 2007/042261.

[00157] A citotoxicidade mediada por construtos de anticorpo da invenção pode ser medida de várias formas. Células efetoras podem ser, por exemplo, células T positivas CD8 enriquecidas (humanas) estimuladas ou células mononucleares de sangue periférico (humano) não estimuladas (PBMC). Se as células-alvo são de origem de macaco ou expressam ou são transfectadas com antígeno de superfície da célula alvo de macaco, que está ligado pelo primeiro domínio, as células efetoras também deveriam ser de origem de macaco como uma linha de célula T de macaco, por exemplo, 4119LnPx. As células alvo devem expressar (pelo menos, o domínio extracelular de) o antígeno da superfície da célula alvo, por exemplo, antígeno da superfície da célula alvo humano ou de macaco. Células-alvo podem ser uma linha celular (tal como, CHO) que é estável ou transientemente transfectada com antígeno da superfície da célula alvo, por exemplo, antígeno da superfície da célula alvo humano ou de macaco. Alternativamente, as células alvo podem ser de uma linha celular que expressa naturalmente antígeno da superfície da célula alvo. Usualmente, é esperado que valores EC_{50} sejam menores com linhas celulares alvo expressando níveis maiores de antígeno da superfície da célula alvo na superfície celular. A razão entre célula efetora e célula-alvo (E:T) é usualmente cerca de 10:1, mas também pode variar. A atividade

citotóxica de construtos de anticorpo biespecífico antígenoCD3 de superfície celular alvo pode ser medida num ensaio de liberação de ^{51}Cr (tempo de incubação de cerca de 18 horas) ou num ensaio de citotoxicidade baseado em FACS (tempo de incubação de cerca de 48 horas). Modificações do tempo de incubação de ensaio (reação citotóxica) também são possíveis. Outros métodos de medição de citotoxicidade bem conhecidos pelo perito na técnica e compreendem ensaios de MTT ou MTS, ensaios à base de ATP incluindo ensaios bioluminescentes, o ensaio de sulforodamina B (SRB), ensaio de WST, ensaio clonogênico e a tecnologia ECIS.

[00158] A atividade citotóxica mediada por construtos de anticorpo biespecífico antígenoCD3 de superfície celular alvo da presente invenção é, de preferência, medida num ensaio de citotoxicidade à base de célula. Também pode ser medida num ensaio de liberação de ^{51}Cr . É representada pelo valor EC_{50} , que corresponde à metade da concentração eficaz máxima (concentração do construto de anticorpo que induz uma resposta citotóxica na metade do caminho entre a linha de base e a máxima). De preferência, o valor EC_{50} dos construtos de anticorpo biespecífico antígenoCD3 de superfície celular alvo é ≤ 5000 pM ou ≤ 4000 pM, com mais preferência ≤ 3000 pM ou ≤ 2000 pM, ainda com mais preferência ≤ 1000 pM ou ≤ 500 pM, ainda com mais preferência ≤ 400 pM ou ≤ 300 pM, ainda com mais preferência ≤ 200 pM, ainda com mais preferência ≤ 100 pM, ainda com mais preferência ≤ 50 pM, ainda com mais preferência ≤ 20 pM ou ≤ 10 pM, e com máxima preferência ≤ 5 pM.

[00159] Os valores EC_{50} dados acima podem ser medidos em diferentes ensaios. O perito na técnica está ciente que um

valor EC_{50} pode ser menor quando células T $CD8^+$ estimuladas/enriquecidas são usadas como células efetoras, em comparação com PBMC não estimulada. Pode-se esperar, ainda, que os valores EC_{50} sejam menores quando as células alvo expressam um número elevado do antígeno da superfície da célula alvo em comparação com um rato-alvo de baixa expressão. Por exemplo, quando células T $CD8^+$ humanas enriquecidas / estimuladas são usadas como células efetoras (e células transfectadas com antígeno da superfície da célula alvo como células de CHO ou uma linha celular humana positiva para antígeno da superfície da célula alvo são usadas como células-alvo), o valor EC_{50} do construto de anticorpo biespecífico do antígeno da superfície da célula alvo $CD3$ é, de preferência, ≤ 1000 pM, com mais preferência ≤ 500 pM, ainda com mais preferência ≤ 250 pM, ainda com mais preferência ≤ 100 pM, ainda com mais preferência ≤ 50 pM, ainda com mais preferência ≤ 10 pM, e com máxima preferência ≤ 5 pM. Quando PBMCs humanas são usadas como células efetoras, o valor EC_{50} do construto de anticorpo biespecífico do antígeno da superfície da célula alvo $CD3$ é, de preferência, ≤ 5000 pM ou ≤ 4000 pM (em particular, quando as células-alvo são linhas celulares humanas positivas para antígeno da superfície da célula alvo), com mais preferência ≤ 2000 pM (em particular, quando as células alvo são células transfectadas com antígeno da superfície da célula alvo, tal como células de CHO), com mais preferência ≤ 1000 pM ou ≤ 500 pM, ainda com mais preferência ≤ 200 pM, ainda com mais preferência ≤ 150 pM, ainda com mais preferência ≤ 100 pM, e com máxima preferência ≤ 50 pM, ou menos. Quando uma linha de células T de macaco como LnPx4119 é usada como células efetoras, e uma linha de

células transfectada com antígeno da superfície da célula alvo de macaco como células CHO é usada como linha de célula-alvo, o valor EC_{50} do construto de anticorpo biespecífico do antígeno da superfície da célula alvo $\times CD3$ é, de preferência, ≤ 2000 pM ou ≤ 1500 pM, com mais preferência ≤ 1000 pM ou ≤ 500 pM, ainda com mais preferência ≤ 300 pM ou ≤ 250 pM, ainda com mais preferência ≤ 100 pM, e com máxima preferência ≤ 50 pM.

[00160] De preferência, os construtos de anticorpos biespecíficos do antígeno da superfície da célula alvo $\times CD3$ da presente invenção não induzem/mediam a lise ou não essencialmente induzem /mediam a lise de células negativas de antígeno da superfície da célula alvo, tal como células CHO. O termo "não induz lise", "não essencialmente induz lise", "não media lise" ou "não essencialmente media lise" significa que um construto de anticorpo da presente invenção não induz ou media lise de mais que 30%, de preferência não maior que 20%, com mais preferência não maior que 10%, particularmente, de preferência, não maior que 9%, 8%, 7%, 6% ou 5% de células negativas de antígeno da superfície da célula alvo, em que a lise de uma linha de células humana positiva para antígeno da superfície da célula alvo é definida para ser 100%. Isto usualmente se aplica para concentrações do construto de anticorpo de até 500 nM. O perito na técnica sabe como medir a lise celular sem demora. Ademais, o presente relatório descritivo ensina instruções específicas sobre como media a lise celular.

[00161] A diferença na atividade citotóxica entre a isoforma monomérica e dimérica de construtos de anticorpo biespecífico de antígeno da superfície da célula alvo $\times CD3$ individuais é chamada de "lacuna de potência". Esta lacuna

de potência pode, por exemplo, ser calculado como uma razão entre valores EC_{50} da forma monomérica e dimérica da molécula. Lacunas de potência dos construtos de anticorpo biespecífico de antígeno da superfície da célula alvo CD3 da presente invenção são, de preferência, ≤ 5 , com mais preferência ≤ 4 , ainda com mais preferência ≤ 3 , ainda com mais preferência ≤ 2 e com máxima preferência ≤ 1 .

[00162] O primeiro e/ou o segundo (ou qualquer outro) domínio de ligação (ou domínios) do construto de anticorpo da invenção é, de preferência, específico entre espécies para membros da ordem de mamífero de primatas. Os domínios de ligação de CD3 específico entre espécies são, por exemplo, descritos em WO 2008/119567. De acordo com uma modalidade, o primeiro e/ou o segundo domínio de ligação, além de se ligar ao antígeno da superfície da célula alvo humano e CD3 humano, respectivamente, também se liga ao antígeno da superfície da célula alvo / CD3 de primatas incluindo (sem limitação) primatas do novo mundo (tal como *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* ou *Saimiri sciureus*), e primatas do velho mundo (tal como babuínos e macacos), gibões, orangotangos e *homininae* não humanos.

[00163] Em uma modalidades do construto de anticorpo da invenção, o primeiro domínio liga-se ao antígeno da superfície da célula alvo humano e ainda se liga ao antígeno da superfície da célula alvo de macaco, tais como antígeno da superfície da célula alvo de *Macaca fascicularis*, e mais de preferência, o antígeno da superfície da célula alvo de macaco expresso na superfície das células de macaco. A afinidade do primeiro domínio de ligação para antígeno da superfície da célula alvo de macaco é, de preferência, ≤ 15

nM, com mais preferência ≤ 10 nM, ainda com mais preferência ≤ 5 nM, ainda com mais preferência ≤ 1 nM, ainda com mais preferência $\leq 0,5$ nM, ainda com mais preferência $\leq 0,1$ nM, e com máxima preferência $\leq 0,05$ nM ou mesmo $\leq 0,01$ nM.

[00164] De preferência, a lacuna de afinidade dos construtos de anticorpo de acordo com a invenção para ligar antígeno da superfície da célula alvo de macaco versus antígeno da superfície da célula alvo humano [antígeno da superfície da célula alvo de ma:antígeno da superfície da célula alvo de hu] (conforme determinado por exemplo por BiaCore ou por análise de Scatchard) é < 100 , de preferência < 20 , com mais preferência < 15 , adicionalmente de preferência < 10 , ainda com mais preferência < 8 , com mais preferência < 6 e com máxima preferência < 2 . Faixas preferenciais para a lacuna de afinidade dos construtos de anticorpo de acordo com a invenção para ligação de antígeno da superfície da célula alvo de macaco versus antígeno da superfície da célula alvo humano são entre 0,1 e 20, com mais preferência entre 0,2 e 10, ainda com mais preferência entre 0,3 e 6, ainda com mais preferência entre 0,5 e 3, ainda com mais preferência 0,5 e 2,5 e com máxima preferência entre 0,5 e 2 ou entre 0,6 e 2.

[00165] O segundo domínio de ligação do construto de anticorpo da invenção se liga a CD3 épsilon humano e/ou CD3 épsilon de Macaca. Em uma modalidade preferida, o segundo domínio se liga ainda a CD3 épsilon de *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* ou *Saimiri sciureus*. *Callithrix jacchus* e *Saguinus oedipus* são ambos primatas do novo mundo pertencendo à família de *Callitrichidae*, enquanto *Saimiri sciureus* é um primata do novo mundo pertencendo à família de *Cebidae*.

[00166] É preferido para o construto de anticorpo da presente invenção que o segundo domínio que se liga a um epítopo extracelular de CD3 humana e/ou de *Macaca* compreenda uma região VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 selecionadas de:

(a) CDR-L1 conforme representada na SEQ ID NO: 27 de WO 2008/119567, CDR-L2 conforme representada na SEQ ID NO: 28 de WO 2008/119567 e CDR-L3 conforme representada na SEQ ID NO: 29 de WO 2008/119567;

(b) CDR-L1 conforme representada na SEQ ID NO: 117 de WO 2008/119567, CDR-L2 conforme representada na SEQ ID NO: 118 de WO 2008/119567 e CDR-L3 conforme representada na SEQ ID NO: 119 de WO 2008/119567; e

(c) CDR-L1 conforme representada na SEQ ID NO: 153 de WO 2008/119567, CDR-L2 conforme representada na SEQ ID NO: 154 de WO 2008/119567 e CDR-L3 conforme representada na SEQ ID NO: 155 de WO 2008/119567.

[00167] Também é uma modalidade preferida do construto de anticorpo da presente invenção, o segundo domínio que se liga a um epítopo extracelular da cadeia épsilon de CD3 humana e/ou *Macaca* compreendendo uma região VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 selecionadas de:

(a) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 12 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 13 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 14 de WO 2008/119567;

(b) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 30 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 31 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 32 de WO 2008/119567;

(c) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 48 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 49 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 50 de WO 2008/119567;

(d) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 66 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 67 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 68 de WO 2008/119567;

(e) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 84 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 85 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 86 de WO 2008/119567;

(f) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 102 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 103 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 104 de WO 2008/119567;

(g) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 120 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 121 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 122 de WO 2008/119567;

(h) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 138 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 139 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 140 de WO 2008/119567;

(i) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 156 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO: 157 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 158 de WO 2008/119567; e

(j) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 174 de WO 2008/119567, CDR-H2 conforme representada na SEQ ID NO:

175 de WO 2008/119567 e CDR-H3 conforme representada na SEQ ID NO: 176 de WO 2008/119567.

[00168] Em uma modalidade preferida do construto de anticorpo da invenção, os três grupos de VL CDRs acima descritos são combinados com os dez grupos de VH CDRs acima descritos dentro do segundo domínio de ligação para formar grupos (30), compreendendo cada uma CDR-L 1-3 e CDR-H 1-3.

[00169] É preferido para o construto de anticorpo da presente invenção que o segundo domínio que se liga a CD3 compreenda uma região VL selecionada do grupo que consiste em a região VL conforme representada na SEQ ID NO: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 93, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 ou 183 de WO 2008/119567 ou como representada na presente listagem de sequências, como SEQ ID NO: 16 ou 25.

[00170] Prefere-se também que o segundo domínio que se liga a CD3 compreenda uma região VH selecionada do grupo consistindo em uma região VH como representada na SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 ou 181 de WO 2008/119567 ou como representada na presente listagem de sequências, como SEQ ID NO: 15 ou 24.

[00171] Com mais preferência, o construto de anticorpo da presente invenção é caracterizado pelo segundo domínio que se liga a CD3 compreendendo uma região VL e uma região VH selecionada do grupo que consiste em:

(a) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 17 ou 21 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 15 ou 19 de WO 2008/119567;

(b) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO:

35 ou 39 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 33 ou 37 de WO 2008/119567;

(c) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 53 ou 57 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 51 ou 55 de WO 2008/119567;

(d) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 71 ou 75 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 69 ou 73 de WO 2008/119567;

(e) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 89 ou 93 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 87 ou 91 de WO 2008/119567;

(f) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 107 ou 111 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 105 ou 109 de WO 2008/119567;

(g) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 125 ou 129 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 123 ou 127 de WO 2008/119567;

(h) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 143 ou 147 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 141 ou 145 de WO 2008/119567;

(i) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 161 ou 165 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 159 ou 163 de WO 2008/119567; e

(j) uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 179 ou 183 de WO 2008/119567 e uma região VH conforme representada na SEQ ID NO: 177 ou 181 de WO 2008/119567.

[00172] Também é preferencialmente em conjunto com o construto de anticorpo da presente invenção um segundo domínio que se liga a CD3 compreendendo uma região VL conforme representada na SEQ ID NO: 16 ou 25 e uma região VH

conforme representada na presente listagem de sequências, como SEQ ID NO: 15 ou 24.

[00173] De acordo com uma modalidade preferida do construto de anticorpo da presente invenção, o primeiro e/ou o segundo domínio tem o seguinte formato: Os pares de regiões de VH e regiões de VL estão no formato de um anticorpo de cadeia única (scFv). As regiões de VH e VL são dispostas na ordem VH-VL ou VL-VH. É preferencial que a região VH seja posicionada em terminal N de uma sequência ligante, e a região VL é posicionada em terminal C da sequência ligante.

[00174] Uma modalidade preferida do construto de anticorpo acima descrito da presente invenção é caracterizada pelo segundo domínio que se liga a CD3 compreender uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 123, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 ou 187 de WO 2008/119567 ou representada na presente listagem de sequências, como SEQ ID NO: 26.

[00175] Modificações covalentes dos construtos de anticorpo também estão incluídas no escopo desta invenção e são, em geral, mas não sempre, feitas de maneira pós-tradução. Por exemplo, diversos tipos de modificações covalentes do construto de anticorpo são introduzidas na molécula reagindo resíduos de aminoácido específicos do construto de anticorpo com um agente de derivação orgânico que é capaz de reagir com as cadeias laterais selecionadas ou com os resíduos de terminal N ou C.

[00176] Resíduos de cisteinila mais comumente são reagidos com α -haloacetatos (e aminas correspondentes), tal como ácido cloroacético ou cloroacetamida, para render

derivados de carboximetila ou carboxiamidometila. Resíduos de cisteinila também são derivados pela reação com bromotri-fluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazoil)propiônico, fosfato de cloroacetila, N-alquilmaleimidas, dissulfeto de 3-nitro-2-piridila, dissulfeto de metil 2-piridila, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol ou cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

[00177] Resíduos de histidila são derivados pela reação com dietilpirocarbonato a pH 5,5 a 7,0 porque este agente é relativamente específico para cadeia lateral de histidila. Brometo de para-bromofenacila também é útil; a reação é, de preferência, realizada em cacodilato de sódio a 0,1 M a pH 6,0. Resíduos de terminal amino e lisinila são reagidos com anidridos de ácido succínico ou carboxílico. Derivação com estes agentes temo efeito de reverter a carga dos resíduos de lisinila. Outros reagentes adequados para derivar resíduos contendo alfa-amino incluem imidoésteres como picolinimidato de metila; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroboro-hidreto; ácido trinitrobenzenossulfônico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

[00178] Resíduos de arginila são modificados pela reação com um ou diversos reagentes convencionais, dentre estes, fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclo-hexanodiona e ninidrina. A derivação de resíduos de arginina exige que a reação seja realizada em condições alcalinas devido ao alto pKa do grupo funcional guanidina. Ademais, estes reagentes podem reagir com os grupos de lisina bem como o grupo arginina épsilon-amino.

[00179] A modificação específica de resíduos tirosila pode ser feita, com interesse particular na introdução de etiquetas espectrais em resíduos de tirosila pela reação com compostos de diazônio aromático ou tetranitrometano. Mais comumente, N-acetilimidazol e tetranitrometano são usados para formar espécies de O-acetil tirosila e derivados de 3-nitro, respectivamente. Resíduos de tirosila são iodados usando ^{125}I ou ^{131}I para preparar proteínas etiquetadas para uso em radioimunoensaio, o método T de cloramina descrito acima sendo adequado.

[00180] Grupos laterais carboxila (aspartila ou glutamila) são seletivamente modificados pela reação com carbodiimidas ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N--R}'$), em que R e R' são grupos alquila opcionalmente diferentes, como 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Ademais, resíduos de aspartila e glutamila são convertidos em resíduos de asparaginila e glutaminila pela reação com íons de amônio.

[00181] A derivação com agentes bifuncionais é útil para reticular os construtos de anticorpo da presente invenção para uma superfície ou matriz de suporte insolúvel em água para uso numa variedade de métodos. Agentes de reticulação comumente usados incluem, por exemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissucinimidila como 3,3'-ditiobis(sucinimidilpropionato) e maleimidas bifuncionais como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes de derivação como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato rendem

intermediários fotoativáveis que são capazes de formar reticulações na presença de luz. Alternativamente, matrizes insolúveis em água reativas como carboidratos ativados por brometo de cianogênio e os substratos reativos conforme descrito nas Patente US N° 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; e 4,330,440 são empregadas para imobilização de proteína.

[00182] Resíduos de glutaminila e asparaginila são frequentemente diamidados para os resíduos de glutamila e aspartila correspondentes, respectivamente. Alternativamente, estes resíduos são diamidados sob condições suavemente ácidas. Qualquer forma destes resíduos está dentro do escopo desta invenção.

[00183] Outras modificações incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de serila ou treonila, metilação dos grupos α -amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, EUA, 1983, páginas 79-86), acetilação da amina de terminal N, e amidação de qualquer grupo carboxila de terminal C.

[00184] Outro tipo de modificação covalente dos construtos de anticorpo incluído no escopo desta invenção compreende alterar o padrão de glicosilação da proteína. Conforme é conhecido na técnica, padrões de glicosilação podem depender tanto da sequência da proteína (por exemplo, a presença ou ausência de resíduos de aminoácido de glicosilação particular, discutido abaixo) ou da célula hospedeira ou organismo no qual a proteína é produzida. Sistemas de expressão particulares são discutidos abaixo.

[00185] A glicosilação de polipeptídeos é tipicamente ou ligada a N ou ligada a O. Ligado(a) a N se refere à fixação da parte de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tri-peptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para fixação enzimática da parte de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Deste modo, a presença de qualquer uma destas sequências de tri-peptídeo num polipeptídeo cria um sítio de glicosilação em potencial. A glicosilação ligada em O se refere à fixação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose, a um ácido hidroxilamina, mais comumente, serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possa ser usada.

[00186] A adição de sítios de glicosilação ao construto de anticorpo é convenientemente realizada alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que contenha uma ou mais das sequências de tri-peptídeo descritas acima (para sítios de glicosilação ligados a N). A alteração também pode ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduo de serina ou treonina à sequência de partida (para sítios de glicosilação ligados a O). Para facilitar, a sequência de aminoácidos de um construto de anticorpo é, de preferência, alterada através de mudanças no nível de DNA, particularmente mutando o DNA que codifica o polipeptídeo a bases pré-selecionadas de tal modo que códons sejam gerados que irão se traduzir nos aminoácidos desejados.

[00187] Outro meio de aumento do número de partes de carboidrato no construto de anticorpo é por acoplamento

químico ou enzimático de glicosidas à proteína. Estes procedimentos são vantajosos visto que não exigem a produção da proteína numa célula hospedeira que tem capacidades de glicosilação para glicosilação ligada a N e O. Dependendo do modo de acoplamento usado, o açúcar (ou açúcares) pode ser fixado a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilares livres, (c) grupos sulfidrilares livres como aqueles de cisteína, (d) grupo hidroxilares livres como aqueles de serina, treonina ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos como aqueles de fenilalanina, tirosina ou triptofano, ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos são descritos em WO 87/05330, e em Aplin e Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

[00188] A remoção de partes de carboidrato presentes no construto de anticorpo de partida pode ser realizada química ou enzimaticamente. A deglicosilação química exige a exposição da proteína ao composto ácido trifluorometano sulfônico ou a um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maior parte ou de todos os açúcares, exceto o açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), enquanto deixa o polipeptídeo intacto. A deglicosilação química é descrita por Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 e por Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. A clivagem enzimática de partes de carboidrato em polipeptídeos pode ser alcançada pelo uso de uma variedade de endo e exo-glicosidases conforme descrito por Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. A glicosilação a sítios de glicosilação em potencial pode ser evitada pelo uso do composto tunicamicina conforme descrito por Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. A

tunicamicina bloqueia a formação de ligações de proteína-N-glicosida.

[00189] Outras modificações do construto de anticorpo também são contempladas no presente documento. Por exemplo, outro tipo de modificação covalente do construto de anticorpo compreende ligar o construto de anticorpo a vários polímeros não proteínáceos, incluindo, sem limitação, vários polióis como polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, da maneira apresentada nas Patentes US Nº 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 ou 4,179,337. Além disso, como é conhecido na técnica, substituições de aminoácido podem ser feitas em várias posições no construto de anticorpo, por exemplo, a fim de facilitar a adição de polímeros como PEG.

[00190] Em algumas modalidades, a modificação covalente do construtos de anticorpo da invenção compreende a adição de uma ou mais etiquetas. O grupo de etiquetagem pode ser acoplado ao construto de anticorpo através de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir impedimento estérico. Vários métodos para etiquetar proteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados na concretização da presente invenção. O termo "etiqueta" ou "grupo de etiquetagem" se refere a qualquer etiqueta detectável. Em geral, etiquetas caem dentro de uma variedade de classes, dependendo do ensaio no qual as mesmas devem ser detectadas - os seguintes exemplos incluem, sem limitação:

a) etiquetas isotópicas, que podem ser isótopos radioativos ou pesados, tais como radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc ,

^{111}In , ^{125}I , ^{131}I);

b) etiquetas magnéticas (por exemplo, partículas magnéticas);

c) partes ativas de redox;

d) corantes ópticos (incluindo, sem limitação, cromóforos, fósforo e fluoróforos) como grupos fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantanida), grupos quimioluminescentes, e fluoróforos que podem ser fluores de "pequena molécula" ou fluores proteináceos;

e) grupos enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina);

f) grupos biotinilados;

g) epítomos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de leucina zipper, lados de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epítomo, etc.).

[00191] Por "etiqueta fluorescente" é qualquer molécula que pode ser detectada através de suas propriedades fluorescentes inerentes. Etiquetas fluorescentes adequadas incluem, sem limitação, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, coumarina, metil-coumarinas, pireno, verde Malacite, estilbena, amarelo Lucifer, AzulJ Cascade, vermelho Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, vermelho LC 640, Cy 5, Cy 5.5, vermelho LC 705, verde Oregon, os corantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascade, Amarelo Cascade e R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina, e

vermelho Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Corantes ópticos adequados, incluindo fluoróforos, são descritos em *Molecular Probes Handbook* por Richard P. Haugland.

[00192] As etiquetas fluorescentes proteínáceas adequadas incluem também, mas não estão limitadas a, proteína fluorescente verde, incluindo as espécies de Renilla, Ptilosarcus ou Aequorea de GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de Acesso do Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8º Andar, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), proteína fluorescente amarela melhorada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferase (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β -galactosidase (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85:2603-2607) e Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patentes US Nº 5,292,658; 5,418,155; 5,683,888; 5,741,668; 5,777,079; 5,804,387; 5,874,304; 5,876,995; 5,925,558).

[00193] O construto de anticorpo da invenção também pode compreender domínios adicionais, que são, por exemplo, úteis no isolamento da molécula ou se referem a um perfil farmacocinético adaptado da molécula. Domínios úteis para o isolamento de um construto de anticorpo podem ser selecionados de motivos de peptídeo ou partes secundariamente introduzidas, que podem ser capturadas num método de isolamento, por exemplo, uma coluna de isolamento. Modalidades não limitadoras de tais domínios adicionais

compreendem partes de peptídeo conhecidas como Myc-tag, HAT-tag, HA-tag, TAP-tag, GST-tag, domínio de ligação de quitina (CBD-tag), proteína de ligação de maltose (MBP-tag), Flag-tag, Strep-tag e variantes dos mesmos (por exemplo, StrepII-tag) e His-tag. Todos os construtos de anticorpo divulgados no presente documento caracterizados pelas CDRs identificadas podem compreender um domínio de His-tag, que é, em geral, conhecido como uma repetição de resíduos de His consecutivos na sequência de aminoácidos de uma molécula, de preferência de cinco, e com mais preferência de seis resíduos de His (hexa-histidina). A His-tag pode ser situada, por exemplo, no terminal N ou C do construto de anticorpo, de preferência, está situada no terminal C. Com a máxima preferência, uma etiqueta de hexa-histidina (HHHHHH) (SEQ ID NO: 16) é ligada através de uma ligação de peptídeo ao terminal C do construto de anticorpo de acordo com a invenção. Adicionalmente, um sistema conjugado de PLGA-PEG-PLGA pode ser combinado com um marcador de poli-histidina para aplicação de liberação sustentada e perfil farmacocinético melhorado.

[00194] Modificações de sequência de aminoácidos dos construtos de anticorpo descritos no presente documento também são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável aprimorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do construto de anticorpo. Variantes de sequência de aminoácidos dos construtos de anticorpo são preparados introduzindo mudanças de nucleotídeo apropriadas no ácido nucleico de construtos de anticorpo ou por síntese de peptídeo. Todas as modificações de sequência de aminoácidos descritas abaixo deveriam resultar num construto de

anticorpo que ainda retém a atividade biológica desejada (se ligando a antígeno da superfície da célula alvo e a CD3) da molécula parental não modificada.

[00195] O termo "aminoácido" ou "resíduo de aminoácido" tipicamente se refere a um aminoácido tendo sua definição reconhecida na técnica como um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: alanina (Ala ou A); arginina (Arg ou R); asparagina (Asn ou N); ácido aspártico (Asp ou D); cisteína (Cys ou C); glutamina (Gln ou Q); ácido glutâmico (Glu ou E); glicina (Gly ou G); histidina (His ou H); isoleucina (Ile ou I); leucina (Leu ou L); lisina (Lys ou K); metionina (Met ou M); fenilalanina (Phe ou F); prolina (Pro ou P); serina (Ser ou S); treonina (Thr ou T); triptofano (Trp ou W); tirosina (Tyr ou Y); e valina (Val ou V), embora aminoácidos modificados, sintéticos ou raros possam ser usados conforme desejado. Em geral, aminoácidos podem ser agrupados como tendo uma cadeia lateral não polar (por exemplo, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); uma cadeia lateral negativamente carregada (por exemplo, Asp, Glu); uma cadeia lateral positivamente carregada (por exemplo, Arg, His, Lys); ou uma cadeia lateral polar não carregada (por exemplo, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp e Tyr).

[00196] Modificações de aminoácido incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em, e/ou substituições de, resíduos nas sequências de aminoácidos dos construtos de anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para chegar ao construto final, desde que o construto final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácido também podem alterar processos

pós-tradução dos construtos de anticorpo, como mudar o número ou a posição de sítios de glicosilação.

[00197] Por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos podem ser inseridos, substituídos ou eliminados em cada um das CDRs (claro, dependente do seu comprimento), enquanto que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou 25 aminoácidos podem ser inseridos, substituídos ou eliminados em cada uma das FRs. De preferência, inserções de sequências de aminoácidos no construto de anticorpo incluem fusões de terminal amino e/ou carboxilo que variam em comprimento desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos até polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequência de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Correspondentes modificações podem também realizadas dentro do terceiro domínio do construto de anticorpo da invenção. Um variante de inserção do construto de anticorpo da invenção inclui a fusão ao terminal N ou ao terminal C do construto de anticorpo de uma enzima ou a fusão a um polipeptídeo.

[00198] Os sítios de maior interesse para mutagênese substitucional incluem (mas não estão limitados a) as CDRs da cadeia pesada e/ou leve, em particular, as regiões hipervariáveis, mas alterações de FR na cadeia pesada e/ou leve também são contempladas. As substituições são, de preferência, substituições conservativas conforme descrito no presente documento. De preferência, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 aminoácidos podem ser substituídos numa CDR, enquanto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 25 aminoácidos podem ser substituídos nas regiões estruturais (FRs), dependendo do comprimento da

CDR ou FR. Por exemplo, se uma sequência de CDR abranger 6 aminoácidos, é previsto que um, dois ou três destes aminoácidos sejam substituídos. De modo similar, se uma sequência de CDR abranger 15 aminoácidos, é previsto que um, dois, três, quatro, cinco ou seis destes aminoácidos sejam substituídos.

[00199] Um método útil para a identificação de certos resíduos ou regiões dos construtos de anticorpo que são locais preferenciais para mutagênese é chamado "mutagênese por varredura de alanina" conforme descrito por Cunningham e Wells em *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos-alvo dentro do construto de anticorpo é/são identificado(s) (por exemplo, resíduos carregados como arg, asp, his, lys, e glu) e substituído(s) por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (com máxima preferência alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o epítipo.

[00200] Estes locais de aminoácido demonstrando sensibilidade funcional às substituições são, então, refinados introduzindo variantes adicionais ou outros em, ou para, os sítios de substituição. Deste modo, enquanto o sítio ou região para introduzir uma variação de sequência de aminoácidos é predeterminada, a natureza da mutação per se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar ou otimizar o desempenho de uma mutação num dado sítio, mutagênese por varredura de alanina ou aleatória pode ser conduzindo num códon ou região alvo, e o variantes de construto de anticorpo expressas são varridas para a combinação ideal de atividade desejada. Técnicas para fazer mutações de substituição em sítios predeterminados no DNA

tendo uma sequência conhecida são bem conhecidas, por exemplo, mutagênese por primer M13 e mutagênese por PCR. A varredura dos mutantes é feita usando ensaios de atividade de ligação de antígeno, como ligação de antígeno da superfície da célula alvo ou CD3.

[00201] Em geral, se aminoácidos são substituídos numa ou mais ou em todas as CDRs da cadeia pesada e/ou leve, é preferencial que a sequência "substituída" então obtida seja pelo menos 60% ou 65%, com mais preferência 70% ou 75%, ainda com mais preferência 80% ou 85%, particularmente, e mais particularmente, de preferência, 90% a 95% idêntica à sequência de CDR "original". Isto significa que é dependente do comprimento da CDR no qual é idêntica à sequência "substituída". Por exemplo, uma CDR tendo 5 aminoácidos é, de preferência, 80% idêntica a sua sequência substituída a fim de ter pelo menos um aminoácido substituído. Conseqüentemente, as CDRs do construto de anticorpo podem ter diferentes graus de identidade em relação a suas sequências substituídas, por exemplo, CDRL1 pode ter 80%, enquanto CDRL3 pode ter 90%.

[00202] Substituições preferenciais (ou reposições) são substituições conservativas. Entretanto, qualquer substituição (incluindo substituição não conservativa ou uma ou mais das "substituições exemplificadoras" listadas na Tabela 3, abaixo) está prevista desde que o construto de anticorpo retém sua capacidade de se ligar ao antígeno da superfície da célula alvo através do primeiro domínio de ligação e a CD3, respectivamente, CD3 épsilon através do segundo domínio e/ou suas CDRs têm uma identidade em relação à sequência então substituída (pelo menos 60% ou 65%, com

mais preferência 70% a 75%, ainda com mais preferência 80% a 85%, e particularmente, de preferência, 90% a 95% idêntica à sequência de CDR "original").

[00203] Substituições conservativas são mostradas na Tabela 3 sob o cabeçalho de "substituições preferenciais". Se tais substituições resultam numa mudança na atividade biológica, então mudanças mais substanciais, denominadas "substituições exemplificadoras" na Tabela 3, ou como adicionalmente descrito abaixo em referência a classes de aminoácido, podem ser introduzidas e os produtos varridos para uma característica desejada.

Tabela 3: Substituições de aminoácido

Original	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferenciais
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucina, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala

Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

[00204] Modificações substanciais nas propriedades biológicas do construto de anticorpo da presente invenção são realizadas selecionando substituições que diferem significativamente em seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da estrutura principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação helicoidal ou de chapa, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio-alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base nas propriedades de cadeia lateral comum: (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr, asn, gln; (3) ácido: asp, glu; (4) básica: his, lys, arg; (5) resíduos que influenciam orientação de cadeia: gly, pro; e (6) aromática: trp, tyr, phe.

[00205] Substituições não conservadoras irá implicar na troca de um membro de uma destas classes por outra classe. Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação apropriada do construto de anticorpo pode ser substituído, geralmente com serina, para aprimorar a estabilidade oxidante da molécula e evitar reticulação anômala. Por outro lado, ligação (ou ligações) de cisteína pode ser adicionada ao anticorpo para aprimorar sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo for um fragmento de anticorpo como um fragmento de Fv).

[00206] Para sequências de aminoácidos, a identidade e/ou

similaridade de sequência é determinada usando técnicas padrão conhecidas na técnica, incluindo, sem limitação, o algoritmo de identidade de sequência local de Smith e Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, o algoritmo de alinhamento de identidade de sequências de Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, a busca pelo método de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA* 85:2444, implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), o programa de sequências Best Fit descrito por Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, de preferência usando as definições padrão, ou por inspeção. De preferência, o percentual de identidade é calculado por FastDB com base nos seguintes parâmetros: penalidade de disparidade de 1; penalidade de lacuna de 1; penalidade de tamanho de lacuna de 0,33; e penalidade de união de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, páginas 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

[00207] Um exemplo de um algoritmo útil é PILEUP. PILEUP cria um alinhamento de sequência múltipla de um grupo de sequências relacionadas usando alinhamentos em pares progressivo. O mesmo também pode plotar uma árvore mostrando as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento. PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; o método é similar àquele descrito por Higgins e Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Parâmetros de PILEUP úteis incluindo

um peso de lacuna padrão de 3,00, uma comprimento de lacuna padrão de 0,10 e lacunas de extremidade ponderada.

[00208] Outro exemplo de algoritmo útil é o algoritmo BLAST, descrito em: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; e Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:5873-5787. Um programa BLAST particularmente útil é o programa WU-BLAST-2 que foi obtido junto à Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 usa diversos parâmetros de pesquisa, a maioria dos mesmos é definida nos valores padrão. Os parâmetros ajustáveis são definidos com os seguintes valores: período de sobreposição =1, fração de sobreposição=0,125, limite de palavra (T)=II. Os parâmetros HSP S e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa dependendo da composição da sequência particular e da composição da base de dados particular contra a qual a sequência de interesse está sendo pesquisada; entretanto, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade.

[00209] Um algoritmo útil adicional é BLAST dotado de lacuna conforme relatado por Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST dotado de lacuna usa classificações de substituição BLOSUM-62; parâmetro T limiar definido em 9; o método de dois acertos para disparar extensões não dotadas de lacuna, cobrar comprimentos de lacuna de k um custo de $10+k$; Xu definido em 16, e Xg definido em 40 para estágio de pesquisa de base de dados e em 67 para estágio de saída dos algoritmos. Alinhamentos dotados de lacuna são disparados por uma classificação correspondendo a cerca de 22 bits.

[00210] Em geral, a homologia, similaridade ou identidade de aminoácido entre CDRs variantes individuais ou sequências VH / VL são pelo menos 60% em relação às sequências representadas no presente documento, e mais tipicamente com homologias ou identidades preferencialmente crescentes de pelo menos 65% ou 70%, com mais preferência pelo menos 75% ou 80%, ainda com mais preferência pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e quase 100%. De maneira similar, "percentual (%) de identidade de sequência de ácidos nucleicos" em relação à sequência de ácidos nucleicos das proteínas de ligação identificadas no presente documento é definido como a percentagem de resíduos de nucleotídeo numa sequência candidato que são idênticos aos resíduos de nucleotídeo na sequência de codificação do construto de anticorpo. Um método específico utiliza o módulo BLASTN de WU-BLAST-2 definido nos parâmetros padrão, com período de sobreposição e fração de sobreposição definidos em 1 e 0,125, respectivamente.

[00211] Em geral, a homologia, similaridade ou identidade de sequência de ácido nucleico entre as sequências de nucleotídeos que codificam CDRs variantes individuais ou sequências VH / VL e as sequências de nucleotídeos representadas no presente documento são pelo menos 60%, e mais tipicamente com homologias e identidades preferencialmente crescentes de pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, e quase 100%. Assim, uma "CDR variante" ou "região VH / VL variante" é uma com a homologia, similaridade ou identidade especificada em relação à CDR / VH / VL parental da invenção, e compartilha

função biológica, incluindo, sem limitação, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da especificidade e/ou atividade da CDR ou VH / VL parental.

[00212] Em uma modalidade, a percentagem de identidade em relação à linha germinativa humana dos construtos de anticorpo de acordo com a invenção é $\geq 70\%$ ou $\geq 75\%$, com mais preferência $\geq 80\%$ ou $\geq 85\%$, ainda com mais preferência $\geq 90\%$, e com máxima preferência $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$ ou mesmo $\geq 96\%$. Pensa-se que a identidade em relação a produtos de gene de linha germinativa de anticorpo humano é um recurso importante para reduzir o risco de proteínas terapêuticas elicitar uma imunoresposta contra o fármaco no paciente durante o tratamento. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) demonstram que a redução de porções não humanas de construtos de anticorpo de fármaco leva a uma diminuição do risco de induzir anticorpos antifármaco nos pacientes durante o tratamento. Comparando um número exaustivo de fármacos de anticorpo clinicamente avaliados e os respectivos dados de imunogenicidade, a tendência é mostrada que a humanização das regiões V de anticorpos torna a proteína menos imunogênica (média 5,1% de pacientes) do que anticorpos portando regiões V não humanas inalteradas (média 23,59% de pacientes). Um grau de identidade mais elevado em relação a sequências humanas é, daí, desejável para terapêuticos de proteína na base de região V sob a forma de construtos de anticorpo. Para este propósito de determinação da identidade de linha germinativa, a regiões V de VL podem ser alinhadas às sequências de aminoácidos de segmentos V e

segmentos J de linha germinativa humana (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) usando software Vector NTI e a sequência de aminoácidos calculada dividindo os resíduos de aminoácido idênticos pelo número total de resíduos de aminoácido da VL em percentual. O mesmo pode ser para os segmentos VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) com a exceção de que a CDR3 VH pode ser excluída devido a sua alta densidade e a uma carência de parceiros de alinhamento de CDR3 VH de linha germinativa humana. Técnicas recombinantes podem ser, então, usadas para aumentar a identidade de sequência a genes de linha germinativa de anticorpo humano.

[00213] Em uma modalidade adicional, os construtos de anticorpo biespecífico da presente invenção exibem altos rendimentos de monômero sob condições de escala de pesquisa padrão, por exemplo, num processo de purificação de duas etapas padrão. De preferência, o rendimento de monômero dos construtos de anticorpo de acordo com a invenção é $\geq 0,25$ mg/l de sobrenadante, com mais preferência $\geq 0,5$ mg/l, ainda com mais preferência ≥ 1 mg/l, e com máxima preferência ≥ 3 mg/l de sobrenadante.

[00214] Da mesma forma, o rendimento do isoformas de construto de anticorpo dimérico e, daí, a percentagem de monômero (isto é, $\text{monômero} : (\text{monômero} + \text{dímero})$) dos construtos de anticorpo podem ser determinados. A produtividade de construtos de anticorpo monoméricos e diméricos e a percentagem de monômero calculada podem ser, por exemplo, obtidas na etapa de purificação de SEC de sobrenadantes de cultura de padrão de escala de pesquisa padronizada em garrafas cilíndricas. Em uma modalidade, a percentagem de monômero dos construtos de anticorpo é $\geq 80\%$,

com mais preferência $\geq 85\%$, ainda com mais preferência $\geq 90\%$, e com máxima preferência $\geq 95\%$.

[00215] Em uma modalidade, os construtos de anticorpo têm uma estabilidade de plasma preferencial (razão de EC50 com plasma para EC50 s/c plasma) de ≤ 5 ou ≤ 4 , com mais preferência $\leq 3,5$ ou ≤ 3 , ainda com mais preferência $\leq 2,5$ ou ≤ 2 , e com máxima preferência $1,5$ ou ≤ 1 . A estabilidade de plasma de um construto de anticorpo pode ser testada pela incubação do construto em plasma humano a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas seguido de determinação de EC50 num ensaio de citotoxicidade de liberação de cromo ⁵¹. As células efetoras no ensaio de citotoxicidade podem ser células T positivas de CD8 humano enriquecidas estimuladas. As células alvo podem ser, por exemplo, células de CHO transfectadas com antígeno da superfície da célula alvo humano. A razão entre célula efetora e célula-alvo (E:T) pode ser escolhida como 10:1. O agrupamento de plasma humano usado para este propósito é derivado do sangue de doadores saudáveis coletados por seringas revestidas com EDTA. Componentes celulares são removidos por centrifugação e a fase de plasma superior é coletada e, subsequentemente, agrupada. Como controle, construtos de anticorpo são diluídos imediatamente antes do ensaio de citotoxicidade em meio RPMI-1640. A estabilidade de plasma é calculada como uma razão entre EC50 (após a incubação de plasma) e EC50 (controle).

[00216] É adicionalmente preferencial que a conversão de monômero em dímero de construtos de anticorpo da invenção seja pequena. A conversão pode ser medida sob diferentes condições e analisada por cromatografia por exclusão de tamanho de alto desempenho. Por exemplo, a incubação das

isoformas monoméricas dos construtos de anticorpo pode ser executada por 7 dias a 37 °C e concentrações de, por exemplo, 100 µg/mL ou 250 µg/mL numa incubadora. Sob estas condições, é preferencial que os construtos de anticorpo da invenção mostrem uma percentagem de dímero que é $\leq 5\%$, com mais preferência $\leq 4\%$, ainda com mais preferência $\leq 3\%$, ainda com mais preferência $\leq 2,5\%$, ainda com mais preferência $\leq 2\%$, ainda com mais preferência $\leq 1,5\%$, e com máxima preferência $\leq 1\%$ ou $\leq 0,5\%$ ou mesmo 0%.

[00217] Também é preferencial que os construtos de anticorpo biespecífico da presente invenção apresentem conversão de dímero muito baixa após inúmeros ciclos de congelamento/descongelamento. Por exemplo, o monômero de construto de anticorpo é ajustado para uma concentração de 250 µg/mL, por exemplo, em tampão de formulação genérica e submetido a ciclos de congelamento/descongelamento (congelando a -80 °C por 30 min seguido de descongelamento por 30 min à temperatura ambiente), seguido de SEC de alto desempenho para determinar a percentagem de construto de anticorpo inicialmente monomérico, que foi convertido em construto de anticorpo dimérico. De preferência, as porcentagens de dímero dos construtos de anticorpo biespecífico são $\leq 5\%$, com mais preferência $\leq 4\%$, ainda com mais preferência $\leq 3\%$, ainda com mais preferência $\leq 2,5\%$, ainda com mais preferência $\leq 2\%$, ainda com mais preferência $\leq 1,5\%$, e com máxima preferência $\leq 1\%$, ou mesmo $\leq 0,5\%$, por exemplo, após três ciclos de congelamento/descongelamento.

[00218] Os construtos de anticorpo biespecífico da presente invenção mostram preferencialmente uma termoestabilidade favorável com temperaturas de agregação

acima de ≥ 45 °C ou ≥ 50 °C, com mais preferência ≥ 52 °C ou ≥ 54 °C, ainda com mais preferência ≥ 56 °C ou ≥ 57 °C, e com máxima preferência ≥ 58 °C ou ≥ 59 °C. O parâmetro de termoestabilidade pode ser determinado em termos de temperatura de agregação de anticorpo da seguinte maneira: solução de anticorpo a uma concentração 250 µg/mL é transferida para uma cubeta de uso único e colocada em dispositivo de Dispersão de Luz Dinâmico (DLS). A amostra é aquecida de 40 °C para 70 °C a uma taxa de aquecimento de 0,5 °C/min com aquisição constante do raio medido. O aumento do raio indicando fusão da proteína e agregação é usado para calcular a temperatura de agregação do anticorpo.

[00219] Alternativamente, curvas de fusão de temperatura podem ser determinadas por calorimetria de varredura diferencial (DSC) para determinar estabilidades de proteína biofísica intrínsecas do construtos de anticorpo. Estes experimentos são realizados usando um dispositivo VP-DSC MicroCal LLC (Northampton, MA, EUA). A absorção de energia de uma amostra contendo um construto de anticorpo é registrada de 20 °C para 90 °C em comparação com uma amostra contendo apenas o tampão de formulação. Os construtos de anticorpo são ajustados para uma concentração final de 250 µg/mL, por exemplo, em tampão de corrida de SEC. Para registro da respectiva curva de fusão, a temperatura geral da amostra é aumentada gradualmente. Em cada temperatura T, a absorção de energia da amostra e da referência de tampão de formulação é registrada. A diferença na absorção de energia C_p (kcal/mol/°C) da amostra menos a referência é plotada contra a respectiva temperatura. A temperatura de fusão é definida como a temperatura no primeiro máximo de

absorção de energia.

[00220] Também é previsto que os construtos de anticorpo biespecífico de antígeno da superfície da célula alvo CD3 da invenção tenham uma turbidez (conforme medido por OD340 após concentração de construto de anticorpo monomérico purificado a 2,5 mg/mL e incubação de um dia para o outro) de $\leq 0,2$, de preferência de $\leq 0,15$, com mais preferência de $\leq 0,12$, ainda com mais preferência de $\leq 0,1$, e com máxima preferência de $\leq 0,08$.

[00221] Em uma modalidade adicional, o construto de anticorpo de acordo com a invenção é estável a pH ácido. Quanto mais tolerante o construto de anticorpo se comportar em pH não fisiológico como pH 5,5 (um pH que é necessário para executar, por exemplo, uma cromatografia de troca iônica) ou abaixo, tal como pH 4,0 a 5,5, maior é a recuperação do construto de anticorpo eluído de uma coluna de troca iônica em relação à quantidade total de proteína carregada. A recuperação do construto de anticorpo de uma coluna de troca iônica (por exemplo, cátion) a pH 5,5 é, de preferência, $\geq 30\%$, com mais preferência $\geq 40\%$, com mais preferência $\geq 50\%$, ainda com mais preferência $\geq 60\%$, ainda com mais preferência $\geq 70\%$, ainda com mais preferência $\geq 80\%$, ainda com mais preferência $\geq 90\%$, ainda com mais preferência $\geq 95\%$ e com máxima preferência $\geq 99\%$.

[00222] Ademais, é previsto que os construtos de anticorpo biespecífico da presente invenção exibam eficácia terapêutica ou atividade antitumoral. Isto pode, por exemplo, ser analisado num estudo conforme revelado no exemplo a seguir de um modelo de xenoenxerto de tumor humano de estágio avançado:

[00223] O perito na técnica sabe como modificar ou adaptar certos parâmetros deste estudo, como o número de células de tumor injetadas, o sítio de injeção, o número de células T humanas transplantadas, a quantidade de construtos de anticorpo biespecífico a ser administrada e as linhas do tempo, enquanto ainda chega a um resultado significativo e reproduzível. De preferência, a inibição de crescimento de tumor T/C [%] é ≤ 70 ou ≤ 60 , com mais preferência ≤ 50 ou ≤ 40 , ainda com mais preferência ≤ 30 ou ≤ 20 e com máxima preferência ≤ 10 ou ≤ 5 ou mesmo $\leq 2,5$.

[00224] Em uma modalidade preferida do construto de anticorpo da invenção, o construto de anticorpo é um construto de anticorpo de cadeia única.

[00225] Também em uma modalidade preferida, o construto de anticorpo da invenção compreende em um domínio HLE com uma ordem amino a carboxilo:

[00226] dobradiça-CH2-CH3-ligante-dobradiça-CH2-CH3.

[00227] Ainda em uma modalidade da invenção, o domínio CH2 de um ou preferencialmente cada um (ambos) monômeros polipeptídicos do terceiro domínio compreende uma ponte de dissulfureto de cisteína de domínio intra. Como conhecido na técnica, o termo "ponte de dissulfureto de cisteína" refere-se a um grupo funcional com a estrutura geral $R-S-S-R$. A ligação é também designada por uma SS-ligação ou uma ponte de dissulfureto e é derivada pelo acoplamento de dois grupos tiol de resíduos de cisteína. É particularmente preferido para o construto de anticorpo da presente invenção que as cisteínas que formam a ponte de dissulfureto de cisteína no construto de anticorpo maduro são introduzidas na sequência de aminoácidos do domínio CH2 correspondente a 309 e 321

(numeração de Kabat).

[00228] Em uma modalidade da invenção, um sítio de glicosilação na posição 314 de Kabat do domínio CH2 é removido. É preferido que esta remoção do sítio de glicosilação seja conseguida por uma substituição N314X, em que X é qualquer aminoácido excluindo Q. A referida substituição é preferencialmente uma substituição N314G. Em uma modalidade mais preferida, o referido domínio CH2 compreende, adicionalmente, as seguintes substituições (posição de acordo com Kabat) V321C e R309C (estas substituições introduzem a ponte de dissulfureto de cisteína de domínio intra em Kabat posições 309 e 321).

[00229] Assume-se que as características preferidas do construto de anticorpo da invenção comparadas, por exemplo, com o construto de anticorpo heteroFc biespecífico conhecido na técnica (figura 1b) podem estar inter alia relacionadas com a introdução das modificações acima descritas no domínio CH2. Assim, prefere-se para o construto da invenção que os domínios CH2 do terceiro domínio do construto de anticorpo da invenção compreenda ponte de dissulfureto de cisteína de domínio intra nas posições Kabat 309 e 321 e/ou o sítio de glicosilação na posição de Kabat 314 é removido por uma substituição N314X como acima, de preferência por uma substituição N314G.

[00230] Em uma outra modalidade preferida da invenção, os domínios CH2 do terceiro domínio do construto de anticorpo da invenção compreenda ponte de dissulfureto de cisteína de domínio intra nas posições Kabat 309 e 321 e o sítio de glicosilação na posição de Kabat 314 é removido por uma substituição N314G.

[00231] Em uma modalidade, a invenção fornece um construto de anticorpo, em que:

(i) o primeiro domínio compreender dois domínios variáveis de anticorpo e o segundo domínio compreender dois domínios variáveis de anticorpo;

(ii) o primeiro domínio compreender um domínio variável de anticorpo e o segundo domínio compreender dois domínios variáveis de anticorpo;

(iii) o primeiro domínio compreender dois domínios variáveis de anticorpo e o segundo domínio compreender um domínio variável de anticorpo; ou

(iv) o primeiro domínio compreender um domínio variável de anticorpo e o segundo domínio compreender um domínio variável de anticorpo.

[00232] Por conseguinte, o primeiro e o segundo domínio podem ser domínios de ligação que compreendem cada um dois domínios variáveis de anticorpos, tais como um domínio VH e um VL. Exemplos de tais domínios de ligação que compreendem dois domínios variáveis de anticorpo, quando aqui descritos acima, e compreendem, por exemplo fragmentos Fv, fragmentos scFv ou fragmentos Fab descritos acima. Alternativamente, um ou ambos os domínios de ligação podem compreender apenas um único domínio variável. Exemplos para tais domínios de ligação de domínio único, quando aqui descritos acima, e compreendem por exemplo, nanocorpos ou anticorpos de domínio variável único compreendendo apenas um domínio variável, que pode ser VHH, VH ou VL, que se ligam especificamente a um antígeno ou epítipo independentemente de outras regiões ou domínios V.

[00233] Em uma modalidade preferida do construto de

anticorpo da presente invenção, o primeiro e segundo domínios estão fundidos com o terceiro domínio através de um ligante peptídico. O ligante peptídico preferido foi descrito aqui acima e é caracterizado pela sequência de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, ou seja, Gly₄Ser, ou seus polímeros, ou seja (Gly₄Ser)_x, em que x é um número inteiro de 1 ou maior (por exemplo, 2 ou 3).

[00234] Em um aspecto da invenção, o antígeno de superfície da célula alvo ligada pelo primeiro domínio é um antígeno tumoral, um antígeno específico para um distúrbio imunológico ou um antígeno viral. O termo "antígeno tumoral", tal como aqui utilizado, pode ser entendido como os antígenos que são apresentados nas células tumorais. Esses antígenos podem ser apresentados na superfície celular com uma parte extracelular, que é frequentemente combinada com uma parte transmembranar e citoplasmática da molécula. Esses antígenos podem às vezes ser apresentados apenas pelas células tumorais e nunca pelas células normais. Antígenos tumorais podem ser exclusivamente expressos em células tumorais ou podem representar uma mutação específica do tumor em comparação com células normais. Neste caso, eles são chamados de antígenos específicos do tumor. Mais comuns são os antígenos que são apresentados por células tumorais e células normais, e são chamados de antígenos associados a tumores. Estes antígenos associados a tumores podem ser sobre-expressos em comparação com células normais ou são acessíveis para a ligação de anticorpos em células tumorais devido à estrutura menos compacta do tecido tumoral em comparação com o tecido normal. Exemplos não limitantes de antígenos tumorais, tal como aqui utilizados, são CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19,

FLT3, DLL3, CDH3, BCMA e PSMA.

[00235] Está previsto que o construto de anticorpo da invenção, o antígeno tumoral é selecionado do grupo consistindo em CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA e PSMA.

[00236] No contexto da presente invenção, um exemplo para um construto de anticorpo biespecífico direcionado contra CD19 é um construto de anticorpo que possui as CDRs, como representado nas SEQ ID NOs: 1 a 6. O domínio de ligação a CD3 é caracterizado pelas CDRs, como representadas nas SEQ ID NOs 9 a 14. Um exemplo particular no contexto da presente invenção é um construto de anticorpo biespecífico de CD19xCD3. No contexto da presente invenção, um exemplo para um construto de anticorpo HLE biespecífico direcionado contra CD19 é um construto de anticorpo que possui as CDRs, como representado nas SEQ ID NOs: 102 a 104 e 106 a 108. Um exemplo particular no contexto da presente invenção é um construto de anticorpo biespecífico BCMAxCD3. No contexto da presente invenção, um exemplo para um construto de anticorpo biespecífico direcionado contra CD33 é um construto de anticorpo que possui as CDRs, como representado nas SEQ ID NOs: 29 a 31 e 34 a 36. Um exemplo particular no contexto da presente invenção é um construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3. No contexto da presente invenção, um exemplo para um construto de anticorpo HLE biespecífico direcionado contra CD33 é um construto de anticorpo que possui as CDRs, como representado nas SEQ ID NOs: 29 a 31 e 34 a 36. Um exemplo particular no contexto da presente invenção é um construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3, compreendendo um terceiro domínio para HLE. No contexto da presente

invenção, um exemplo para um construto de anticorpo biespecífico direcionado contra EGFRvIII é um construto de anticorpo que possui as CDRs, como representado nas SEQ ID NOs: 42 a 47. Um exemplo particular no contexto da presente invenção é um construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3.

[00237] Em um aspecto, o construto de anticorpo da invenção é caracterizado por possuir uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

- | | | |
|-----|----------------------------------------------|----------|
| (a) | SEQ ID NOs: 37 a 41; | CD33 |
| (b) | SEQ ID NOs: 51 e 52; | EGFRvIII |
| (c) | SEQ ID NOs: 62, 63 e 64; | MSLN |
| (d) | SEQ ID NOs: 74 a 82 | CDH19 |
| (e) | SEQ ID NOs: 103 e 103 | DLL3 |
| (f) | SEQ ID NOs: 17, 113 e 114 | CD19 |
| (g) | SEQ ID NOs: 92 e 93 | FLT3 |
| (h) | SEQ ID NOs: 124 e 125 | CDH3 |
| (i) | SEQ ID NOs: 135 e 136 | BCMA |
| (j) | SEQ ID Nos: 146 a 151, 161 a 168 e 176 a 181 | PSMA |

[00238] Qualquer um dos construtos de anticorpo biespecífico anteriores pode ou não ser fornecido com um terceiro domínio, que é um domínio de meia-vida prolongada, que preferencialmente é um domínio scFc ou um domínio heteroFc ou um domínio de ligação à albumina.

[00239] A invenção fornece ainda uma molécula de ácido nucleico/polinucleotídeo que codifica um construto de anticorpo da invenção. Um polinucleotídeo é um biopolímero composto por 13 ou mais monômeros de nucleotídeo covalentemente ligados numa cadeia. DNA (como cDNA) e RNA (como mRNA) são exemplos de polinucleotídeos com função

biológica distinta. Nucleotídeos são moléculas orgânicas que servem como os monômeros ou subunidades de moléculas de ácido nucleico como DNA ou RNA. A molécula de ácido nucleico ou polinucleotídeo pode ser de filamento duplo ou de filamento simples, linear e circular. A mesma está, de preferência, compreendida num vetor que está, de preferência, compreendido numa célula hospedeira. A referida célula hospedeira é, por exemplo, após a transformação ou transfecção com o vetor ou o polinucleotídeo da invenção, capaz de expressar o construto de anticorpo. Para este propósito, o polinucleotídeo ou molécula de ácido nucleico é operativamente ligado a sequências de controle.

[00240] O código genético é o conjunto de regras pelo qual informações codificadas no material genético (ácidos nucleicos) são traduzidas em proteínas. A decodificação biológica em células vivas é realizada pelo ribossoma que liga aminoácidos numa ordem especificada por mRNA, usando moléculas de tRNA para portar aminoácidos e ler os três nucleotídeos de mRNA de uma vez. O código define como sequências destes tripletos de nucleotídeo, chamados de códons, especificam qual aminoácido será adicionado posteriormente durante a síntese de proteína. Com algumas exceções, um códon de três nucleotídeos numa sequência de ácidos nucleicos especifica um aminoácido único. Devido ao fato de que a grande maioria de genes é codificada exatamente com o mesmo código, este código particular é frequentemente referido como o código genético canônico ou padrão. Enquanto o código genético determina a sequência de proteína para uma dada região de codificação, outras regiões genômicas podem influenciar quando e onde estas proteínas são produzidas.

[00241] Ademais, a invenção fornece um vetor compreendendo um polinucleotídeo/molécula de ácido nucleico da invenção. Um vetor é um molécula de ácido nucleico usada como um veículo para transferir material genético (estranho) para uma célula. O termo "vetor" abrange - sem limitação - plasmídeos, vírus, cosmídeos e cromossomos artificiais. Em geral, vetores geneticamente modificados compreendem uma origem de replicação, um sítio de multiclonagem e um marcador selecionável. O próprio vetor é geralmente uma sequência de nucleotídeos, comumente uma sequência de DNA, que compreende um inserto (transgene) e uma sequência maior que serve como a "estrutura principal" do vetor. Vetores modernos podem abranger recursos adicionais além do inserto de transgene e uma estrutura principal: promotor, marcador genético, resistência a antibiótico, gene repórter, sequência de direcionamento, etiqueta de purificação de proteína. Vetores chamados de vetores de expressão (construtos de expressão) especificamente são para a expressão do transgene na célula-alvo, e geralmente têm sequências de controle.

[00242] O termo "sequências de controle" se refere a sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operativamente ligada num organismo hospedeiro particular. As sequências de controle que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um lado de ligação de ribossoma. Células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de poliadenilação e acentuadores.

[00243] Um ácido nucleico é "operativamente ligado" que é colocado numa relação funcional com outra sequência de

ácidos nucleicos. Por exemplo, DNA para uma pré-sequência ou líder secretor é operativamente ligado a DNA para um polipeptídeo se é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou acentuador é operativamente ligado a uma sequência de codificação se afetar a transcrição da sequência; ou um lado de ligação de ribossoma é operativamente ligado a uma sequência de codificação se é posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "operativamente ligado" significa que as sequências de DNA sendo ligadas são contíguas e, no caso de um líder secretor, contíguo e em fase de leitura. Entretanto, acentuadores não precisam ser contíguos. A ligação é realizada pela ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os ligantes ou adaptadores de oligonucleotídeo sintético são usados de acordo com a prática convencional.

i. "Transfecção" é o processo de introdução deliberada de moléculas de ácido nucleico ou polinucleotídeos (incluindo vetores) em células-alvo. O termo é mais frequentemente usado para métodos não virais em células eucarióticas. A transdução é frequentemente usada para descrever transferência mediada por vírus de moléculas de ácido nucleico ou polinucleotídeos. A transfecção de células animais tipicamente envolve abrir poros ou "furos" transientes na membrana celular, para permitir a absorção de material. A transfecção pode ser executada usando fosfato de cálcio, por eletroporação, por compressão de célula ou misturando um lipídio catiônico com o material para produzir lipossomas, que se fundem com a membrana celular e depositam sua carga dentro.

[00244] O termo "transformação" é usado para descrever transferência não viral de moléculas de ácido nucleico ou polinucleotídeos (incluindo vetores) em bactérias e, além disso, em células eucarióticas não animal, incluindo células vegetais. A transformação é, daí, a alteração genética de uma célula eucariótica bacteriana ou não animal resultando da absorção direta através da membrana celular (ou membranas) de suas adjacências e a incorporação subsequente de material genético exógeno (moléculas de ácido nucleico). A transformação pode ser efetuada por meios artificiais. Para que a transformação aconteça, as células ou bactérias devem estar num estado de competência, que pode ocorrer como uma resposta limitada por tempo a condições ambientais como densidade de célula e inanição.

[00245] Ademais, a invenção fornece uma célula hospedeira transformada ou transfectada com o polinucleotídeo/molécula de ácido nucleico ou com o vetor da invenção. Conforme usado no presente documento, os termos "célula hospedeira" ou "célula receptora" se destinam a incluir toda célula individual ou cultura celular que pode ser ou que foi receptora de vetores, moléculas de ácido nucleico exógenas, e polinucleotídeos que codificam o construto de anticorpo da presente invenção; e/ou receptoras do próprio construto de anticorpo. A introdução do respectivo material na célula é executada por meio de transformação, transfecção e similares. O termo "célula hospedeira" também se destina a incluir progênie ou progênie em potencial de uma célula simples. Devido ao fato de que certas modificações podem ocorrer em sucessivas gerações devido à mutação natural, acidental ou deliberada ou devido a influências ambientais,

tal progênie não pode, de fato, ser completamente idêntica (em morfologia ou complemento de DNA genômico ou total) à célula parental, mas ainda está incluída no escopo do termo conforme usado no presente documento. Células hospedeiras adequadas incluem células procarióticas ou eucarióticas, e também incluem, sem limitação, bactérias, células de levedura, células fúngicas, células vegetais e células animais como células de inseto e células de mamífero, por exemplo, murino, rato, macaco ou ser humano.

[00246] O construto de anticorpo da invenção pode ser produzido em bactérias. Após expressão, o construto de anticorpo da invenção é isolado da pasta de célula de *E. coli* numa fração solúvel e pode ser purificado através de, por exemplo, cromatografia por afinidade e/ou exclusão de tamanho. A purificação final pode ser executada de modo similar ao processo para purificar anticorpo expressado, por exemplo, em células de CHO.

[00247] Além de procariotas, micróbios eucarióticos como fungos filamentosos ou levedura são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para o construto de anticorpo da invenção. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de cozinheiro comum, é a mais comumente usada dentre microrganismos hospedeiros eucarióticos inferiores. No entanto, vários outros gêneros, espécies e estirpes estão aqui comumente disponíveis e úteis, tais como *Schizosaccharomyces pombe*, hospedeiro *Kluyveromyces*, tal como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183

070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; Schwanniomyces, tal como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos, tais como hospedeiros *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyopocladium* e *Aspergillus*, tal como *A. nidulans* e *A. niger*.

[00248] Células hospedeiras adequadas para a expressão de construto de anticorpo glicosilado da invenção são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrado incluem células vegetais e de inseto. Inúmeras cepas baculovirais e variantes e células hospedeiras de inserto permissivas correspondentes de hospedeiros, tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta), e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de cepas virais para transfecção está publicamente disponível, por exemplo, a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais vírus podem ser usados como o vírus no presente documento de acordo com a presente invenção, particularmente para a transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00249] Culturas celulares vegetais de algodão, milho, batata, feijão-soja, petúnia, tomate, *Arabidopsis* e tabaco também podem ser usadas como hospedeiros. Vetores de clonagem e expressão úteis na produção de proteínas em cultura celular vegetal são conhecidos pelos peritos na técnica. Ver, por exemplo, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, e Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

[00250] Entretanto, o interesse foi maior em células de vertebrado e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecido) se tornou um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens de célula hospedeira de mamífero úteis são linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embriogênica humana (293 ou 293 células subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CVI ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, 1413 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células de TRI (Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); células de MRC 5; células de FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

[00251] Em uma modalidade adicional, a invenção fornece um processo para a produção de um construto de anticorpo da invenção, o referido processo compreendendo cultivar uma célula hospedeira da invenção sob condições permitindo a expressão do construto de anticorpo da invenção e recuperar o construto de anticorpo produzido da cultura.

[00252] Conforme usado no presente documento, o termo "cultivar" se refere à manutenção, diferenciação,

crescimento, proliferação e/ou propagação *in vitro* de células sob condições adequadas num meio. O termo "expressão" inclui qualquer etapa envolvida na produção de um construto de anticorpo da invenção incluindo, sem limitação, transcrição, modificação pós-transcricional, tradução, modificação pós-translacional e secreção.

[00253] Usando técnicas recombinantes, o construto de anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico, ou diretamente secretado no meio. Se o construto de anticorpo for produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detrito particulados, ou células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) descreve um procedimento para isolar anticorpos que são secretados para o espaço periplásmico de *E. coli*. Em suma, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) ao longo de cerca de 30 min. Detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo é secretado para o meio, sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados usando um filtro de concentração de proteína disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease como PMSF pode ser incluído em qualquer uma das etapas anteriores para inibir proteólise e antibióticos podem ser incluídos para evitar o crescimento de contaminantes acidentais.

[00254] O construto de anticorpo da invenção preparado das células hospedeiras pode ser recuperado ou purificado

usando, por exemplo, cromatografia por hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia por afinidade. Outras técnicas para purificação de proteína como fracionamento numa coluna de troca iônica, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia numa resina de troca aniônica ou catiônica (como uma coluna de ácido poliaspártico), cromato-focalização, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio também estão disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado. Quando o construto de anticorpo da invenção compreender um domínio de CH3, a resina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) é útil para purificação.

[00255] Cromatografia por afinidade é uma técnica de purificação preferencial. A matriz a qual o ligante de afinidade é fixado é, mais frequentemente, agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis como vidro de poro controlado ou poli (estirenodivinil) benzeno permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos do que pode ser alcançado com agarose.

[00256] Adicionalmente, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um construto de anticorpo da invenção ou um construto de anticorpo produzido de acordo com o processo da invenção. É preferencial para a composição farmacêutica da invenção que a homogeneidade do construto de anticorpo seja $\geq 80\%$, mais preferencialmente $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, ou $\geq 85\%$, ainda preferencialmente $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$, ou $\geq 90\%$, ainda mais preferencialmente $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, ou $\geq 95\%$ e o mais preferencialmente

≥ 96%, ≥ 97%, ≥ 98% ou ≥ 99%.

[00257] Conforme usado no presente documento, o termo "composição farmacêutica" se refere a uma composição que é adequada para administração a um paciente, de preferência um paciente humano. A composição farmacêutica particularmente preferencial desta invenção compreende um ou uma pluralidade dos construtos de anticorpo da invenção, de preferência, numa quantidade terapeuticamente eficaz. De preferência, a composição farmacêutica compreende, ainda, formulações adequadas de um ou mais transportadores, estabilizadores, excipientes, diluentes, solubilizantes, tensoativos, emulsificantes, conservantes e/ou adjuvantes (farmaceuticamente eficazes). Constituintes aceitáveis da composição são, de preferência, não tóxicos a receptores nas dosagens e concentrações empregadas. Composições farmacêuticas da invenção incluem, sem limitação, composições líquidas, congeladas e liofilizadas.

[00258] As composições da invenção podem compreender um transportador farmacêuticamente aceitável. Em geral, conforme usado no presente documento, "transportador farmacêuticamente aceitável" significa qualquer solução aquosa e não aquosa, soluções estéreis, solventes, tampões, por exemplo, soluções salinas tamponadas com fosfato (PBS), água, suspensões, emulsões, como emulsões de óleo/água, vários tipos de agentes umectantes, lipossomas, meios de dispersão e revestimentos, que são compatíveis com administração farmacêutica, em particular, com administração parenteral. O uso de tais meios e agentes em composições farmacêuticas é bem conhecido na técnica, e as composições compreendendo tais transportadores podem ser formuladas por

métodos convencionais bem conhecidos.

[00259] Certas modalidades fornecem composições farmacêuticas compreendendo o construto de anticorpo da invenção e, adicionalmente, um ou mais excipientes como aqueles ilustrativamente descritos nesta seção e em outro lugar no presente documento. Excipientes podem ser usados na invenção neste aspecto para uma variedade de propósitos, como ajustar propriedades físicas, químicas ou biológicas de formulações, como ajuste de viscosidade, e/ou processos da invenção para aprimorar a eficácia ou para estabilizar tais formulações e processos contra a degradação e deterioração devido, por exemplo, a estresses que ocorrem durante a fabricação, transporte, armazenamento, preparação pré-uso, administração e depois disto.

[00260] Em certas modalidades, a composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para o propósito de modificação, manutenção ou preservação, por exemplo, do pH, osmolaridade, viscosidade, claridade, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição (consulte, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18a Edição, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). Em tais modalidades, materiais de formulação adequados podem incluir, sem limitação:

- aminoácidos, tais como glicina, alanina, glutamina, asparagina, treonina, prolina, 2-fenilalanina, incluindo aminoácidos carregados, preferencialmente, lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato e/ou histidina;

- antimicrobianos como agentes antibacterianos e antifúngicos;

- antioxidantes, tais como ácido ascórbico, metionina, sulfito de sódio ou hidrogenossulfito de sódio;

- tampões, sistemas tampão e agentes tamponantes, os quais são utilizados para manter a composição a um pH de cerca de 5,5 a 7,5, de preferência 6,5 a 7; exemplos de tampões são borato, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos, succinato, fosfato, histidina e acetato;

- solventes não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila;

- transportadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, suspensões ou emulsões incluindo solução salina e meios tamponados;

- polímeros biodegradáveis, tais como poliésteres;

- agentes de volume tais como manitol ou glicina;

- agentes quelantes tais como ácido etilendiaminotetracético (EDTA);

- agentes isotônicos e retardadores de absorção;

- agentes complexantes, tais como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina)

- enchimentos;

- monossacarídeos; dissacarídeos; e outros carboidratos (como glicose, manose ou dextrina); os carboidratos podem ser açúcares não redutores, preferencialmente, trealose, sacarose, octasulfato, sorbitol ou xilitol;

- proteínas (de baixo peso molecular), polipeptídeos ou transportadores proteínáceos, tais como albumina de soro humano ou bovino, gelatina ou imunoglobulinas,

preferencialmente, de origem humana;

- agentes corantes e flavorizantes;

- agentes redutores contendo enxofre, tais como glutatona, ácido tiocético, tioglicolato de sódio, tioglicerol, alfa-monotioglicerol e tiosulfato de sódio;

- agentes de diluição;

- agentes de emulsificação;

- polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona);

- contraíons formadores de sal, tal como o sódio;

- conservantes, tais como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes e semelhantes; exemplos são: cloreto de benzalcônio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerossal, álcool fenético, metilparabeno, propilparabeno, clor-hexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio);

- complexos metálicos, tais como complexos de Zn-proteína;

- solventes e cossolventes (tais como, glicerina, propilenoglicol ou polietilenoglicol);

- açúcares e álcoois de açúcar, tais como trealose, sacarose, octassulfato, manitol, sorbitol ou xilitol, estaquiase, manose, sorbose, xilose, ribose, mioiniositose, galactose, lactitol, ribitol, mioiniositol, galactitol, glicerol, ciclitolis (por exemplo, inositol), polietilenoglicol; e álcoois de açúcar poli-hídrico;

- agentes de suspensão;

- tensoativos ou agentes molhantes, tais como plurônicos, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbatos tais como polissorbato 20, polissorbato, tritão, trometamina,

lecitina, colesterol, tiloxapa; os tensoativos podem ser detergentes, preferencialmente, com um peso molecular de > 1,2 KD e/ou um poliéter, preferencialmente, com um peso molecular de > 3 KD; exemplos não limitativos para detergentes preferenciais são Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 e Tween 85; exemplos não limitativos para poliéteres preferenciais são PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 e PEG 5000;

- agentes que melhoram a estabilidade, tais como sacarose ou sorbitol;

- agentes intensificadores de tonicidade, tais como halogenetos de metais alcalinos, preferencialmente, cloreto de sódio ou potássio, manitol sorbitol;

- veículos de entrega parenteral incluindo solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e clorito de sódio, Ringer lactado ou óleos fixos;

- veículos de entrega intravenosa incluindo reabastecedores de fluido e nutriente, reabastecedores de eletrólito (como aqueles na dextrose de Ringer).

[00261] É evidente para os peritos na técnica que os diferentes constituintes da composição farmacêutica (por exemplo, aqueles listados acima) podem ter diferentes efeitos, por exemplo, e o aminoácido pode atuar como um tampão, um estabilizante e/ou um antioxidante; manitol pode atuar como um agente de volume e/ou um agente acentuador de tonicidade; cloreto de sódio pode atuar como veículo de entrega e/ou agente acentuador de tonicidade; etc.

[00262] É previsto que a composição da invenção possa compreender, além do polipeptídeo da invenção definido no presente documento, agentes biologicamente ativos adicionais, dependendo do uso previsto da composição. Tais

agentes podem ser fármacos atuando no sistema gastrointestinal, fármacos atuando como citoestática, fármacos evitando hiperuriquemia, fármacos inibindo imunorreações (por exemplo, corticosteroides), fármacos modulando a resposta inflamatória, fármacos atuando no sistema circulatório e/ou agentes como citoquinas conhecidos na técnica. É previsto também que o construto de anticorpo da presente invenção é aplicado numa coterapia, isto é, em combinação com outro medicamento anticâncer.

[00263] Em certas modalidades, a composição farmacêutica ideal será determinada por um perito na técnica dependendo, por exemplo, da via de administração prevista, formato de entrega e dosagem desejada. Consulte, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra. Em certas modalidades, tais composições podem influenciar o estado físico, a estabilidade, a taxa de liberação in vivo e taxa de depuração in vivo do construto de anticorpo da invenção. Em certas modalidades, o veículo ou transportador primário numa composição farmacêutica pode ser aquosa ou não aquosa na natureza. Por exemplo, um veículo ou transportador adequado pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebrospinal artificial, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica são veículos adicionalmente exemplificadores. Em certas modalidades, o construto de anticorpo das composições da invenção pode ser preparado para armazenamento misturando a composição selecionada tendo o grau de pureza desejado com agentes de formulação opcionais (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL

SCIENCES, supra) sob a forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Adicionalmente, em certas modalidades, o construto de anticorpo da invenção pode ser formulado como um liofilizado usando excipientes apropriados como sacarose.

[00264] Quando a administração parenteral é contemplada, as composições terapêuticas para uso nesta invenção podem ser fornecidas sob a forma de solução aquosa parenteralmente aceitável livre de pirogênio compreendendo o construto de anticorpo desejado da invenção num veículo farmacêuticamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parenteral é água destilada estéril na qual o construto de anticorpo da invenção é formulado como uma solução isotônica estéril apropriadamente preservada. Em certas modalidades, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, como microesferas injetáveis, partículas bioerodíveis, compostos poliméricos (como ácido poliláctico ou ácido poliglicólico), microesferas ou lipossomas, que podem fornecer liberação controlada ou sustentada do produto que pode ser entregue através de injeção de depósito. Em certas modalidades, ácido hialurônico também pode ser usado, tendo o efeito de promoção de duração sustentada na circulação. Em certas modalidades, dispositivos de entrega de fármaco implantáveis podem ser usados para introduzir o construto de anticorpo desejado.

[00265] Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para os peritos na técnica, incluindo formulações envolvendo o construto de anticorpo da invenção em formulações de liberação/entrega sustentada ou controlada. Técnicas de formulação de uma variedade de outros meios de entrega sustentada ou prolongada, como transportadores de

lipossoma, micropartículas bioerodíveis ou microesferas porosas e injeções de depósito, também são conhecidas pelos peritos na técnica. Consulte, por exemplo, o Pedido Internacional de Patente N° PCT/US93/00829, que descreve a liberação controlada de micropartícula poliméricas porosas para entrega de composições farmacêuticas. Preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis sob a forma de artigos conformados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactidas (conforme divulgado na Patente US N° 3,773,919 e na Publicação de Pedido de Patente N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 e Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno acetato de vinila (Langer et al., 1981, supra) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicação de Pedido de Patente N° EP 133,988). Composições de liberação sustentada também podem incluir lipossomas que podem ser preparados por qualquer um dentre diversos métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82:3688-3692; Publicações de Pedido de Patente N° EP 036,676; EP 088,046 e EP 143,949.

[00266] O construto de anticorpo também pode ser aprisionado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial (por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), em sistema de entrega de fármaco coloidal

(por exemplo, lipossoma, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edição, Oslo, A., Ed., (1980).

[00267] Composições farmacêuticas usadas para administração in vivo são tipicamente fornecidas como preparações estéreis. A esterilização pode ser realizada por filtração através de membranas de filtração estéril. Quando a composição é liofilizada, a esterilização usando este método pode ser conduzida ou antes ou após a liofilização e a reconstituição. Composições para administração parenteral podem ser armazenadas em forma liofilizada ou numa solução. Composições parenterais geralmente são colocadas num recipiente tendo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um frasco ou bolsa de solução intravenosa que tem um batente perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00268] Outro aspecto da invenção inclui auto tamponar construto de anticorpo das formulações da invenção, que podem ser usadas como composições farmacêuticas, conforme descrito no pedido internacional de patente WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599). Uma variedade de exposições está disponível em materiais de estabilização e de formulação de proteína e métodos úteis neste aspecto, como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), e Randolph et al., "Surfactant-protein

interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), consulte particularmente as partes pertinentes a excipientes e processos do mesmo para auto tamponar formulações de proteína de acordo com a presente invenção, especialmente em relação a produtos farmacêuticos de proteína e processos para uso médicos veterinário e/ou humano.

[00269] Sais podem ser usados de acordo com certas modalidades da invenção para, por exemplo, ajustar a força iônica e/ou a isotonicidade de uma formulação e/ou para aprimorar a solubilidade e/ou estabilidade física de uma proteína ou outro ingrediente de uma composição de acordo com a invenção. Como é bem conhecido, íons podem estabilizar o estado nativo de proteínas se ligando a resíduos carregados na superfície da proteína e protegendo grupos carregados e polares na proteína e reduzindo a força de suas interações eletrostáticas, interações atrativas e repulsivas. Íons também podem estabilizar o estado desnaturado de uma proteína se ligando, em particular, às ligações de peptídeo desnaturado (--CONH) da proteína. Adicionalmente, a interação iônica com grupos carregados e polares numa proteína também pode reduzir as interações eletrostáticas intermoleculares e, assim, evitar ou reduzir agregação e insolubilidade de proteína.

[00270] Espécie iônicas diferem significativamente em seus efeitos sobre proteínas. Inúmeras classificações categóricas de íons e seus efeitos sobre proteínas foram desenvolvidas que podem ser usadas na formulação de composições farmacêuticas de acordo com a invenção. Um exemplo é a série de Hofmeister, que classifica solutos iônicos e não iônicos polares por seu efeito sobre a

estabilidade conformacional de proteínas em solução. Os solutos de estabilização são mencionados como "cosmotrópicos". Os solutos de desestabilização são mencionados como "caotrópicos". Os cosmotrópicos são comumente usados em altas concentrações (por exemplo, sulfato de amônio de >1 molar) para precipitar as proteínas da solução ("salting-out"). Os caotrópicos geralmente são usados para prótese e/ou para solubilizar proteínas ("salting-in"). A eficácia relativa dos íons para "salt-in" e "salt-out" define sua posição na série Hofmeister.

[00271] Aminoácidos livres podem ser usados no construto de anticorpo das formulações da invenção de acordo com várias modalidades da invenção como agentes de volume, estabilizadores e antioxidantes, bem como outros usos padrão. Lisina, prolina, serina e alanina podem ser usados para estabilizar proteínas numa formulação. A glicina é útil na liofilização para garantir estrutura e propriedades de bolo corretas. A arginina pode ser útil para inibir agregação de proteína, tanto em formulações líquidas como em liofilizadas. A metionina é útil como um antioxidante.

[00272] Polióis incluem açúcares, por exemplo, manitol, sacarose e sorbitol e álcoois poli-hídricos como, por exemplo, glicerol e propileno glicol e, para propósitos de discussão no presente documento, polietileno glicol (PEG) e substâncias relacionadas. Polióis são cosmotrópicos. Os mesmos são agentes estabilizantes úteis tanto em formulações líquidas como em liofilizadas para proteger proteínas contra processos de degradação física e química. Polióis também são úteis para ajustar a tonicidade de formulações. Dentre polióis úteis nas modalidades selecionadas da invenção se

encontra manitol, comumente usado para garantir estabilidade estrutural do bolo em formulações liofilizadas. Isto garante estabilidade estrutural para o bolo. É geralmente usado com um lioprotetor, por exemplo, sacarose. Sorbitol e sacarose estão entre agentes preferenciais para ajustar a tonicidade e como estabilizadores para proteger contra estresses de congelamento-descongelamento durante o transporte ou a preparação de volumes durante os processo de fabricação. Açúcares redutores (que contêm grupos cetona ou aldeído livre), como glicose e lactose, podem glicar resíduos de arginina e lisina de superfície. Portanto, os mesmos não estão entre polióis preferenciais para uso de acordo com a invenção. Além disso, açúcares que foram tais espécies reativas, como sacarose, que é hidrolisada para frutose e glicose sob condições ácidas e, conseqüentemente, gera glicação, também não está dentro de polióis preferenciais da invenção neste aspecto. PEG é útil para estabilizar proteínas e como um crioprotetor e pode ser usado na invenção neste aspecto.

[00273] Modalidades do construto de anticorpo das formulações da invenção compreende adicionalmente tensoativos. Moléculas de proteína podem ser susceptíveis à adsorção em superfícies e à desnaturação e conseqüente agregação a interfaces ar-líquido, sólido-líquido e líquido-líquido. Estes efeitos geralmente aumentam inversamente com a concentração de proteína. Estas interações prejudiciais geralmente aumentam inversamente com a concentração de proteína e tipicamente são exacerbadas por agitação física, como aquela gerada durante o transporte e o manuseio de um produto. Tensoativos são usados rotineiramente para evitar,

minimizar ou reduzir adsorção de superfície. Tensoativos úteis na invenção neste aspecto incluem polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácido graxo de polietoxilato de sorbitano, e poloxâmero 188. Tensoativos também são comumente usados para controlar estabilidade conformacional de proteína. O uso de tensoativos neste aspecto é específico de proteína visto que qualquer dado tensoativo tipicamente estabilize algumas proteínas e desestabilize outras.

[00274] Polissorbatos são suscetíveis à degradação oxidativa e, com frequência, conforme suprido, contêm quantidades suficientes de peróxidos para causar oxidação de cadeias laterais de resíduo de proteína, especialmente metionina. Conseqüentemente, polissorbatos deveriam ser usados com cuidado e, quando usados, deveriam ser empregados em sua concentração eficaz mais baixa. Neste aspecto, polissorbatos exemplificam a regra geral que excipientes deveriam ser usados em suas concentrações eficazes mais baixas.

[00275] Modalidades do construto de anticorpo das formulações da invenção compreendem adicionalmente um ou mais antioxidantes. Até certo ponto, a oxidação prejudicial de proteínas pode ser evitada em formulações farmacêuticas mantendo níveis apropriados de oxigênio ambiente e temperatura e evitando a exposição à luz. Excipientes antioxidantes também podem ser usados para evitar degradação oxidante de proteínas. Dentre antioxidantes úteis neste aspecto são agentes redutores, sequestrante de radicais livres/oxigênio e agentes quelantes. Antioxidantes para uso em formulações de proteína terapêuticas de acordo com a

invenção preferencialmente são solúveis em água e mantêm sua atividade ao longo da vida de prateleira de um produto. EDTA é um antioxidante preferencial de acordo com a invenção neste aspecto. Antioxidantes podem danificar proteínas. Por exemplo, agentes redutores, como glutathiona, em particular, podem romper ligações dissulfeto intramoleculares. Deste modo, antioxidantes para uso na invenção são selecionados para, dentre outras coisas, eliminar ou suficientemente reduzir a possibilidade de danificar proteínas na formulação.

[00276] Formulações de acordo com a invenção podem incluir íons metálicos que são cofatores de proteína e que são necessários para formar complexos de coordenação de proteína, como zinco, necessários para formar certas suspensões de insulina. Íons metálicos também podem inibir alguns processos que degradam proteínas. Entretanto, íons metálicos também catalisam processos físico e químico que degradam proteínas. Íons de magnésio (10 a 120 mM) podem ser usados para inibir a isomerização de ácido aspártico em ácido isoaspártico. Os íons de Ca^{+2} (até 100 mM) podem aumentar a estabilidade de desoxirribonucleose humana. Mg^{+2} , Mn^{+2} , e Zn^{+2} , entretanto, podem desestabilizar rhDNase. De modo similar, Ca^{+2} e Sr^{+2} podem estabilizar Fator VIII, pode ser desestabilizado por Mg^{+2} , Mn^{+2} and Zn^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} , e sua agregação pode ser aumentada por íons de Al^{+3} .

[00277] Os construtos de anticorpo divulgados no presente documento também podem ser formulados como imunolipossomas. Um "lipossomo" é uma vesícula pequena composta de vários tipos de lipídios, fosfolipídios e/ou tensoativos que sejam úteis para administrar um fármaco a um mamífero. Os

componentes do lipossoma são comumente dispostos numa formação bicamada, similar à disposição de lipídeo de membranas biológicas. Lipossomas contendo o construto de anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, como descrito em Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. EUA 77: 4030 (1980); Patentes N° US 4,485,045 e 4,544,545; e W0 97/38731. Lipossomas com tempo de circulação acentuado são divulgados na Patente US N° 5,013, 556. Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeo compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de poro definido para render lipossomas com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do construto de anticorpo da presente invenção podem ser conjugados para os lipossomas conforme descrito em Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intercâmbio de dissulfeto. Um agente quimioterápico é opcionalmente contido no lipossoma. Ver Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

[00278] Uma vez que a composição farmacêutica foi formulada, a mesma pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, cristal ou como um pó desidratado ou liofilizado. Tais formulações podem ser armazenadas ou numa forma pronta para uso ou numa forma (por exemplo, liofilizada) que é reconstituída antes da administração.

[00279] A atividade biológica da composição farmacêutica definida no presente documento pode ser determinada, por

exemplo, por ensaios de citotoxicidade, conforme descrito nos seguintes exemplos, em WO 99/54440 ou por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Eficácia" ou "eficácia in vivo" conforme usado no presente documento se refere à resposta à terapia pela composição farmacêutica da invenção, usando, por exemplo, critérios de resposta de NCI padronizado. O sucesso ou a eficácia in vivo da terapia usando uma composição farmacêutica da invenção se refere à eficácia da composição para seu propósito previsto, isto é, a capacidade de a composição causar seu efeito desejado, isto é, depleção de células patológicas, por exemplo, células de tumor. A eficácia in vivo pode ser monitorada por métodos padrão estabelecidos para as respectivas entidades de doença incluindo, sem limitação, contagens de glóbulos brancos, diferenciais, Classificação de Célula Ativada por Fluorescência, aspiração de medula óssea. Além disso, vários parâmetros de química específicos de doença e outros métodos padrão estabelecidos podem ser usados. Ademais, tomografia auxiliada por computador, raios X, tomografia de ressonância magnética nuclear (por exemplo, para análise de resposta baseada em critérios do National Cancer Institute [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. Abril de 1999;17(4):1244]), varredura por tomografia por emissão de pósitrons, contagens de glóbulos brancos,

diferenciais, Classificação de Célula Ativada por Fluorescência, aspiração de medula óssea, biópsias/histologias de nódulos linfáticos, e vários parâmetros de química clínicos específicos de linfoma (por exemplo, lactato desidrogenase) e outros métodos padrão estabelecidos podem ser usados.

[00280] Outro desafio importante no desenvolvimento de fármacos como a composição farmacêutica da invenção é a modulação previsível de propriedades farmacocinéticas. Para isto, um perfil farmacocinético do fármaco candidato, isto é, um perfil dos parâmetros farmacocinéticos que afetam a capacidade de um fármaco particular para tratar uma dada condição, pode ser estabelecido. Parâmetros farmacocinéticos do fármaco que influenciam na capacidade de um fármaco para tratar uma certa entidade de doença incluem, sem limitação: meia-vida, volume de distribuição, metabolismo de primeira-passagem hepática e o grau de ligação sérica sanguínea. A eficácia de um dado agente de fármaco pode ser influenciada por cada um dos parâmetros mencionados acima.

[00281] "Meia-vida" significa o tempo em que 50% de um fármaco administrado é eliminado através de processos biológicos, por exemplo, metabolismo, excreção, etc. Entende-se por "metabolismo de primeira-passagem hepática" a propensão de um fármaco a ser metabolizado mediante o primeiro contato com o fígado, isto é, durante sua primeira passagem através do fígado. "Volume de distribuição" significa o grau de retenção de um fármaco ao longo de vários compartimentos do corpo, como, por exemplo, espaços intracelulares e extracelulares, tecidos e órgãos, etc. e a distribuição do fármaco nestes compartimentos. "Grau de

ligação sérica sanguínea" significa a propensão de um fármaco a interagir com e se ligar a proteínas do soro sanguíneo, como albumina, levando a uma redução ou perda de atividade biológica do fármaco.

[00282] Parâmetros farmacocinéticos também incluem biodisponibilidade, tempo de atraso (Tlag), Tmax, taxas de absorção, mais quantidade inicial e/ou Cmax para um dado fármaco administrado. "Biodisponibilidade" significa a quantidade de um fármaco no compartimento sanguíneo. "Tempo de atraso" significa o atraso no tempo entre a administração do fármaco e sua detecção e mensurabilidade no sangue ou plasma. "Tmax" é o tempo após o qual a concentração sanguínea máxima do fármaco é alcançada, e "Cmax" é a concentração sanguínea maximamente obtida com um dado fármaco. O tempo para alcançar uma concentração de tecido ou sangue do fármaco que é exigida para seu efeito biológico é influenciado por todos os parâmetros. Parâmetros farmacocinéticos de construtos de anticorpo biespecífico exibindo especificidade entre espécies, que pode ser determinada em teste pré-clínico em animais em primatas não chimpanzé conforme apresentado acima, também são apresentados, por exemplo, na publicação por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

[00283] Em um aspecto preferido da invenção, a composição farmacêutica é estável durante pelo menos quatro semanas a cerca de -20 °C. Como é evidente a partir dos exemplos anexos, a qualidade de um construto de anticorpo da invenção versus a qualidade dos construtos de anticorpo correspondentes do estado da técnica pode ser testada utilizando sistemas diferentes. Entende-se que esses testes

estão em conformidade com a "ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C* and *Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for Biotech Biotechnological/Biological Products Q6B*" e, portanto, são eleitos para fornecer um perfil indicador de estabilidade que forneça certeza de que mudanças na identidade, pureza e potência do produto são detectadas. É bem aceite que o termo pureza é um termo relativo. Devido ao efeito de glicosilação, desaminação ou outras heterogeneidades, a pureza absoluta de um produto biotecnológico/biológico deve ser tipicamente avaliada por mais de um método e o valor de pureza derivado é dependente do método. Para fins de testes de estabilidade, os testes de pureza devem se concentrar em métodos para determinação de produtos de degradação.

[00284] Para a avaliação da qualidade de uma composição farmacêutica compreendendo um construto de anticorpo da invenção, pode ser analisada, por exemplo, analisando o conteúdo de agregados solúveis em uma solução (HMWS por exclusão de tamanho). É preferível que a estabilidade durante pelo menos quatro semanas a cerca de -20 °C seja caracterizada por um teor inferior a 1,5% de HMWS, de preferência menos de 1% de HMWS.

[00285] Outros exemplos para a avaliação da estabilidade de um construto de anticorpo da invenção na forma de uma composição farmacêutica são fornecidos nos exemplos anexados 4-12. Nestas modalidades, exemplos de construtos de anticorpos da invenção são testados em relação a diferentes condições de estresse em diferentes formulações farmacêuticas e os resultados foram comparados com outros

formatos de extensão de meia-vida (HLE) de construto de anticorpo de acoplamento de células T biespecíficas conhecido a partir da técnica. Em geral, considera-se que os construtos de anticorpo fornecidos com a modalidade FC específica, de acordo com a presente invenção, são tipicamente mais estáveis ao longo de uma ampla gama de condições de estresse, tais como temperatura e estresse leve, ambas comparadas com construtos de anticorpo proporcionados com formatos diferentes de HLE e sem qualquer formato de HLE (por exemplo, construtos de anticorpos "canônicos"). A referida estabilidade de temperatura pode estar relacionada tanto com a temperatura decrescente (abaixo da temperatura ambiente incluindo congelamento) quanto com a temperatura aumentada (acima da temperatura ambiente incluindo temperaturas até ou acima da temperatura corporal). Como o perito na técnica reconhecerá, tal estabilidade melhorada em relação ao estresse, que dificilmente pode ser evitada na prática clínica, faz com que o construto de anticorpo seja mais seguro porque menos produtos de degradação ocorrerão na prática clínica. Em consequência, o referido aumento de estabilidade significa maior segurança.

[00286] A troca hidrogênio-deutério (HDX) é uma reação química na qual um átomo de hidrogênio ligado covalentemente é substituído por um átomo de deutério ou vice-versa. Pode ser aplicado mais facilmente a prótons e deuterons trocáveis, onde essa transformação ocorre na presença de uma fonte de deutério adequada, sem qualquer catalisador. O método fornece informações sobre a acessibilidade do solvente de várias partes da molécula e, portanto, a estrutura terciária da proteína.

[00287] Uma modalidade fornece o construto de anticorpo da invenção ou o construto de anticorpo produzido de acordo com o processo da invenção para uso na prevenção, tratamento ou melhora de uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença viral ou um distúrbio imunológico.

[00288] As formulações descritas no presente documento são úteis como composições farmacêuticas no tratamento, melhora e/ou prevenção da condição médica patológica conforme descrito no presente documento num paciente em necessidade disto. O termo "tratamento" se refere tanto ao tratamento terapêutico quanto medidas profiláticas ou preventivas. O tratamento inclui a aplicação ou a administração da formulação ao corpo, um tecido isolado, ou célula de um paciente que tem uma doença/distúrbio, um sintoma de uma doença/distúrbio, ou uma predisposição para uma doença/distúrbio, com o propósito de curar, sarar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, melhorar, aprimorar ou afetar a doença, o sintoma da doença, ou a predisposição para a doença.

[00289] O termo "melhora" conforme usado no presente documento se refere a qualquer aprimoramento do estado de doença de um paciente tendo um tumor ou câncer ou um câncer metastático conforme especificado abaixo, pela administração de um construto de anticorpo de acordo com a invenção a um indivíduo em necessidade disto. Tal melhoramento também pode ser visto como reduzindo ou interrompendo a progressão do tumor ou câncer ou câncer metastático do paciente. O termo "prevenção" conforme usado no presente documento significa evitar a ocorrência ou a recorrência de um paciente tendo um tumor ou câncer ou um câncer metastático conforme

especificado abaixo, pela administração de um construto de anticorpo de acordo com a invenção a um indivíduo em necessidade disto.

[00290] O termo "doença" se refere a qualquer condição que se beneficiaria do tratamento com o construto de anticorpo ou a composição farmacêutica descrita no presente documento. Isto inclui distúrbios ou doenças crônicas e agudas incluindo aquelas condições patológicas que predisõem o mamífero à doença em questão.

[00291] Um "neoplasma" é um crescimento anormal de tecido, usualmente, mas nem sempre, formando uma massa. Quando também forma uma massa, é comumente denominado um "tumor". Neoplasmas ou tumores podem ser benignos, potencialmente malignos (pré-cancerosos) ou malignos. Neoplasmas malignos são comumente chamados de câncer. Os mesmos usualmente invadem e destroem o tecido circundante e podem formar metastases, isto é, os mesmos se espalham para outras partes, tecidos ou órgãos do corpo. Daí, o termo "câncer metastático" abrange metástases para outros tecidos ou órgãos além daquele do tumor original. Linfomas e leucemias são neoplasmas linfoides. Para os propósitos da presente invenção, os mesmos também são abrangidos pelos termos "tumor" ou "câncer".

[00292] O termo "doença viral" descreve doenças, que são o resultado de uma infecção viral de um indivíduo.

[00293] O termo "distúrbio imunológico" como aqui utilizado descreve, em linha com a definição comum deste termo, distúrbios imunológicos, tais como doenças autoimunes, hipersensibilidades, deficiências imunológicas.

[00294] Em uma modalidade, a invenção proporciona um

método para o tratamento ou melhoria de uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença viral ou uma distúrbio imunológico, compreendendo o passo de administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo o construto de anticorpo da invenção, ou produzido de acordo com o processo da invenção.

[00295] Os termos "indivíduo em necessidade" ou aqueles "em necessidade de tratamento" incluem aquele que já têm o distúrbio, bem como aqueles em que o distúrbio deve ser evitado. O indivíduo em necessidade ou "paciente" inclui seres humanos e outros mamíferos individuais que recebem tratamento profilático ou terapêutico.

[00296] O construto de anticorpo da invenção será geralmente projetado para vias e métodos de administração específicos, para dosagens e frequências específicas de administração, para tratamentos específicos de doenças específicas, com faixas de biodisponibilidade e persistência, dentre outras coisas. Os materiais da composição são, de preferência, formulados em concentrações que são aceitáveis para o sítio de administração.

[00297] Formulações e composições podem ser, desta forma, projetadas de acordo com a invenção para a entrega por qualquer via de administração adequada. No contexto da presente invenção, as vias de administração são preferencialmente vias parentéricas tal como, intravenosa, intra-arterial, intra-óssea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular, epidural, intratecal, subcutânea, intraperitoneal, extra-amniótica, intra-articular, intracardiaca, intradérmica, intralesional, intrauterina, intravesical, intravitreal, transdérmica, intranasal,

transmucosal, intrasinovial, intraluminal).

[00298] As composições farmacêuticas e o construto de anticorpo desta invenção são particularmente úteis para administração parenteral, por exemplo, entrega subcutânea ou intravenosa, por exemplo, por injeção como injeção de bolo, ou por infusão como infusão contínua. Composições farmacêuticas podem ser administradas usando um dispositivo médico. Exemplos de dispositivos médicos para administrar composições farmacêuticas são descritos nas Patentes US N° 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; e 5,399,163.

[00299] Em particular, a presente invenção fornece uma administração ininterrupta da composição adequada. Como um exemplo não limitador, a administração ininterrupta ou substancialmente ininterrupta, isto é, contínua pode ser concretizada por um pequeno sistema de bomba usado pelo paciente para medir o influxo de agente terapêutico no corpo do paciente. A composição farmacêutica compreendendo o construto de anticorpo da invenção pode ser administrada usando os referidos sistemas de bomba. Tais sistemas de bomba são geralmente conhecidos na técnica e normalmente baseiam-se na troca periódica de cartuchos contendo o agente terapêutico a ser infundido. Quando se troca o cartucho nesse sistema de bomba, pode ocorrer uma interrupção temporária do fluxo ininterrupto de agente terapêutico no corpo do paciente. Em tal caso, a fase de administração antes da substituição do cartucho e a fase de administração após a substituição do cartucho ainda seriam consideradas dentro do significado dos meios farmacêuticos e métodos da invenção

juntas constituem uma "administração ininterrupta" de tal agente terapêutico.

[00300] A administração contínua ou ininterrupta dos construtos de anticorpo da invenção pode ser intravenosa ou subcutânea por meio de um dispositivo de entrega de fluido ou pequeno sistema de bomba incluindo um mecanismo de direcionamento de fluido para direcionar fluido para fora de um reservatório e um mecanismo de atuação para atuar o mecanismo de direcionamento. Sistemas de bomba para administração subcutânea podem incluir uma agulha ou cânula para penetrar a pele de um paciente e entregar a composição adequada no corpo do paciente. Os referidos sistemas de bomba podem ser diretamente fixados ou anexados à pele do paciente independentemente de uma veia, artéria ou vaso sanguíneo, permitindo, assim, um contato direto entre o sistema de bomba e a pele do paciente. O sistema de bomba pode ser fixado à pele do paciente por 24 horas até vários dias. O sistema de bomba pode ser de pequeno tamanho com um reservatório para pequenos volumes. Como um exemplo não limitador, o volume do reservatório para a composição farmacêutica adequada a ser administrada pode ser entre 0,1 e 50 mL.

[00301] A administração contínua também pode ser transdérmica por meio de um emplastro usado sobre a pele e substituído em intervalos. Um perito na técnica está ciente dos sistemas de adesivos para distribuição de fármacos adequados para este fim. É de notar que a administração transdérmica é especialmente susceptível à administração ininterrupta, uma vez que a troca de um primeiro adesivo esgotado pode ser realizada vantajosamente em simultâneo com a colocação de um novo segundo adesivo, por exemplo na

superfície da pele imediatamente adjacente ao primeiro adesivo esgotado e imediatamente antes da remoção do primeiro adesivo esgotado. Problemas de interrupção de fluxo ou falha de célula de energia não surgem.

[00302] Se a composição farmacêutica foi liofilizada, o material liofilizado é primeiro reconstituído num líquido apropriado antes da administração. O material liofilizado pode ser reconstituído em, por exemplo, água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina fisiológica, solução salina tamponada com fosfato (PBS), ou mesma formulação que a proteína estava antes da liofilização.

[00303] As composições da presente invenção podem ser administradas ao indivíduo a uma dose adequada que pode ser determinada, por exemplo, por estudos de aumento de dose pela administração de doses crescentes do construto de anticorpo da invenção exibindo especificidade entre espécies descritas no presente documento a primatas não chimpanzés, por exemplo, macacos. Conforme apresentado acima, o construto de anticorpo da invenção exibindo especificidade entre espécies descritas no presente documento pode ser vantajosamente usado em forma idêntica em teste pré-clínico em primatas não chimpanzé e como fármaco em seres humanos. O regime de dosagem será determinado pelo médico atendente e por fatores clínicos. Como é bem conhecido na técnica médica, dosagens para qualquer paciente dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho, área superficial corporal, idade do paciente, o composto particular a ser administrado, gênero, tempo e via de administração, saúde geral e outros fármacos sendo administrados ao mesmo tempo.

[00304] O termo "dose eficaz" ou "dosagem efetiva" é

definido como uma quantidade suficiente para alcançar ou pelo menos parcialmente alcançar o efeito desejado. O termo "dose terapeuticamente eficaz" é definido como uma quantidade suficiente para curar ou pelo menos parcialmente deter a doença e suas complicações num paciente que já sofre da doença. Quantidades ou doses eficazes para este uso dependerão da condição a ser tratada (a indicação), do construto de anticorpo entregue, do contexto terapêutico e dos objetivos, da severidade da doença, terapia prévia, do histórico clínico do paciente e da resposta ao agente terapêutico, da via de administração, do tamanho (peso corporal, superfície corporal e tamanho de órgão) e/ou da condição (a idade e saúde geral) do paciente, e do estado geral do sistema imune do próprio paciente. A dose apropriada pode ser ajustada de acordo com o julgamento do médico atendente de tal modo que possa ser administrada ao paciente uma vez ou ao longo de uma série de administrações, e fim de obter o efeito terapêutico ideal.

[00305] Uma dosagem típica pode se situar na faixa de cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 30 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Em modalidades específicas, a dosagem pode se situar na faixa de 1,0 µg/kg até cerca de 20 mg/kg, opcionalmente de 10 µg/kg até cerca de 10 mg/kg ou de 100 µg/kg até cerca de 5 mg/kg.

[00306] Uma quantidade eficaz terapêutica de um construto de anticorpo da invenção preferencialmente resulta numa diminuição da severidade de sintomas de doença, um aumento na frequência ou duração de períodos livres de sintoma de doença ou uma prevenção de deficiência ou incapacidade devido à aflição da doença. Para tratar tumores que expressam

antígeno celular alvo, uma quantidade terapêuticamente eficaz do construto de anticorpo da invenção, por exemplo, um construto de anticorpo antiantígeno celular alvo/anti-CD3, de preferência, inibe crescimento de célula ou crescimento de tumor em pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 90% em relação a pacientes não tratados. A capacidade de um composto inibir crescimento de tumor pode ser avaliada num modelo animal preditivo de eficácia.

[00307] A composição farmacêutica pode ser administrada como um agente terapêutico sozinho ou em combinação com terapias adicionais como terapias anticâncer conforme necessário, por exemplo, outros fármacos proteínicos e não proteínicos. Estes fármacos podem ser administrados simultaneamente com a composição compreendendo o construto de anticorpo da invenção conforme definido no presente documento ou separadamente antes ou depois da administração do referido construto de anticorpo em intervalos e doses oportunamente definidos.

[00308] O termo "dose eficaz e não tóxica" conforme usado no presente documento se refere a uma dose tolerável de um construto de anticorpo da invenção que é alta o suficiente para causar depleção de células patológicas, eliminação de tumor, encolhimento de tumor ou estabilização de doença sem, ou essencialmente sem, maiores efeitos tóxicos. Tais doses eficazes e não tóxicas podem ser determinadas, por exemplo, por estudos de aumento de dose descritos na técnica e deveriam estar abaixo da dose que induz eventos colaterais adversos severos (dose que limita toxicidade, DLT).

[00309] O termo "toxicidade" conforme usado no presente documento se refere aos efeitos tóxicos de um fármaco manifestados em eventos adversos ou eventos adversos. Estes eventos colaterais podem se referir a uma ausência de tolerabilidade do fármaco em geral e/ou uma ausência de tolerância local após administração. Toxicidade também poderia incluir efeitos teratogênicos ou carcinogênicos causados pelo fármaco.

[00310] O termo "segurança", "segurança in vivo" ou "tolerabilidade" conforme usado no presente documento define a administração de um fármaco sem induzir eventos adversos severos diretamente após a administração (tolerância local) e durante um período mais longo de aplicação do fármaco. "Segurança", "segurança in vivo" ou "tolerabilidade" pode ser avaliada, por exemplo, em intervalos regulares durante o período de tratamento e acompanhamento. Medições incluem avaliação clínica, por exemplo, manifestações de órgão, e varredura de anormalidades laboratoriais. A avaliação clínica pode ser executada e desvios em constatações normais registrados/codificados de acordo com o padrão NCI-CTC e/ou MedDRA. Manifestações de órgão podem incluir critérios como alergia/imunologia, sangue/medula óssea, arritmia cardíaca, coagulação e similares, conforme apresentado, por exemplo, em Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 (CTCAE). Parâmetros laboratoriais que podem ser testados incluem, por exemplo, hematologia, química clínica, perfil de coagulação e análise de urina e exame de outros fluidos corporais como soro, plasma, fluido linfóide ou espinhal, líquido e similares. A segurança pode ser, deste modo, analisada, por exemplo, por exame físico,

técnicas de imageamento (isto é, ultrassom, raios X, varreduras de TC, Imageamento por Ressonância Magnética (MRI), outras medições com dispositivos técnicos (isto é, eletrocardiograma), sinais vitais, medindo parâmetros laboratoriais e registrando eventos adversos. Por exemplo, eventos adversos em primatas não chimpanzé nos usos e métodos de acordo com a invenção podem ser examinados por métodos histopatológicos e/ou histoquímicos.

[00311] Os termos acima também são referido, por exemplo, em Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting em 16 de julho de 1997.

[00312] Finalmente, a invenção fornece um kit compreendendo um construto de anticorpo da invenção ou produzido de acordo com o processo da invenção, uma composição farmacêutica da invenção, um polinucleotídeo da invenção, um vetor da invenção e/ou uma célula hospedeira da invenção.

[00313] No contexto da presente invenção, o termo "kit" significa dois ou mais componentes - um dos quais correspondendo ao construto de anticorpo, à composição farmacêutica, ao vetor ou à célula hospedeira da invenção - embalados juntos num contêiner, recipiente ou de outro modo. Um kit pode, daí, ser descrito como um conjunto de produtos e/ou utensílios que são suficientes para alcançar um certo objetivo, que pode ser comercializado como uma unidade única.

[00314] O kit pode compreender um ou mais recipientes (como frascos, ampolas, recipientes, seringas, garrafas, bolsas) de qualquer tamanho, formato e material apropriados (de preferência, à prova de água, por exemplo, plástico ou

vidro) contendo o construto de anticorpo ou a composição farmacêutica da presente invenção numa dosagem apropriada para administração (ver acima). O kit pode adicionalmente conter instruções para uso (por exemplo, sob a forma de um folheto ou manual de instruções), meios para administrar o construto de anticorpo da presente invenção como uma seringa, bomba, infusor ou similares, meios para reconstituir o construto de anticorpo da invenção e/ou meios para diluir o construto de anticorpo da invenção.

[00315] A invenção também fornece kits para uma unidade de administração de dose única. O kit da invenção também pode conter um primeiro recipiente compreendendo um construto de anticorpo seco/liofilizado e um segundo recipiente compreendendo uma formulação aquosa. Em certas modalidades desta invenção, kits contendo seringas pré-carregadas de câmara única ou de múltiplas câmaras (por exemplo, seringas de líquido e liosseringas) são fornecidos.

[00316] A composição farmacêutica da invenção compreende também um tampão, que pode ser selecionado do grupo que consiste em fosfato de potássio, ácido acético/acetato de sódio, ácido cítrico/citrato de sódio, ácido succínico/succinato de sódio, ácido tartárico/tartarato de sódio, histidina/HCl de histidina, glicina, Tris, glutamato, acetato e misturas destes, e em particular de fosfato de potássio, ácido cítrico/citrato de sódio, ácido succínico, histidina, glutamato, acetato e suas combinações.

[00317] As concentrações de tampão adequadas abrangem concentrações de cerca de 200 mM ou menos, como cerca de 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 ou 5 mM. O perito na técnica será

prontamente capaz de ajustar as concentrações de tampão a fim de proporcionar a estabilidade da composição farmacêutica como aqui descrito. As concentrações de tampão previstas na composição farmacêutica da invenção variam especificamente de cerca de 5 a cerca de 200 mM, preferencialmente de cerca de 5 a cerca de 100 mM e mais preferencialmente de cerca de 10 a cerca de 50 mM.

[00318] Como utilizado aqui, o termo "composição farmacêutica" refere-se a uma composição que é adequada para administração a um indivíduo que dela necessite. Os termos "sujeito", "indivíduo" ou "animal" ou "paciente" são usados aqui intercambiavelmente para se referir a qualquer sujeito, particularmente um sujeito mamífero, a quem a administração da composição farmacêutica da invenção é desejada. Os sujeitos mamíferos incluem seres humanos, primatas não-humanos, cães, gatos, porquinhos-da-índia, coelhos, camundongos, ratos, cavalos, vacas, gado e afins, sendo os humanos preferidos. A composição farmacêutica da presente invenção é estável e farmacêuticamente aceitável, isto é, capaz de desencadear o efeito terapêutico desejado sem causar nenhum efeito local ou sistêmico indesejáveis no indivíduo ao qual a composição farmacêutica é administrada. As composições farmacêuticamente aceitáveis da invenção podem, em particular, ser estéreis e/ou farmacêuticamente inertes. Especificamente, o termo "farmacêuticamente aceitável" pode significar aprovado por uma agência reguladora ou outra farmacopeia geralmente reconhecida para utilização em animais, mais particularmente em humanos.

[00319] A composição farmacêutica da invenção compreende um ou vários construtos de anticorpo de cadeia única

biespecíficos aqui descritos, de preferência a uma quantidade terapêuticamente eficaz, uma β -ciclodextrina e um tampão. Por "quantidade terapêuticamente eficaz" entende-se uma quantidade do referido construto que induz o efeito terapêutico desejado. A eficácia terapêutica e toxicidade de tais compostos por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou com animais experimentais, como, por exemplo, ED50 (a dose terapêuticamente eficaz em 50% da população) e LD50 (a dose letal para 50% da população). A relação de dose entre efeitos terapêuticos e tóxicos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a razão ED50/LD50. São preferidas, em geral, as composições farmacêuticas que exibem grandes índices terapêuticos.

[00320] A composição pode compreender uma β -ciclodextrina e o tampão descrito anteriormente. A composição farmacêutica pode compreender opcionalmente um ou mais excipientes, desde que eles não reduzam ou excluam as suas propriedades vantajosas, conforme descritas aqui, e em particular a sua estabilidade.

[00321] Os excipientes podem ser usados na invenção para uma vasta variedade de fins, tais como o ajuste de propriedades físicas, químicas, ou biológicas das formulações, tais como o ajuste de viscosidade, e os processos da invenção para melhorar a eficácia e ou para estabilizar adicionalmente essas formulações e processos contra a degradação e deterioração devida, por exemplo, a estresses que ocorrem durante a fabricação, transporte, armazenamento, preparação pré-uso, administração, e daí em diante. O termo "excipiente" geralmente inclui enchimentos, aglutinantes, desintegrantes, revestimentos, sorventes,

antiaderentes, deslizantes, conservantes, antioxidantes, aromatizantes, corantes, agentes aditivos, solventes, cossolventes, agentes de tamponamento, agentes quelantes, agentes transmissores de viscosidade, agentes ativos de superfície, diluentes, umectantes, transportadores, diluentes, conservantes, emulsionantes, estabilizadores e modificadores de tonicidade.

[00322] É evidente para os peritos na técnica que os diferentes excipientes da composição farmacêutica (por exemplo, aqueles listados acima) podem ter diferentes efeitos, por exemplo, e o aminoácido pode atuar como um tampão, um estabilizante e/ou um antioxidante; manitol pode atuar como um agente de volume e/ou um agente acentuador de tonicidade; cloreto de sódio pode atuar como veículo de entrega e/ou agente acentuador de tonicidade; etc.

[00323] Os polióis são agentes estabilizantes úteis em formulações líquidas e liofilizadas para proteger proteínas de processos de degradação física e química e também são úteis para ajustar a tonicidade das formulações. Polióis incluem açúcares, por exemplo, manitol, sacarose e sorbitol e álcoois poli-hídricos como, por exemplo, glicerol e propileno glicol e, para propósitos de discussão no presente documento, polietileno glicol (PEG) e substâncias relacionadas. O manitol é usado comumente para garantir a estabilidade estrutural do bolo em formulações liofilizadas. Isto garante estabilidade estrutural para o bolo. É geralmente usado com um lioprotetor, por exemplo, sacarose. Sorbitol e sacarose geralmente são os agentes usados para ajustar a tonicidade e como estabilizantes para proteger contra estresses de congelamento e descongelamento durante

o transporte ou a preparação dos volumes durante o processo de fabricação. O PEG é útil para estabilizar proteínas e como crioprotetor.

[00324] Tensoativos rotineiramente são usados para evitar, minimizar ou reduzir adsorção de superfície. Moléculas de proteína podem ser susceptíveis à adsorção em superfícies e à desnaturação e consequente agregação a interfaces ar-líquido, sólido-líquido e líquido-líquido. Estes efeitos geralmente aumentam inversamente com a concentração de proteína. Estas interações prejudiciais geralmente aumentam inversamente com a concentração de proteína e tipicamente são exacerbadas por agitação física, como aquela gerada durante o transporte e o manuseio de um produto. Os tensoativos geralmente usados incluem polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácidos graxos de polietoxilatos de sorbitano, e poloxâmero 188. Tensoativos também são comumente usados para controlar estabilidade conformacional de proteína. O uso de tensoativos neste aspecto é específico de proteína visto que qualquer dado tensoativo tipicamente estabilize algumas proteínas e desestabilize outras.

[00325] Polissorbatos são suscetíveis à degradação oxidativa e, com frequência, conforme suprido, contêm quantidades suficientes de peróxidos para causar oxidação de cadeias laterais de resíduo de proteína, especialmente metionina. Conseqüentemente, polissorbatos deveriam ser usados com cuidado e, quando usados, deveriam ser empregados em sua concentração eficaz mais baixa.

[00326] Até certo ponto, os antioxidantes podem evitar a oxidação deletéria das proteínas em formulações

farmacêuticas, mantendo níveis adequados de oxigênio e temperatura ambiente e evitando a exposição à luz. Excipientes antioxidantes também podem ser usados para evitar degradação oxidante de proteínas. Dentre antioxidantes úteis neste aspecto são agentes redutores, sequestrante de radicais livres/oxigênio e agentes quelantes. Os antioxidantes para utilização em formulações de proteínas terapêuticas preferencialmente são solúveis em água e mantêm a sua atividade ao longo da vida útil de um produto. O EDTA é um exemplo útil.

[00327] Os íons metálicos podem atuar como cofatores proteicos e permitir a formação de complexos de coordenação de proteínas. Íons metálicos também podem inibir alguns processos que degradam proteínas. Entretanto, íons metálicos também catalisam processos físico e químico que degradam proteínas. Íons de magnésio (10 a 120 mM) podem ser usados para inibir a isomerização de ácido aspártico em ácido isoaspártico. Os íons de Ca^{+2} (até 100 mM) podem aumentar a estabilidade de desoxirribonucleose humana. Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} , entretanto, podem desestabilizar rhDNase. De modo similar, Ca^{+2} e Sr^{+2} podem estabilizar Fator VIII, pode ser desestabilizado por Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} , e sua agregação pode ser aumentada por íons de Al^{+3} .

[00328] Os sais podem ser utilizados de acordo com a invenção para, por exemplo, ajustar a intensidade iônica e/ou a isotonicidade da formulação farmacêutica e/ou para melhorar ainda mais a solubilidade e/ou a estabilidade física do construto de anticorpo ou outro ingrediente. Como é bem conhecido, íons podem estabilizar o estado nativo de proteínas se ligando a resíduos carregados na superfície da

proteína e protegendo grupos carregados e polares na proteína e reduzindo a força de suas interações eletrostáticas, interações atrativas e repulsivas. Íons também podem estabilizar o estado desnaturado de uma proteína se ligando, em particular, às ligações de peptídeo desnaturado (--CONH) da proteína. Adicionalmente, a interação iônica com grupos carregados e polares numa proteína também pode reduzir as interações eletrostáticas intermoleculares e, assim, evitar ou reduzir agregação e insolubilidade de proteína. As espécies iônicas diferem quanto aos efeitos sobre as proteínas. Inúmeras classificações categóricas de íons e seus efeitos sobre proteínas foram desenvolvidas que podem ser usadas na formulação de composições farmacêuticas de acordo com a invenção. Um exemplo é a série de Hofmeister, que classifica solutos iônicos e não iônicos polares por seu efeito sobre a estabilidade conformacional de proteínas em solução. Os solutos de estabilização são mencionados como "cosmotrópicos". Os solutos de desestabilização são mencionados como "caotrópicos". Os cosmotrópicos são comumente usados em altas concentrações (por exemplo, sulfato de amônio de >1 molar) para precipitar as proteínas da solução ("salting-out"). Os caotrópicos geralmente são usados para prótese e/ou para solubilizar proteínas ("salting-in"). A eficácia relativa dos íons para "salt-in" e "salt-out" define sua posição na série Hofmeister.

[00329] Os aminoácidos livres podem ser utilizados na composição farmacêutica como agentes de volume, estabilizadores e antioxidantes, bem como outros usos convencionais. Lisina, prolina, serina e alanina podem ser usados para estabilizar proteínas numa formulação. A glicina

é útil na liofilização para garantir estrutura e propriedades de bolo corretas. A arginina pode ser útil para inibir agregação de proteína, tanto em formulações líquidas como em liofilizadas. A metionina é útil como um antioxidante.

[00330] Os excipientes particularmente úteis para a formulação da composição farmacêutica incluem sacarose, trealose, manitol, sorbitol, arginina, lisina, polissorbato 20, polissorbato 80, poloxâmero 188, plurônico e suas combinações. Os excipientes referidos podem estar presentes na composição farmacêutica a diferentes concentrações, desde que a composição exiba as propriedades desejáveis, conforme exemplificativo aqui, e, em particular, promova a estabilização dos construtos de anticorpo de cadeia única biespecíficos contidos. Por exemplo, a sacarose pode estar presente na composição farmacêutica em uma concentração entre 2% (p/v) e 12% (p/v), isto é, em uma concentração de 12% (p/v), 11% (p/v), 10% (p/v), 9% (p/v), 8% (p/v), 7% (p/v), 6% (p/v), 5% (p/v), 4% (p/v), 3% (p/v) ou 2% (p/v). As concentrações preferidas de sacarose variam entre 4% (p/v) e 10% (p/v) e mais preferencialmente entre 6% (p/v) e 10% (p/v). Polissorbato 80 pode estar presente na composição farmacêutica em uma concentração entre 0,001 % (p/v) e 0,5% (p/v), isto é, em uma concentração de 0,5 % (p/v), 0,2% (p/v), 0,1 % (p/v), 0,08% (p/v), 0,05% (p/v), 0,02 % (p/v), 0,01 % (p/v), 0,008% (p/v), 0,005% (p/v), 0,002 % (p/v) ou 0,001 % (p/v). As concentrações preferidas de polissorbato 80 variam entre 0,002% (p/v) e 0,5% (p/v) e, de preferência, entre 0,005% (p/v) e 0,02% (p/v).

[00331] Contudo, também é concebível que a composição farmacêutica não compreenda nenhum conservante. Em

particular, a presente invenção fornece, inter alia, uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais conservantes, compreendendo um construto de anticorpo biespecífico, que é preferencialmente uma cadeia única, em uma concentração de cerca de 0,5 mg/mL a 50 mg/mL, e um tampão em que o construto do anticorpo é estável, fosfato de potássio na concentração de cerca de 10 mM e sacarose adicional na concentração de cerca de 8% (p/v) e polissorbato 80 na concentração de cerca de 0,01% (p/v) a um pH de cerca de 6,0.

[00332] As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas em várias formas, por exemplo, na forma sólida, líquida, congelada, gasosa ou liofilizada, e podem ser, inter alia, sob a forma de um unguento, um creme, adesivos transdérmicos, gel, pó, comprimido, solução, aerossol, grânulos, pílulas, suspensões, emulsões, cápsulas, xaropes, fluidos, elixires, extratos, tintura ou extratos fluidos.

[00333] Geralmente, várias formas de armazenamento e/ou dosagem são concebíveis para a composição farmacêutica da invenção, dependendo, i.a., da via de administração pretendida, do formato de administração e da dosagem desejada (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22ª edição, Oslo, A., Ed., (2012)). Aqueles peritos na técnica saberão que a escolha de uma determinada forma de dosagem pode, por exemplo, influenciar o estado físico, a estabilidade, a taxa de liberação in vivo e a taxa de depuração in vivo do construto de anticorpo da invenção.

[00334] Por exemplo, o veículo ou transportador primário em uma composição farmacêutica pode ser aquosa ou não-aquosa

na natureza. Um veículo ou transportador adequado pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebrospinal artificial, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parentérica. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica são veículos adicionalmente exemplificadores.

[00335] Quando a administração parentérica for contemplada, as composições terapêuticas da invenção podem ser proporcionadas sob a forma de uma solução aquosa aceitável parenteralmente pirogênicos que compreende o construto de anticorpo desejado em um veículo farmacologicamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parenteral é água destilada estéril na qual o construto de anticorpo é formulado como uma solução isotônica estéril, devidamente preservada. A preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, tal como microesferas injetáveis, partículas bio-erodíveis, compostos poliméricos (tais como ácido polilático ou ácido poliglicólico), contos ou lipossomas, que podem prover liberação controlada ou prolongada do produto, o qual pode ser entregue através de injeção *depot*. O ácido hialurônico também pode ser usado, tendo o efeito de promover a duração prolongada na circulação. Os dispositivos de administração de fármacos implantáveis podem ser usados para introduzir o anticorpo desejado.

[00336] As formulações de liberação/administração sustentada ou controlada também são contempladas aqui. Técnicas de formulação de uma variedade de outros meios de entrega sustentada ou prolongada, como transportadores de

lipossoma, micropartículas bioerodíveis ou microesferas porosas e injeções de depósito, também são conhecidas pelos peritos na técnica. Consulte, por exemplo, o Pedido Internacional de Patente N° PCT/US93/00829, que descreve a liberação controlada de micropartícula poliméricas porosas para entrega de composições farmacêuticas. Preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis sob a forma de artigos conformados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactidas (conforme divulgado na Patente US N° 3,773,919 e na Publicação de Pedido de Patente N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed.Mater. Res. 15:167-277 e Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno acetato de vinila (Langer et al., 1981, supra) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicação de Pedido de Patente n° EP 133,988). Composições de liberação sustentada também podem incluir lipossomas que podem ser preparados por qualquer um dentre diversos métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82:3688-3692; Publicação de Pedido de Patente Europeia N° EP 036,676; EP 088,046 e EP 143,949. O construto de anticorpo também pode ser aprisionado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial (por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), em sistema de entrega de fármaco coloidal (por exemplo,

lipossoma, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 22ª edição, Oslo, A., Ed., (2012).

[00337] Composições farmacêuticas usadas para administração in vivo são tipicamente fornecidas como preparações estéreis. A esterilização pode ser realizada por filtração através de membranas de filtração estéril. Quando a composição é liofilizada, a esterilização usando este método pode ser conduzida ou antes ou após a liofilização e a reconstituição. Composições para administração parenteral podem ser armazenadas em forma liofilizada ou numa solução. Composições parenterais geralmente são colocadas num recipiente tendo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um frasco ou bolsa de solução intravenosa que tem um batente perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00338] Os construtos de anticorpo divulgados no presente documento também podem ser formulados como imunolipossomas. Um "lipossomo" é uma vesícula pequena composta de vários tipos de lipídios, fosfolipídios e/ou tensoativos que sejam úteis para administrar um fármaco a um mamífero. Os componentes do lipossoma são comumente dispostos numa formação bicamada, similar à disposição de lipídeo de membranas biológicas. Lipossomas contendo o construto de anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, como descrito em Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. EUA 77: 4030 (1980); Patentes US Nº. 4,485,045 e 4,544,545; e W0 97/38731. Lipossomas com tempo de circulação acentuado são

divulgados na Patente US N° 5,013, 556. Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeo compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de poro definido para render lipossomas com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do construto de anticorpo da presente invenção podem ser conjugados para os lipossomas conforme descrito em Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intercâmbio de dissulfido. Um agente quimioterápico é opcionalmente contido no lipossoma. Ver Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

[00339] Está previsto que a composição da invenção possa compreender, além do construto de anticorpo de cadeia única biespecífico definido neste documento, outros agentes biologicamente ativos, dependendo da utilização pretendida da composição. Tais agentes podem ser, em particular, fármacos que atuam em tumores e/ou células malignas, mas também são concebíveis outros agentes ativos, dependendo da utilização pretendida da composição farmacêutica, incluindo agentes que atuam no sistema gastrointestinal, fármacos inibidores de imunorreações (por exemplo, corticosteroides), fármacos moduladores da resposta inflamatória, fármacos que atuam no sistema circulatório e/ou agentes, como citocinas, conhecidos na técnica. Também está previsto que a composição farmacêutica da presente invenção seja aplicada em uma coterapia, isto é, em combinação com outro medicamento anticancerígeno.

[00340] Uma vez que a composição farmacêutica foi

formulada, a mesma pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, cristal ou como um pó desidratado ou liofilizado. Tais formulações podem ser armazenadas ou numa forma pronta para uso ou numa forma (por exemplo, liofilizada) que é reconstituída antes da administração. Por exemplo, as composições liofilizadas podem ser reconstituídas, por exemplo, água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina fisiológica, solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou a mesma formulação que a proteína tinha estado antes da liofilização.

[00341] A composição farmacêutica da invenção pode ser formulada, em geral, para administração por qualquer via de administração adequada. No contexto da presente invenção, as vias de administração incluem, mas não se limitam a, vias tópicas (como epicutânea, inalatória, nasal, ofálmica, auricular/aural, vaginal, mucosa); vias entéricas (como oral, gastrointestinal, sublingual, sublabial, bucal, retal); e vias parentéricas (como intravenosa, intra-arterial, intraóssea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular, epidural, intratecal, subcutânea, intraperitoneal, extra-amniótica, intra-articular, intracardiaca, intradérmica, intralesional, intrauterina, intravesical, intravítrea, transdérmica, intranasal, transmucosa, intrasinovial, intraluminal).

[00342] As composições farmacêuticas descritas aqui são particularmente úteis para administração parentérica, por exemplo, administração subcutânea ou intravenosa, por exemplo, por injeção, tal como injeção de bolus ou por infusão, por exemplo: por infusão contínua. Composições farmacêuticas podem ser administradas usando um dispositivo

médico. Exemplos de dispositivos médicos para administrar composições farmacêuticas são descritos nas Patentes US N°4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; e 5,399,163.

[00343] A composição farmacêutica da invenção também pode ser administrada ininterruptamente. A título de exemplo não limitativo, a administração ininterrupta ou substancialmente ininterrupta, isto é: a administração contínua, pode ser realizada por um sistema de bomba pequeno usado pelo paciente para medir o influxo do construto de anticorpo para o corpo do paciente. A composição farmacêutica pode ser administrada usando os referidos sistemas de bomba. Tais sistemas de bomba são geralmente conhecidos na técnica e normalmente baseiam-se na troca periódica de cartuchos contendo o agente terapêutico a ser infundido. Quando se troca o cartucho nesse sistema de bomba, pode ocorrer uma interrupção temporária do fluxo ininterrupto de agente terapêutico no corpo do paciente. Em tal caso, a fase de administração antes da substituição do cartucho e a fase de administração após a substituição do cartucho ainda seriam consideradas dentro do significado dos meios farmacêuticos e métodos da invenção juntas constituem uma "administração ininterrupta" de tal agente terapêutico.

[00344] A administração contínua ou ininterrupta da composição farmacêutica da invenção pode ser intravenosa ou subcutânea por meio de um dispositivo de administração de fluido ou sistema de bomba pequeno, incluindo um mecanismo de acionamento de fluido para expulsar o fluido de um reservatório e um mecanismo de ativação para ativar o

mecanismo de acionamento. Sistemas de bomba para administração subcutânea podem incluir uma agulha ou cânula para penetrar a pele de um paciente e entregar a composição adequada no corpo do paciente. Os referidos sistemas de bomba podem ser diretamente fixados ou anexados à pele do paciente independentemente de uma veia, artéria ou vaso sanguíneo, permitindo, assim, um contato direto entre o sistema de bomba e a pele do paciente. O sistema de bomba pode ser fixado à pele do paciente por 24 horas até vários dias. O sistema de bomba pode ser de pequeno tamanho com um reservatório para pequenos volumes. Como um exemplo não limitador, o volume do reservatório para a composição farmacêutica adequada a ser administrada pode ser entre 0,1 e 50 mL.

[00345] Aqueles peritos na técnica entenderão prontamente que a composição farmacêutica da invenção pode, geralmente, compreender qualquer um dos excipientes supramencionados, ou agentes ativos adicionais, ou podem ser fornecidos em qualquer forma adequada, contanto que seja estável e preferencialmente apresente as mesmas propriedades vantajosas que as composições farmacêuticas que compreendem as β -ciclodextrinas que foram avaliadas nos exemplos em anexo. Aqueles peritos na técnica estarão prontamente aptos a ajustar os vários componentes, de forma a fornecer uma composição farmacêutica estável, isto é, está substancialmente, preferencialmente, sem agregados e/ou conformadores dos fragmentos de anticorpo de cadeia única biespecífico neles compreendidos.

[00346] Deve-se notar que, conforme usado neste documento, as formas singulares "um", "uma e "o(a)" incluem as referências plurais, a menos que o contexto indique

claramente o contrário. Deste modo, por exemplo, referência a "um reagente" inclui um ou mais de tais reagentes diferentes e referência a "o método" inclui referência a etapas e métodos equivalentes conhecido pelos peritos na técnica que poderiam ser modificados ou substituídos pelos métodos descritos no presente documento.

[00347] A menos que indicado de outra forma, o termo "pelo menos" precedendo uma série de elementos deve ser entendido como se referindo a cada elemento da série. Os peritos na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar utilizando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descrita. Tais equivalentes se destinam a serem abrangidos pela presente invenção.

[00348] O termo "e/ou", quando usados aqui, incluem o significado de "e", "ou" e "toda ou qualquer outra combinação dos elementos ligados ao referido termo".

[00349] O termo "cerca de" ou "aproximadamente", como usado aqui, significa dentro de 20%, preferencialmente dentro de 10% e mais preferencialmente dentro de 5% de um determinado valor ou intervalo. Ele inclui ainda, no entanto, o número concreto, por exemplo: "cerca de 20" inclui 20.

[00350] O termo "menor do que" ou "maior do que" inclui o número concreto. Por exemplo, menos de 20 significa menor do que ou igual a. Da mesma forma, mais do que ou maior do que significa mais do que ou igual a ou maior do que ou igual a, respectivamente.

[00351] Ao longo deste relatório descritivo e das reivindicações a seguir, salvo se o contexto exigir o contrário, a expressão "compreender", e variações como

"compreende" e "compreendendo", será entendida como implicando a inclusão de um número inteiro ou etapa estabelecida ou um grupo de números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de nenhum outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas. Quando usado no presente documento, o termo "compreendendo" pode ser substituído pelo termo "contendo" ou "incluindo" ou, às vezes, quando usado no presente documento, pelo termo "tendo".

[00352] Quando usado neste documento, "consistindo em" exclui qualquer elemento, etapa ou ingrediente não especificado no elemento da reivindicação. Quando usado neste documento, "consistindo essencialmente em" não exclui materiais ou etapas que não afetam materialmente as características novas e básicas da reivindicação.

[00353] Em cada caso, neste documento, qualquer um dos termos "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em" pode ser substituído por qualquer um dos outros dois termos.

[00354] Deve-se entender que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos, materiais, reagentes e substâncias, etc. descritos aqui e, assim, podem variar. A terminologia usada neste documento é para o fim de descrever modalidades particulares somente e não se destina a limitar o escopo da presente invenção, o qual é definido somente pelas reivindicações.

[00355] Todas as publicações e patentes citadas ao longo do texto desta especificação (incluindo todas as patentes, pedidos de patentes, publicações científicas, especificações do fabricante, instruções, etc.), sejam supra ou infra, são incorporadas neste documento por referência na sua

totalidade. Nada neste documento deve ser interpretado como uma admissão de que a invenção não é intitulada para antecipar tal divulgação em virtude da invenção prévia. Na medida em que o material incorporado por referência contradiz ou é inconsistente com este relatório descritivo, o relatório descritivo substituirá qualquer material desse tipo.

[00356] Uma melhor compreensão da presente invenção e das suas vantagens será obtida a partir dos exemplos que seguem, oferecidos apenas para fins ilustrativos. Os exemplos não se destinam a limitar o âmbito da presente invenção de forma alguma.

Exemplos

[00357] Exemplo 1: De modo a investigar a compatibilidade de conservantes conhecidos com um construto de anticorpo biespecífico representativo, de acordo com a presente invenção, o construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 foi formulado na presença dos respectivos conservantes conhecidos com os parâmetros conforme estabelecidos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros de formulação para testar a compatibilidade de conservantes com um construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3.

Nome da Formulação	pH	Proteína (mg/ml)	Tempo (min)	Serum (%)	Conservante (ppm)	Reduzido (10 ⁴ %)
CASu1	4,0	0,8	10 mM glutamato	9	NA	0,01
CASu1_01	4,0	0,8	10 mM glutamato	9	0,3% clorobutanol	0,01
CASu1_02	4,0	0,8	10 mM glutamato	9	0,2% metiparabeno	0,01
CASu1_03	4,0	0,8	10 mM glutamato	9	0,5% fenol	0,01
CASu1_04	4,0	0,8	10 mM glutamato	9	0,01% timerossal	0,01

[00358] Os parâmetros de formulação utilizados foram

previamente encontrados para estabilizar eficientemente construtos de anticorpos biespecíficos. Portanto, qualquer diferença em comparação ao controle negativo sem conservante (G4SuT) deve se tornar ainda mais evidente. As concentrações de conservante escolhidas refletiram as concentrações padrão empregadas na técnica. As respectivas formulações foram armazenadas a 25 °C por 14 dias e examinadas nos dias 0, 1, 3, 7 e 14 por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC). Como pode ser visto na Figura 1, algumas formulações testadas, incluindo controles contendo 0% de conservante, mostraram uma diminuição na percentagem de espécies de elevado peso molecular (HMW) ao longo do tempo ambos a 25 °C. Este é o caso do clorobutanol e metilparabeno, o que indica que estes conservantes não desestabilizam o fármaco proteico e não induzem agregação nem reduzem a agregação. Após a adição de fenol, os valores gerais de HMW permanecem constantes, o que também aponta para uma compatibilidade de fenol com o construto de anticorpo biespecífico testado sob as condições experimentais dadas. O timerossal parecia menos adequado devido a um ligeiro aumento observado em HWM ao longo do tempo. O reequilíbrio de HMW para o pico principal pode ser em parte devido à diluição a partir da concentração do produto fármaco para a concentração na bolsa IV. Pode-se concluir geralmente que, a um pH baixo na gama de 4,0 a 6,5, tal como 4,0, um construto de anticorpo biespecífico da presente invenção permanece estável ou é estabilizado por um conservante tal como, por exemplo, clorobutanol ou metilparabeno, ou também por álcool benzílico. O baixo pH complementa a estabilização do construto de anticorpo biespecífico, razão pela qual uma composição farmacêutica

compreendendo concentrações mais altas, tal como pelo menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 µg/mL, é estável, ou seja, mostra baixa concentração percentual de HMW.

[00359] Exemplo 2: Como outro conservante conhecido, o álcool benzílico foi testado quanto à compatibilidade com o construto de anticorpo biespecífico representativo de acordo com a presente invenção, o construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3. A fim de imitar melhor uma situação de aplicação clínica, um pH fisiológico de 7 foi escolhido como um ambiente desafiador, como construtos de anticorpos biespecíficos típicos, como aqui descritos, são menos protegidos da agregação em um ambiente de pH7 em comparação com um ambiente de pH4. Uma tendência geral à agregação teria que ser esperada. Em detalhe, foi preparada uma linha de diluição do construto de anticorpo CD19xCD3 de 4,5 a 800 µg/mL, refletindo concentrações típicas de aplicação clínica e aquelas que podem exceder. A concentração de álcool benzílico de 0,9% foi escolhida de acordo com o Cloreto de Sódio a 0,9% aprovado regulamentar e comercialmente, USP (contendo álcool benzílico a 0,9%). A compatibilidade foi examinada determinando a percentagem de espécies indesejadas de HMW por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC) após 0, 1 e 2 dias a 25 °C, uma temperatura ambiente também prevalente em um ambiente clínico. Como pode ser visto na Fig. 1, a taxa de agregação, expressa em percentagem de espécies indesejadas de HMW, depende da concentração do construto de anticorpo biespecífico, no presente caso construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3. Surpreendentemente, as concentrações abaixo de 50 µg/mL não

mostram um aumento de espécies de HMW. Como pode ser visto a partir dos valores percentuais de HMW na concentração de 4,5 µg/mL, as espécies de HMW mostram até reversibilidade de volta ao monômero. Portanto, observou-se que abaixo de um limiar de cerca de 50 µg/mL de construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 representativo, não mostra quase nenhuma espécie de HMW em contato com um conservante, tal como álcool benzílico e que a percentagem de HMW permanece abaixo de 2%, mesmo após 2 dias de armazenamento. Também a uma concentração abaixo de 200 µg/mL, a concentração inicial de HMW é muito baixa (abaixo de 1%) e permanece significativamente abaixo de 5%, mesmo após 2 dias de armazenamento. Como o construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 de acordo com a presente invenção, é um construto de anticorpo biespecífico mais sensível em termos de estabilidade, outros construtos mostram percentagens de HMW ainda mais baixas na respectiva concentração de construto de anticorpo biespecífico e estável na presença do conservante representativo álcool benzílico, mesmo na ausência de quaisquer outros estabilizadores complementares e a um pH fisiológico 7 e a uma temperatura de 25 °C relevantes para a aplicação clínica.

[00360] Exemplo 3: A reversibilidade das espécies de HMW de volta ao monômero foi examinada ainda mais por um período de 14 dias por SEC-HPLC para construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 representativo na presença do conservante representativo álcool benzílico e a um pH fisiológico 7, a uma temperatura de 4 e 25 °C, cobrindo refrigeração e administração em um ambiente clínico. A concentração do referido construto foi de 4 µg/mL,

respectivamente. A concentração de álcool benzílico foi de 0,25, 0,5 e 0,9%, respectivamente. Como pode ser visto na Figura 3A, a 4 °C, a percentagem de HMW cai do dia 0 para o dia 7, mas não muda significativamente do dia 7 para o dia 14. Os valores de HMW para formulações compreendendo álcool benzílico são ligeiramente mais baixos do que aqueles sem indicar um efeito estabilizador. Esse efeito é ainda mais proeminente a 25 °C (ver a Figura 3B). Quanto maior a concentração de álcool benzílico e maior o tempo de observação, menor é a percentagem de HMW. Este resultado confirma que as espécies de HMW até mostram reversibilidade de volta ao monômero na presença do conservante representativo álcool benzílico, preferencialmente a uma concentração mais alta, mas regulável aceitável (0,9%).

[00361] Nas mesmas condições experimentais, uma potencial influência do material da bolsa de infusão também foi examinada. Prepararam-se bolsas intravenosas contendo 1900 ng/mL de Blincyto para o estudo de crescimento microbiano, que é a concentração de administração prevista para uma bolsa intravenosa de 7 dias. As bolsas IV preparados para o estudo de estabilidade aumentaram a concentração de administração e continham Blincyto a 4500 ng/mL ou 1900 ng/mL. Era necessário que a concentração mais alta estivesse acima de LOQ para os ensaios de estabilidade, SE-HPLC e CE-HPLC.

[00362] Ambos os estudos utilizaram bolsas IV de 250 mL. O estudo do crescimento microbiano foi avaliado usando apenas bolsas IV vazias de EVA. Estas bolsas foram preparadas em ambiente estéril e foram preparadas para inoculação por micróbios e testes de crescimento durante 14 dias de

incubação à temperatura ambiente. O estudo de estabilidade avaliou bolsas IV de EVA e poliolefina. As bolsas IV de poliolefina preenchidos com solução salina foram drenados antes do uso. Após a preparação das soluções de infusão contendo Blincyto, os dois tipos de bolsas IV foram colocados a 4 °C por 10 dias, para simular o tempo máximo de armazenamento na clínica, seguido por 14 dias de incubação a 25 °C e 37 °C. Adequadamente, o material da bolsa de infusão acetato de etila e vinila (EVA) e uma poliolefina foram comparados quanto a qualquer diferença na estabilidade de BiTE® em termos de percentual de espécies de HMW.

[00363] As respectivas formulações continham 4 µg/mL de construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 e uma concentração de álcool benzílico de 0%, 0,5%, 0,6% ou 0,74% foi mantida por 0, 4, 7, 9, 11 ou 14 dias a 25 °C com uma amostra a 4 °C por 10 d como controle estático. Como pode ser visto na Figura 3C, as formulações compreendendo álcool benzílico mostraram estabilidade geral melhorada e até valores decrescentes de HMW indicando reversibilidade de volta ao monômero, em particular dependente da concentração de conservante. Esta tendência foi observada um pouco mais consistentemente em EVA do que na poliolefina. Por conseguinte, o pico principal do percentil como um indicador para o monômero, isto é, a construto de anticorpo biespecífico ativo e não agregado, aumenta com maior concentração de conservante e ao longo do tempo examinado (ver Figura 3D). Geralmente, a presença de álcool benzílico parece aumentar a taxa de reequilíbrio, especialmente durante a incubação a 25 °C. No geral, não houve diferenças significativas entre os dois tipos de materiais para bolsas

intravenosas testadas.

[00364] Exemplo 4: A estabilidade melhorada de um construto de anticorpo biespecífico representativo da presente invenção conferida por um conservante, tal como álcool benzílico, foi examinada adicionalmente por um ensaio de desnaturação usando fluorescência como meio de detecção. As condições experimentais compreendem cloreto de guanidínio como desnaturante cuja concentração foi plotada no eixo x (ver Fig. 4). O tempo de incubação foi de 2,5 horas a 25 °C em pH 7 quase fisiológico. A excitação de fluorescência foi ajustada para 280 nm e a varredura de emissão foi realizada de 300 a 400 nm. O percentil da fracção desnaturada foi calculado a partir do ensaio de fluorescência como padrão na técnica. O resultado pode ser visto na Figura 4. A curva cinza representa a formulação que compreende álcool benzílico, a curva preta a formulação sem conservante. A curva cinza mostra um deslocamento para a direita na parte inferior da curva. Isto significa que é necessário mais desnaturação para desdobrar esta região, isto é, o domínio CD3, que se traduz em maior estabilidade conferida pelo conservante.

i. Exemplo 5: Este exemplo foi um estudo de desafio microbiano para suporte ao produto fármaco construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 (DP) administrado através de uma bolsa intravenosa (IV). O estudo foi realizado para avaliar a capacidade de diferentes concentrações (0,5% - 0,74%) de álcool benzílico (BeOH) em reduzir ou eliminar o crescimento microbiano em bolsas intravenosas contendo solução de infusão de blinatumomab contendo álcool benzílico, construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 DP

e estabilizador de solução intravenosa (IVSS), mantido a 20-25 °C por até 14 dias.

[00365] Os resultados obtidos no estudo demonstram que o álcool benzílico na concentração avaliada é capaz de inibir o crescimento dos seis microrganismos avaliados. A eficácia antimicrobiana nas bactérias Gram-negativas avaliadas no estudo (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. cloacae*) é aparente. Esses microrganismos podem crescer para ~ 10⁶ UFC/mL em solução de infusão de blinatumomab sem BeOH, mas o crescimento foi completamente inibido pelas três concentrações avaliadas. O efeito nas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *M. luteus*) e leveduras (*C. albicans*) avaliadas no estudo não é tão óbvio quanto foi nas bactérias Gram-negativas, principalmente devido à solução de infusão de blinatumomab, que não suporta o crescimento de bactérias Gram-positivas e leveduras. Foi observada uma diminuição gradual desses microrganismos nos títulos para os controles positivos de BeOH a 0,0%, com baixo a nenhum um título recuperável no final do período avaliado. No entanto, a eficácia antimicrobiana do álcool benzílico nesses microrganismos pode ser demonstrada pela diferença na duração necessária para que o inóculo desafiado seja completamente inativado ou inibido nas amostras tratadas com BeOH.

[00366] O estudo foi realizado para avaliar o crescimento de seis microrganismos diferentes em bolsas intravenosas preenchidas com 109 mL de solução de infusão de construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 contendo álcool benzílico (BeOH, na concentração final de 0,0%, 0,5%, 0,6% ou 0,74%), construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 DP e IVSS. As

bolsas IV preparadas foram mantidas a 20-25 °C até 14 dias.

[00367] As bactérias e leveduras selecionadas para o estudo são representativas de patógenos humanos conhecidos comumente isolados de infecções nosocomiais. Esses microrganismos incluem *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

[00368] A formulação de blinatumomab DP contém 1,91 µg/mL de blinatumomab em 25 mM de mono-hidrato de ácido cítrico, 200 mM de L-lisina-mono-hidrocloreto, 15% (p/v) de trealose desidratada, 0,1% (p/v) de polissorbatato 80 a pH 7,0. A formulação para IVSS é 25 mM de mono-hidrato de ácido cítrico, 1,25 M L-lisina mono-hidrocloreto, 0,1% (p/v) de polissorbatato 80 a pH 7,0.

[00369] Artigos de teste: Os artigos de teste avaliados no estudo foram solução de infusão de blinatumomab preenchida em bolsas intravenosas contendo 1,91 µg/mL de blinatumomab conc. em um volume total de 109 mL/bolsa. A solução foi composta pela adição de 2,2 mL de IVSS, 16,8 mL de blinatumomab DP reconstituído em agrupado (210 µg) e um volume total combinado de 90 mL de solução salina e solução salina com álcool benzílico a 0,9% (linha de base). Os quatro níveis diferentes de BeOH (0,0%, 0,5%, 0,6% e 0,74%) avaliados no estudo foram alcançados pela adição de diferentes quantidades de solução salina e linha de base. Por exemplo, a bolsa com BeOH a 0,0% (controle positivo) foi preparado adicionando 90 mL de solução salina, enquanto a bolsa com BeOH a 0,6% foi preparado adicionando 18 mL de solução salina e 72 mL de linha de base a 0,9%, aos 2,2 mL

IVSS e 16,8 mL de blinatumomab DP. Consultar o Apêndice A para obter mais detalhes. Note que a ilustração para controle positivo de BeOH a 0,0% na Figura 1 (Esquema da preparação de bolsas IV) do apêndice A deste relatório e na mesma ilustração na Figura 4 do apêndice D indicou inadvertidamente que a concentração final de BeOH era de 0,5%, em vez de 0,0%. Este é um erro tipográfico e não tem impacto no resultado do estudo.

[00370] Um total de 24 bolsas IV preenchidas com solução de infusão de construto de anticorpo biespecífico CD19xCD3 foram avaliadas para avaliar o efeito de quatro níveis de álcool benzílico nos seis microrganismos diferentes acima mencionados (6 x 4 = 24). Aproximadamente 1 mL de inóculo contendo micróbios $<1 \times 10^4$ UFC foi inoculado através da porta de injeção em cada bolsa que produziu uma carga microbiana inicial a $\sim 1 \times 10^2$ UFC/mL. Após a inoculação, a porta de amostragem na bolsa foi limpa com IPA estéril e a bolsa foi misturada brevemente e depois incubada a 20 - 25 °C.

[00371] Controles negativos: Três bolsas IV contendo soluções de infusão de blinatumomab nos três níveis de BeOH (0,5%, 0,6% e 0,74%) sem microrganismos desafiados foram incubados juntamente com artigos de teste desafiados para servir como controle negativo. Controles negativos do ensaio adicionais avaliados no estudo, incluindo água de peptona a 0,1% (PEPW) e solução salina tamponada com fosfato (PHSS). Esses controles negativos devem ser negativos para o crescimento o tempo todo. Consultar o Apêndice A para obter mais detalhes.

[00372] Procedimentos de amostragem e titulação: Em cada

ponto do tempo de 0 horas, 4 dias, 8 dias, 10 dias, 12 dias e 14 dias, uma alíquota de 3 mL foi coletada de cada bolsa avaliada e titulada.

[00373] A titulação da amostra foi realizada por filtração por membrana em duplicado de alíquotas de 1 mL para cada amostra cronometrada. Diluições adicionais foram realizadas para obter resultados contáveis (<300 UFC/placa).

[00374] O efeito do BeOH nos microrganismos desafiados é exibido graficamente nas Figuras 1 a 6. Em geral, as bactérias Gram-negativas (G-) avaliadas no estudo (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. cloacae*) cresceram e mantiveram a viabilidade na solução de infusão de blinatumomab (sem BeOH) muito melhor do que as bactérias Gram-positivas (G+) (*S. aureus* e *M. luteus*) e leveduras (*C. albicans*). O controle positivo de BeOH a 0,0% das três bactérias G- avaliadas cresceu para ~10⁶ UFC/mL no dia 8 e manteve-se no nível até o final do estudo (14 dias), Figuras 5A, 5B e 5C. Por outro lado, o crescimento da bactéria G- inoculada (~100 UFC/mL) foi inibido (ou inativado) na presença de BeOH. Não houve *P. aeruginosa* recuperável no Dia 4 e posteriormente (Figura 5B) e não houve *E. coli* ou *E. cloacae* recuperável no Dia 10 e posteriormente em todas as três BeOH conc. (Figura 5A e Figura 5C, respectivamente).

[00375] Diferentemente das bactérias G-, o crescimento das bactérias G+ (*S. aureus* e *M. luteus*) ou *C. albicans* não foi suportado pela solução de infusão de blinatumomab (com ou sem BeOH), Figura 5D, 5E e 5F, respectivamente. Foi observada uma diminuição gradual nos títulos de bactérias G+ e *C. albicans* em amostras cronometradas com controle positivo de 0,0% de BeOH, com título baixo a nenhum recuperável no

final do estudo. Tanto quanto a eficácia antimicrobiana do BeOH nesses microrganismos, embora ainda perceptível, não é tão óbvia quanto foi observada nas bactérias G-. O efeito pode ser demonstrado em que os microrganismos desafiados são completamente inativados ou inibidos em amostras tratadas com BeOH mais cedo do que os controles de 0,0% de BeOH. Para *S. aureus*, o inóculo desafiado tornou-se irrecuperável no Dia 4 e posteriormente com 0,74% de BeOH, no Dia 8 com 0,5% ou 0,6% de BeOH, em comparação com o Dia 10 para o controle positivo (Figura 5D). Da mesma forma, o *M. luteus* desafiado era irrecuperável no Dia 8 com 0,74% de BeOH, no Dia 14 com 0,5% ou 0,6% de BeOH, e o controle positivo ainda possui micróbios recuperáveis baixos no Dia 14 (Figura 5E); e o *C. albicans* desafiado era irrecuperável no Dia 8 em todos os três níveis de BeOH e no Dia 10 para o controle positivo (Figura 5F). Portanto, uma atividade antimicrobiana robusta nas formulações testadas pode ser demonstrada.

[00376] Exemplo 6: O objetivo desta experiência foi provar efeitos estabilizadores adicionais por tampões e/ou excipientes usados em uma formulação compreendendo um construto de anticorpo biespecífico da presente invenção e um conservante. Foram examinados o domínio modelo anti-FAP α , domínio anti-CD3 isolado (I2C, como tipicamente usado em todas os construtos de anticorpos biespecíficos exemplo), construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3 e construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3. Para domínio FAP α , domínio anti-CD3 e construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3, o procedimento experimental foi o mesmo. Primeiramente, as amostras de proteína foram dialisadas em tampão Tris-fosfato (Tris 35 mM, fosfato 17,5 mM, pH 6,0) e

(Tris 35 mM, fosfato 17,5 mM, citrato 50 mM, pH 6,0), respectivamente. A concentração de proteína foi ajustada para 0,3 mg/mL após diálise. Em segundo lugar, a reação de troca hidrogênio-deutério (HDX) foi iniciada por diluição de 1 a 5 das amostras de proteína no tampão D20 correspondente com exatamente a mesma composição. Em terceiro lugar, a reação HDX foi extinta após 10 s, 1 min, 10 min, 1 hora, 4 horas e 12 horas e, em seguida, as amostras de proteína extintas foram analisadas por espectrometria de massa. Para FAPa, a reação HDX foi realizada a 4 °C, 25 °C e 37 °C. A reação HDX foi realizada a 37 °C para o construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3AMG330 e anti-CD3. Para a avaliação da estabilidade do construto do anticorpo na presença de álcool benzílico, o álcool benzílico foi adicionado à amostra de proteína diretamente na concentração de 0,9%. Para o construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3, as amostras de proteínas foram dialisadas em (a) KH₂PO₄ a 10 mM, sacarose a 2%, manitol a 4% pH 6 e (b) KH₂PO₄ a 10 mM, sacarose a 2%, manitol a 4%, citrato a 50 mM pH 6, respectivamente. A concentração de proteína foi ajustada para 1 mg/mL após diálise. Em segundo lugar, a reação HDX foi iniciada por diluição de 1 a 5 das amostras de proteína no tampão D20 correspondente com exatamente a mesma composição. Em terceiro lugar, a reação HDX foi extinta após 10 s, 10 min, 2 hr, 8 hr, 16 hr, 24 hr e, em seguida, as amostras de proteína extintas foram analisadas por espectrometria de massa. A experiência foi realizada a 25 °C.

[00377] As figuras mostram os efeitos de estabilização do citrato - onde aplicável na presença de álcool benzílico

- no domínio FAP α (Fig. 6A), domínio anti-CD3, em que o peptídeo 108-112 no domínio anti-CD3 (YISYW) corresponde ao peptídeo 367-370 em FAP α (Fig. 6B), construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3 no peptídeo 364-368, em que o construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3 (YISYW) corresponde ao peptídeo 366-370 em FAP α (Fig. 6C) e construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3, em que o peptídeo 365-369 no construto de anticorpo biespecífico de EGFRvIII (YISYW) corresponde ao peptídeo 366-370 em FAP α (Fig. 6D). Por conseguinte, podem ser observados os efeitos de estabilização do citrato na região CDR-H3 (YISYW) do domínio anti-CD3 para diferentes moléculas de BiTE. Para FAPa, anti-CD3, construto de anticorpo biespecífico CD33xCD3, as condições experimentais são idênticas e os efeitos de estabilização são equivalentes. Para construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3, a experiência foi realizada em condições ligeiramente diferentes, como descrito acima, mas o efeito de estabilização é igualmente dado. Portanto, o citrato é capaz de estabilizar construtos de anticorpos biespecíficos na presença de um conservante, quando necessário.

[00378] Além disso, foram testados os efeitos do citrato e do álcool benzílico para FAPa, AMG 330, AMG 596 e o próprio aglutinante de CD3. Os resultados para cada construto examinado mostram os efeitos semelhantes. Aqui, mostra-se que o citrato e o álcool benzílico podem ter efeitos contrários na região dos resíduos 366-370 (YISYW). As Figuras 6E e 6F mostram os efeitos individuais de citrato e álcool benzílico. Por exemplo, a adição de citrato (quadrados) à formulação de Tris-fosfato (círculos) reduz a dinâmica

conformacional dessa região. Como comparação, a adição de álcool benzílico (triângulos) à formulação de Tris-fosfato aumenta a dinâmica conformacional dessa região. As Figuras 6G e 6H mostram os efeitos de neutralização do citrato e álcool benzílico. Com as adições de citrato e álcool benzílico (diamantes vazios), a dinâmica conformacional foi restaurada na formulação de Tris-fosfato (círculos sólidos), indicando que citrato e álcool benzílico se contrapõem. Por conseguinte, o citrato pode servir como um agente estabilizador complementar para neutralizar a ação desestabilizadora de um conservante, caso o construto de anticorpo biespecífico seja maior do que os efeitos estabilizadores (efeito antidimerização) do conservante, tal como álcool benzílico, podem equilibrar.

[00379] Exemplo 7: Este exemplo é direcionado para a melhoria do construto de anticorpo biespecífico de baixa concentração, tal como a recuperação BiTE® de bolsas de infusão IV. A baixa concentração de BiTE® é normalmente necessária como resultado da alta potência dos construtos de anticorpo BiTE®. Durante os estudos de compatibilidade com bolsas IV, os construtos de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 é diluído para concentrações muito baixas em uma solução salina a 0,9% (v/v) para administração através de infusão intravenosa contínua. A dosagem de corte mais baixa para estudos clínicos de FIH requer que a concentração de proteína seja de cerca de 80 ng/mL. A análise da recuperação de construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 a esta concentração extremamente baixa exigiu alguma ingenuidade e adaptação de um método de cromatografia de fase reversa padrão para maximizar o sinal da proteína

[00380] Um estudo inicial que investigou a recuperação do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 com e sem a adição da solução estabilizante intravenosa IVSS compreendendo citrato a 25 mM, lisina a 1,25 M e polissorbato a 0,1% a pH 7 levou à observação de que, sob os mesmos protocolos de preparação, o sinal da proteína que foi diluído em solução salina na presença de IVSS foi substancialmente superior ao sinal da proteína que foi diluída em solução salina na ausência de IVSS. Uma única concentração de IVSS de 4% (v/v) estava sendo utilizada para este estudo.

[00381] Para tentar entender a discrepância no sinal, um pequeno estudo foi concebido para comparar a área do pico de proteína registada após a eluição de uma coluna C8 usando absorvância de 215 nm como sinal gravado. O protocolo a seguir descreve brevemente a experiência realizada. Um estoque de construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 com uma concentração de 2 mg/mL foi diluído em série 2000 vezes para 1 µg/mL em tubos Eppendorf usando solução salina a 0,9% com 0%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8% ou 10% (v/v) de IVSS como diluente. As diluições foram realizadas no mesmo lote de estoque de construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 usando o seguinte esquema de diluição: 1:10->1:10->1:10->1:2. 50 µL de cada amostra de construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 com concentrações nominais de 1 µg/mL foram carregados em uma coluna C8 e eluídos usando cromatografia de fase reversa. Os cromatogramas foram registrados usando absorvância de 215 nm. A altura e a área do pico foram registadas para cada amostra para comparação. Os dados em bruto gerados são apresentados abaixo na Figura 7A. A área do pico para cada amostra de construto de

anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 é plotada em função da % IVSS incluída na solução de diluição abaixo na Figura 2.

[00382] Na Figura 7B, é claro que a adição de IVSS a 1% (v/v) ao diluente de solução salina tem um impacto significativo na recuperação do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3, aumentando a recuperação do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 em aproximadamente 250%. Com a adição de IVSS entre 4% e 10% (v/v) ao diluente de solução salina a recuperação do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 é constante, avaliada pela altura e área do pico de eluição, indicando que a recuperação total da molécula foi obtida em 4% (v/v) de IVSS.

[00383] Como as amostras do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 foram todas preparadas e analisadas sob condições idênticas, com a % IVSS no diluente de solução salina, sendo a única variável entre as amostras, é lógico concluir que as quantidades de proteína carregadas na coluna variaram entre amostras de 0% de IVSS, 1-2% de IVSS e 4-10% de IVSS, como resultado da perda de proteína; presumivelmente por adsorção em superfícies com as quais a molécula entrou em contato durante o processamento. Por outro lado, a recuperação aumentada do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 na presença de solução IVSS é presumivelmente um resultado do bloqueio do construto de anticorpo biespecífico EGFRvIIIxCD3 na adsorção na superfície durante o processamento. Esse entendimento pode ser usado em várias etapas de administração do produto fármaco para garantir a entrega precisa do produto fármaco ativo.

Tabela 5: Tabela de Sequência

1	CDR1 de CD19 VL	artificial	aa	KASQSVDYDGDSYLN
2	CDR2 de CD19 VL	artificial	aa	DASNLVS
3	CDR3 de CD19 VL	artificial	aa	QQSTEDPWT
4	CDR1 de CD19 VH	artificial	aa	SYWMN
5	CDR2 de CD19 VH	artificial	aa	QIWPGDGDNYNGKFKG
6	CDR3 de CD19 VH	artificial	aa	RETTTVGRYYYAMDY
7	CD19 VL	artificial	aa	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQ SVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYD ASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHP VEKVDAATYHCQQSTEDPWTFFGGTKL EIK
8	CD19 VH	artificial	aa	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY AFSSYWMNWVKQRPGGLEWIGQIWPG DGDNYNGKFKGKATLTADESSSTAYM QLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYY YAMDYWGQTTVTVSS
9	CDR1 de CD3 VH	artificial	aa	RYTMH
10	CDR2 de CD3 VH	artificial	aa	YINPSRGYTNYNQKFKD
11	CDR3 de CD3 VH	artificial	aa	YYDDHYCLDY

12	CDR1 de CD3 VL	artificial	aa	RASSSVSYMN
13	CDR2 de CD3 VL	artificial	aa	DTSKVAS
14	CDR3 de CD3 VL	artificial	aa	QQWSSNPLT
15	CD3 VH	artificial	aa	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGY TFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPS RGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDY WGQGTTLTVSS
16	CD3 VL	artificial	aa	VDDIQLTQSPAIMASAPGKVTMTCRA SSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSK VASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSEMA EDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
17	CD19xCD3 scFv BLINCYTO, incluindo ligante e his-tag	artificial	aa	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQ SVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYD ASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHP VEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKL EIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGA ELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNW VKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGK FKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASED SAVYFCARRETTTVGRYYAMDYWGQG TTVTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPG ASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPG QGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGG SGGSGGSGGGVDDIQLTQSPAIMSA

				SPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKVASGVVPYRFSGSGSG TSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP LTFGAGTKLELKHHHHHH
18	I2C CDR-L1	artificial	aa	GSSTGAVTSGNYPN
19	I2C CDR-L2	artificial	aa	GTKFLAP
20	I2C CDR-L3	artificial	aa	VLWYSNRWV
21	I2C CDR-H1	artificial	aa	KYAMN
22	I2C CDR-H2	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKD
23	I2C CDR-H3	artificial	aa	HGNFGNSYISYWAY
24	I2C de VH	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNGNSY ISYWAYWGQGLVTVSS
25	I2C de VL	artificial	aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTK FLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L
26	VH-VL de I2C	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNGNSY ISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL

27	E11 ccVH	CD33	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGY TFTNYGMNWKQAPGQCLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVY FDYWGQGTSVTVSS
28	E11 CD33 VH		Artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGY TFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVY FDYWGQGTSVTVSS
29	E11 HCDR1	CD33	artificial	aa	NYGMN
30	E11 HCDR2	CD33	artificial	aa	WINTYTGEPTYADKFQG
31	E11 HCDR3	CD33	artificial	aa	WSWSDGYVYFDY
32	E11 CD33 CC VL		artificial	aa	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQ SVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLL SWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTI DSPQPEDSATYYCQQSAHFPITFGCGT RLEIK
33	E11 CD33 VL		artificial	aa	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQ SVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLL SWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTI DSPQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGT RLEIK
34	E11 LCDR1	CD33	artificial	aa	KSSQSVLDSSTNKNSLA
35	E11 LCDR2	CD33	artificial	aa	WASTRES

36	E11 CD33 LCDR3	artificial	aa	QQSAHFPIIT
37	E11 CD33 HL CC	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGY TFTNYGMNWKQAPGQCLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVY FDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKS SQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKL LLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTL TIDSPQPEDSATYYCQQSAHFPIITFGC GTRLEIK
38	E11 CD33 HL	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGY TFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVY FDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKS SQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKL LLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTL TIDSPQPEDSATYYCQQSAHFPIITFGQ GTRLEIK
39	Molécula biespecífica CD33 CC E11 HL x I2C HL	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGY TFTNYGMNWKQAPGQCLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVY FDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKS SQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKL LLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTL

				<p>TIDSPQPEDSATYYCQQSAHFPITFGC GTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL</p>
40	CD33 E11 HL x I2C HL	artificial	aa	<p>MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSG AEVKKPGESVKVSCASGYFTNYGMN WVKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAD KFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGD DTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGT SVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ SPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSS TNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTR ESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPE DSATYYCQQSAHFPITFGQGTRLEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC AASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGG</p>

				KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHH
41	Molécula HLE bienespecífica CD33 CC x I2C-scFc	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGY TFTNYGMNWKQAPGQCLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVY FDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKS SQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKL LLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTL TIDSPQPEDSATYYCQSAHFPITFGC GTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

				GGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	CDR1 de EGFRvIIIxCD3 -scFc VH	artificial	aa	NYGMH
43	CDR2 de EGFRvIIIxCD3 -scFc VH	artificial	aa	VIWYDGSDKYYADSVRG
44	CDR3 de EGFRvIIIxCD3 -scFc VH	artificial	aa	DGYDILTG NPRDFDY
45	CDR1 de EGFRvIIIxCD3 -scFc VL	artificial	aa	RSSQSLVHSDGNTYLS
46	CDR2 de EGFRvIIIxCD3 -scFc VL	artificial	aa	RISRFRS
47	CDR3 de EGFRvIIIxCD3 -scFc VL	artificial	aa	MQSTHVPRT
48	EGFRvIII_CCx CD3-scFc VH	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGF TFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAWIWD GSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYL

				QMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNP RDFDYWGQGLVTVSS
49	EGFRvIII_CCx CD3-scFc VL	artificial	aa	DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQ SLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIY RISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEIS RVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTK VEIK
50	EGFRvIII_CCx CD3-scFc scFv	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGF TFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAWIWD GSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNP RDFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISC RSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPR LLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGDFT LEISRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFG CGTKVEIK
51	Molécula biespecífica EGFRvIII_CCx CD3-scFc	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGF TFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAWIWD GSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNP RDFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISC RSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPR LLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGDFT LEISRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFG CGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSAASGFTFNKYAMNHWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTA

				VYYCVRHGNGFGNSYISYWAYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLGGAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
52	Molécula HLE biespecífica EGFRvIII_CCx CD3-scFc	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGF TFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYD GSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNP RDFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISC RSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPR LLIYRISRFRSGVPDRFSGSGAGTDFT LEISRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFG CGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNGFGNSYISYWAYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLGGAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

				TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSDKHTCPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
53	CDR1 MSLN_5 VH	de artificial	aa	DYYMT
54	CDR2 MSLN_5 VH	de artificial	aa	YISSSGSTIYYADSVKG
55	CDR3 MSLN_5 VH	de artificial	aa	DRNSHFDY
56	CDR1 MSLN_5 VL	de artificial	aa	RASQGINTWLA
57	CDR2 MSLN_5 VL	de artificial	aa	GASGLQS
58	CDR3 MSLN_5 VL	de artificial	aa	QQAQSFPR
59	MSLN_5 VH	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISS GSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFL QMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWG QGTLVTVSS

60	MSLN_5 VL	artificial	aa	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQAKSFPRTEFGQGTKVEIK
61	MSLN_5 scFv	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFL QMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIN TWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQAKSFPRTEFGQGTKVEIK
62	MSLN_5xI2C0 biespecífico molécula	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFL QMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIN TWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQAKSFPRTEFGQGTKVEIKSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN SYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA

				LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVL
63	Molécula HLE bienespecífica MSLN_5xCD3- scFc	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFL QMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFYWG QGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGIN TWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSG VPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQAQKSFPRTFGQGTKVEIKSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN SYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPCCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSD

				<p>KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
64	Molécula HLE biespecífica MSLN_5_CCxCD 3-scFc	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSDHYMSWIRQAPGKCLEWFSYISSS GGIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHPFDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSVSASVGRVTITCRASQDIS RWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA IYYCQQAKSFPRTFGCGTKVEIKSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN SYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</p>

				<p>KPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
65	CDR-H1 CDH19 65254.007	artificial	aa	SYGMH
66	CDR-H2 CDH19 65254.007	artificial	aa	FIWYEGSNKYAESVKD
67	CDR-H3 CDH19 65254.007	artificial	aa	RAGIIGTIGYYYGMDV
68	CDR-L1 CDH19 65254.007	artificial	aa	SGDRLGEKYTS

69	CDR-L2 CDH19 65254.007	artificial	aa	QDTKRPS
70	CDR-L3 CDH19 65254.007	artificial	aa	QAWESSTVV
71	VH CDH19 65254.007	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTITVTVSS
72	VL CDH19 65254.007	artificial	aa	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRL GEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQDKRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMD EADYYCQAWESSTVVFSGGKLTVLS
73	VH-VL CDH19 65254.007	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWESSTVVFSGGKLT TVLS
74	CDH19 65254.007 x I2C	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS

				GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYICQAWESSTVVFGGGTKL TVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVLHHHHH
75	Molécula HLE bienespecífica CDH19 65254.007 x I2C -scFc	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSAAASGFT TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYICQAWESSTVVFGGGTKL TVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ

				KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
76	Molécula HLE bienespecífica CDH19 65254.007 x I2C - scFc_delGK	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWESSTVVFGGGTKL

				<p> TVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYG STYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK </p>
77	CDH19 65254.007_CC	artificial	aa	<p> QVQLVESGGGVVQPGGSLRLS AASGF TFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAFIWE </p>

	x I2C -scFc VH			GSNKYYAESVKDRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTTTVTVSS
78	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc VL	artificial	aa	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRL GEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQDKRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMD EADYYCQAWESSTVVF GCGTKLTVL
79	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc scFv	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWESSTVVF GCGTKL TVL
80	Molécula bienespecífica CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWESSTVVF GCGTKL TVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV

				<p>RHG NFGNSY I SYWAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVL</p>
81	<p>Molécula HLE bienespecífica CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc</p>	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAFIWE GSNKYYAESVKDRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS GGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWESSTVVF GCGTKL TVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHG NFGNSY I SYWAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV</p>

				<p>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
82	<p>Molécula HLE biespecífica CDH19 65254.007_CC x I2C - scFc_delGK</p>	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAFIWYE GSNKYYAESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGY YYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQ DTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYQCQAWESSTVVFGCGTKL TVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS</p>

				<p>LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYG STYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>
83	CDR1 FLT3_7 A8xCD3-scFc VH	de artificial	aa	NARMGVS
84	CDR2 FLT3_7 A8xCD3-scFc VH	de artificial	aa	HIFSNDEKSYSTSLKN
85	CDR3 FLT3_7	de artificial	aa	IVGYGSGWYGFFDY

	A8xCD3-scFc VH			
86	CDR1 de FLT3_7 A8xCD3-scFc VL	artificial	aa	RASQGIRNDLG
87	CDR2 de FLT3_7 A8xCD3-scFc VL	artificial	aa	AASTLQS
88	CDR3 de FLT3_7 A8xCD3-scFc VL	artificial	aa	LQHNSYPLT
89	FLT3_7 A8xCD3-scFc VH	artificial	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIF SNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWY GFFDYWGQGLVTVSS
90	FLT3_ A8- scFc VL	artificial	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKVEIK
91	FLT3_7 A8xCD3- scFv	artificial	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIF SNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWY GFFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYA

				ASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKV EIK
92	Molécula bienespecífica FLT3_7 A8xCD3	artificial	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIF SNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWY GFFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYA ASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKV EIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVL
93	Molécula HLE bienespecífica FLT3_7 A8xCD3-scFc	artificial	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIF SNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWY GFFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYA ASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS

				LQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKV EIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
--	--	--	--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

94	VH CDR1 DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	SYYS
95	VH CDR2 DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	YVYYSGTTNYPNPSLKS
96	VH CDR3 DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	IAVTGFYFDY
97	VL CDR1 DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	RASQRVNNNYLA
98	VL CDR2 DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	GASSRAT
99	VL CDR3 DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	QQYDRSPLT
100	DLL3_1_CC_de lGK de VH	artificial	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYS GTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYW GQGLTVTVSS
101	DLL3_1_CC_de lGK de VL	artificial	aa	EIVLTQSPGTLISLSPGERVTLSCRASQ RVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASS RATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEP EDFAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIK
102	DLL3_1_CC_de lGK	artificial	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYS GTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK

				LSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYW GQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSSLSPGERVTLSCRASQRV NNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIK
103	Molécula bienespecífica DLL3_1_CCxCD 3_delGK	artificial	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYS GTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYW GQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSSLSPGERVTLSCRASQRV NNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQA PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVL
104	Molécula HLE bienespecífica DLL3_1_CCxCD 3-scFc_delGK	artificial	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYS GTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYW GQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI

			VLTQSPGTLSSLSPGERVTLSCRASQRV NNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQA PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVLGGGGDKHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGD KHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
--	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

				TVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT QKSLSLSPGK
105	VH CDR1 CD19 97-G1RE-C2	artificial	aa	SYGMH
106	VH CDR2 CD19 97-G1RE-C2	artificial	aa	VISYEGSNKYAESVKG
107	VH CDR3 CD19 97-G1RE-C2	artificial	aa	DRGTIFGNYGLEV
108	VH CD19 97- G1RE-C2 CC	artificial	aa	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVISYE GSNKYYAESVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRDEDTAVYYCARDRTIFGNYG LEVWGQGTITVTVSS
109	VL CDR1 CD19 97-G1RE-C2	artificial	aa	RSSQSLHKNFNYLD
110	VL CDR2 CD19 97-G1RE-C2	artificial	aa	LGSNRAS
111	VL CDR3 CD19 97-G1RE-C2	artificial	aa	MQALQTPFT
112	VL CD19 97- G1RE-C2 CC	artificial	aa	DIVMTQSPVSLPVISGEPASISCRSSQ SLHKNFNYLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGCGTK VDIK
113	CD19 97- G1RE-C2 CC x I2C0	artificial	aa	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIVMT QSPVSLPVISGEPASISCRSSQSLHKN FNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCMQALQTPFTFGCGTKVDIKG GGSGGGGGGGGGSQVQLVESGGGVVQ

				<p>PGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAVISYEGSNKYAESVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARDRGTIFGNYGLEVWGQTTVTVS SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL</p>
114	CD19 G1RE-C2 CC x I2C0-scFc	97-artificial	aa	<p>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIVMT QSPLSLPVISGEPASISCRSSQSLLHK NAFNLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCMQALQTPFTFGCGTKVDIKG GGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAVISYEGSNKYAESVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARDRGTIFGNYGLEVWGQTTVTVS SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG</p>

				<p> TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK </p>
115	VH CDR1 CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	SYPIN
116	VH CDR2 CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	VIWTGGGTNYASSVKG
117	VH CDR3 CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
118	VL CDR1 CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	KSSQSLLYSSNQKNYFA

119	VL CDR2 CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	WASTRES
120	VL CDR3 CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	QQYYSYPYT
121	VH CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF SFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTG GGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRG AMDYWGQGTLLVTVSS
122	VL CDH3 G8A 6-B12	artificial	aa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIK
123	CDH3 G8A 6- B12 scFv	artificial	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF SFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTG GGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRG AMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFG QGTKLEIK
124	Molécula biespecífica CDH3 G8A 6- B12 x I2C0	artificial	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF SFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTG GGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRG AMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK

				SSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLLGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
125	Molécula HLE bienespecífica CDH3 G8A 6- B12 x I2C0	artificial	aa	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF SFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTG GGTNYASSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRG AMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA

				<p>RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSDKHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSV MSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
126	BCMA A7 27- C4-G7 CDR1 VH	artificial	aa	NHIIH
127	BCMA A7 27- C4-G7 CDR2 VH	artificial	aa	YINPYPGYHAYNEKFQG
128	BCMA A7 27- C4-G7 CDR3 VH	artificial	aa	DGYRDTDVLDY

129	BCMA A7 27- C4-G7 CDR1 VL	artificial	aa	QASQDISNYLN
130	BCMA A7 27- C4-G7 CDR2 VL	artificial	aa	YTSRLHT
131	BCMA A7 27- C4-G7 CDR3 VL	artificial	aa	QQGNTLPWT
132	BCMA A7 27- C4-G7 CC (44/100) VH	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPY PGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSED TAVYYCARDGYRDTDVL DYWGQGT LVTVSS
133	BCMA A7 27- C4-G7 CC (44/100) VL	artificial	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL HTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPE DIATYYCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK
134	BCMA A7 27- C4-G7 CC (44/100) scFv	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPY PGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSED TAVYYCARDGYRDTDVL DYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR LHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEP EDIATYYCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK
135	Molécula biespecífica BCMA A7 27-	artificial	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPY PGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYM

	C4-G7 (44/100) I2C0	CC x		ELSSLRSED TAVYYCARDGYRDTDVL DYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSL SASVGDRTITCQAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR LHTGVPSRFSGSGSGTDFTF TISSLEP EDIATYYCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
136	Molécula HLE bienespecífica BCMA A7 27- C4-G7 (44/100) I2C0-scFc	CC x	artificial aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGY TFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPY PGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSED TAVYYCARDGYRDTDVL DYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSL SASVGDRTITCQAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR LHTGVPSRFSGSGSGTDFTF TISSLEP EDIATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG

				<p>SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>
137	CDR1 de PM 76-B10.17 CC VH	artificial	aa	DYYMY
138	CDR2 de PM 76-B10.17 CC VH	artificial	aa	IISDAGYYTYYSDIK

139	CDR3 de PM 76-B10.17 CC VH	artificial	aa	GFPLLRHGAMDY
140	CDR1 de PM 76-B10.17 CC VL	artificial	aa	KASQNVDANVA
141	CDR2 de PM 76-B10.17 CC VL	artificial	aa	SASYVYW
142	CDR3 de PM 76-B10.17 CC VL	artificial	aa	QQYDQQLIT
143	PM 76-B10.17 CC VH	artificial	aa	QVQLVESGGGLV _K PGESLR _L SCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYYTYYS _D I _I KGRFTISRDN _A KNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGT _L VTVSS
144	PM 76-B10.17 CC VL	artificial	aa	DIQMTQSPSSLSASVGD _R VTITCKASQ NVDANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYV YWDVPSR _F SGSASGTDFTLT _I SSVQSE DFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK
145	PM 76-B10.17 CC scFv	artificial	aa	QVQLVESGGGLV _K PGESLR _L SCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYYTYYS _D I _I KGRFTISRDN _A KNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGT _L VTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGD _R VTITCKAS QNVDANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSR _F SGSASGTDFTLT _I SSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK

146	Molécula bienespecífica PM 76-B10.17 CC x I2C0	artificial	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYITYYSIDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFRSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
147	PM 76-B10.17 CC x I2C0- scFc bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYITYYSIDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFRSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV

				<p>ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGG SGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>
148	PM 76-B10.17 CC x I2C0- scFc_delGK biespecífica	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVKPGESLRLSAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYYTYYSDI IKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM</p>

	Molécula HLE		DYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
--	--------------	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

				ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
149	Molécula bienespecífica PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc	artificial	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
150	PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS

				EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
--	--	--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

151	PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc_delGK bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDA GYTYYSIDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFGSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGDKHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
-----	-------------------------------------------------------------------------------------------	------------	----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

				KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
152	CDR1 de PM 76-B10.11 CC VH	artificial	aa	DYYMY
153	CDR2 de PM 76-B10.11 CC VH	artificial	aa	IISDGGYYTYYSIDIIG
154	CDR3 de PM 76-B10.11 CC VH	artificial	aa	GFPLLRHGAMDY
155	CDR1 de PM 76-B10.11 CC VL	artificial	aa	KASQNVDTNVA
156	CDR2 de PM 76-B10.11 CC VL	artificial	aa	SASYVYW
157	CDR3 de PM 76-B10.11 CC VL	artificial	aa	QQYDQQLIT
158	PM 76-B10.11 CC VH	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYYTYYSIDIIGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSS

159	PM 76-B10.11 CC VL	artificial	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQ NVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYV YWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQSE DFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK
160	PM 76-B10.11 CC scFv	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNVDNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK
161	Molécula biespecífica PM 76-B10.11 CC x I2C0	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNVDNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGG SGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLG

				GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
162	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYTYYSDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM DYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG

				GGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
163	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc_delGK bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	QVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM DYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

				<p>NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p>
164	<p>Molécula biespecífica PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43) - scFc</p>	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVQKPGESLRLSCAASGF TFSDYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM DYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFRSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLLTVSSGGGG</p>

				<p>SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL</p>
165	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43) - scFc bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYITYYSIDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</p>

				TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGS DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSGDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
166	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc_delGK bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGF TFSDYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFGSGASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGGGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR

				<p>WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p>
167	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VH CDR1	artificial	aa	DYYMY
168	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VH CDR2	artificial	aa	IISDGGYYTYYSDIKIG
169	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VH CDR3	artificial	aa	GFPLLRRHGAMDY

170	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VL CDR1	artificial	aa	KASQNVDTNVA
171	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VL CDR2	artificial	aa	SASYVYW
172	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VL CDR3	artificial	aa	QQYDQQLIT
173	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VH	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSS
174	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc VL	artificial	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQ NVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYV YWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQSE DFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK
175	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc scFv	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK
176	Molécula biespecífica PM 76-B10.11	artificial	aa	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNAKNSLYL

	CC x I2C0- scFc			<p>QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLVSPGG TVTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL</p>
177	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYTYYSDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGG</p>

				<p>SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>
178	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc_delGK bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY</p>

				VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
--	--	--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

179	Molécula bienespecífica PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYITYYSIDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL</p>
180	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc bienespecífica Molécula HLE	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVVKPGESLRLSCAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYITYYSIDIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV</p>

				<p>ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>
181	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43) -	artificial	aa	<p>QVQLVESGGGLVKPGESLRLSAASGF TFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDG GYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAM</p>

	<p>scFc_delGK bienespecífica Molécula HLE</p>		<p>DYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASY VYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQS EDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYCGQGTLLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW</p>
--	---------------------------------------------------------	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

				ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
--	--	--	--	----------------------------------------------------------------------------

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende

i) um construto de anticorpo biespecífico, ligando-se a um antígeno da superfície da célula alvo através de um primeiro domínio de ligação e ao antígeno de superfície da célula T CD3 através de um segundo domínio de ligação, em que o construto de anticorpo de cadeia está presente em uma concentração na gama de 0,5 µg/mL a 20 mg/mL, preferencialmente 0,5 µg/mL a 10 ou 5 mg/mL;

ii) pelo menos um conservante selecionado a partir de álcool benzílico, clorobutanol, meta-cresol, metilparabeno, fenoxietanol, propilparabeno e tiomerosal a uma concentração eficaz para inibir o crescimento de micróbios; e

iii) um diluente, em que o construto de anticorpo biespecífico é estável.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o construto de anticorpo biespecífico está presente a uma concentração na gama selecionada do grupo consistindo em

(a) 0,5 a 200 µg/mL a um pH de 6,5 a 7,5; ou

(b) 0,5 a 1000 µg/mL a um pH de 4,0 a 6,0; ou

(c) 0,5 µg a 2 mg na presença de um agente estabilizador do domínio de ligação a CD3, preferencialmente citrato, a um pH de 4,0 a 7,5; ou

(d) 0,5 µg a 20 mg, preferencialmente 0,05 µg/mL a 10 ou 5 mg/mL a um pH de 4,0 a 7,5, preferencialmente 4,0 a 6,0, em que o anticorpo biespecífico compreende um terceiro domínio de ligação que compreende dois monômeros polipeptídicos, cada um compreendendo uma dobradiça, um

domínio CH2 e um CH3, em que os referidos dois monômeros polipeptídicos são fundidos um ao outro através de um ligante peptídico, e em que o referido terceiro domínio de ligação compreende numa ordem amino a carboxila:

dobradiça-CH2-CH3-ligante-dobradiça-CH2-CH3.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o construto de anticorpo biespecífico é um construto de anticorpo biespecífico de cadeia única.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o pelo menos um conservante está presente em uma concentração na gama de 0,001 a 1,0% (p/v).

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o conservante está presente em uma concentração na gama de 0,009 a 0,9% (p/v), preferencialmente 0,11 a 0,9% ou 0,5 a 0,75% (p/v).

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o diluente é um tampão compreendendo um sal selecionado do grupo consistindo em fosfato, acetato, citrato, succinato e tartarato e/ou em que o tampão compreende histidina, glicina, TRIS glicina, Tris ou suas misturas.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o diluente é um tampão selecionado do grupo consistindo em fosfato de potássio, ácido acético/acetato de sódio, ácido cítrico/citrato de sódio, ácido succínico/succinato de sódio, ácido tartárico/tartarato de sódio e histidina/histidina HCl ou suas misturas.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o diluente é um tampão presente a uma concentração na gama de 0,1 a 150 mM, preferencialmente na gama de 0,25 a 50 mM.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o diluente é um tampão compreendendo citrato.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o diluente é um tampão compreendendo citrato a uma concentração na gama de 0,25 a 50 mM.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o pH da composição está na gama de 4,0 a 8,0, preferencialmente na gama de pH 4,0 a 5,0 ou 6,0 a 7,5, preferencialmente a pH 7,0.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica compreende ainda um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em sacarose, trealose, manitol, sorbitol, arginina, lisina, polissorbato 20, polissorbato 80, poloxâmero 188, plurônico e combinações dos mesmos.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende ainda polissorbato, preferencialmente polissorbato 80 e/ou lisina HCL.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica não compreende polissorbato, preferencialmente

polissorbato 80 e/ou lisina HCL, se a concentração do construto de anticorpo biespecífico for pelo menos 10, 15 ou 20 µg/mL, preferencialmente 15 µg/mL.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação do construto de anticorpo biespecífico se liga a pelo menos um antígeno da superfície da célula alvo selecionado a partir do grupo consistindo em CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA e PSMA.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro domínio de ligação compreende uma região VH compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 e uma região VL compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 selecionada do grupo consistindo em:

(a) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 1, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 2, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 3, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 4, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 5 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 6;

(b) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 29, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 30, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 31, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 34, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 35 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 36;

(c) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 42, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 43, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 44, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 45, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 46 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 47;

(d) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 53, CDR-

H2 conforme representado na SEQ ID NO: 54, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 55, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 56, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 57 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 58;

(e) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 65, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 66, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 67, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 68, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 69 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 70;

(f) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 83, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 84, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 85, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 86, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 87 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 88;

(g) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 94, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 95, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 96, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 97, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 98 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 99;

(h) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 105, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 106, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 107, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 109, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 110 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 111;

(i) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 115, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 116, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 117, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 118, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 119 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID

NO: 120;

(j) CDR-H1 conforme representada na SEQ ID NO: 126, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 127, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 128, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 129, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 130 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 131;

(k) CDR-H1 conforme representado na SEQ ID NO: 137, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 138, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 139, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 140, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 141 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 142;

(l) CDR-H1 conforme representado na SEQ ID NO: 152, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 153, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 154, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 155, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 156 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 157; e

(m) CDR-H1 conforme representado na SEQ ID NO: 167, CDR-H2 conforme representado na SEQ ID NO: 168, CDR-H3 conforme representado na SEQ ID NO: 169, CDR-L1 conforme representado na SEQ ID NO: 170, CDR-L2 conforme representado na SEQ ID NO: 171 e CDR-L3 conforme representado na SEQ ID NO: 172.

17. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é líquida.

18. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição

compreende < 5% de multímeros do construto de anticorpo biespecífico, preferencialmente < 1%.

19. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que os multímeros são dímeros.

20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a composição compreende < 5% de multímeros do construto de anticorpo biespecífico, preferencialmente < 1% por um período de tempo de pelo menos 4 dias, preferencialmente pelo menos 10 dias, mais preferencialmente pelo menos 14 dias à temperatura ambiente.

21. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é colocada em um recipiente de administração de plástico, de preferência feito de EVA, poliolefina e/ou PVC.

22. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o construto de anticorpo biespecífico de cadeia única é recuperado em pelo menos 90%, preferencialmente pelo menos 95, 96, 97, 98 ou mesmo pelo menos 99% da diluição do recipiente de administração de plástico compreendendo pelo menos um dos tampões e/ou excipientes, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

23. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o construto de anticorpo biespecífico de cadeia única é recuperado em pelo menos 90%, preferencialmente pelo menos 95, 96, 97, 98 ou mesmo pelo menos 99% da diluição do recipiente de administração de plástico compreendendo polissorbato 80.

24. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica compreende pelo menos 0,25 mM de citrato, pelo menos 0,0125 mM de lisina e/ou pelo menos 0,001% de polissorbatato 80 a um pH de 6,5 a 7,5.

25. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição é uma solução de armazenamento armazenada a -50 °C, preferencialmente a -40, -30 °C ou -20 °C.

26. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a composição compreende o anticorpo biespecífico compreendendo um terceiro domínio de ligação que compreende dois monômeros polipeptídicos, cada um compreendendo uma dobradiça, um domínio CH2 e um CH3, em que os referidos dois monômeros polipeptídicos são fundidos um ao outro através de um ligante peptídico, e em que o referido terceiro domínio de ligação compreende numa ordem amino a carboxila:

dobradiça-CH2-CH3-ligante-dobradiça-CH2-CH3.

27. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição é fornecida como um liofilizado para armazenamento.

28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida composição farmacêutica é armazenada até ser utilizada como solução, como solução no estado congelado ou como liofilizado, e é então administrada, opcionalmente após diluição ou reconstituição, sem a necessidade de adicionar outros excipientes selecionados de conservantes, estabilizadores ou tensoativos.

29. Método para preparar a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o construto de anticorpo biespecífico é fornecido como um liofilizado, o liofilizado compreendendo preferencialmente um lioprotetor, um tampão e/ou um tensoativo, e em que o liofilizado é reconstituído por um diluente, compreendendo um conservante e preferencialmente compreendendo um tampão e/ou um excipiente, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

30. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é para utilização no tratamento de uma doença maligna.

31. Método para o tratamento ou melhoria de uma doença maligna, caracterizado pelo fato de que compreende o passo de administração a um indivíduo em sua necessidade da composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 1, ou produzida de acordo com o método, conforme definido na reivindicação 29.

32. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é administrada por via intravenosa continuamente por 1 a 24 horas, preferencialmente 1 a 10 ou 2 a 5 horas.

33. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é administrada por via intravenosa continuamente por 2 a 14 dias, preferencialmente 2 a 10 dias, mais preferencialmente 4 a 7 dias.

34. Kit caracterizado pelo fato de que compreende o construto de anticorpo biespecífico como um liofilizado, o

liofilizado preferencialmente compreendendo um lioprotetor, um tampão e/ou um tensoativo, e um diluente, compreendendo um conservante e preferencialmente compreendendo um tampão e/ou um excipiente, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

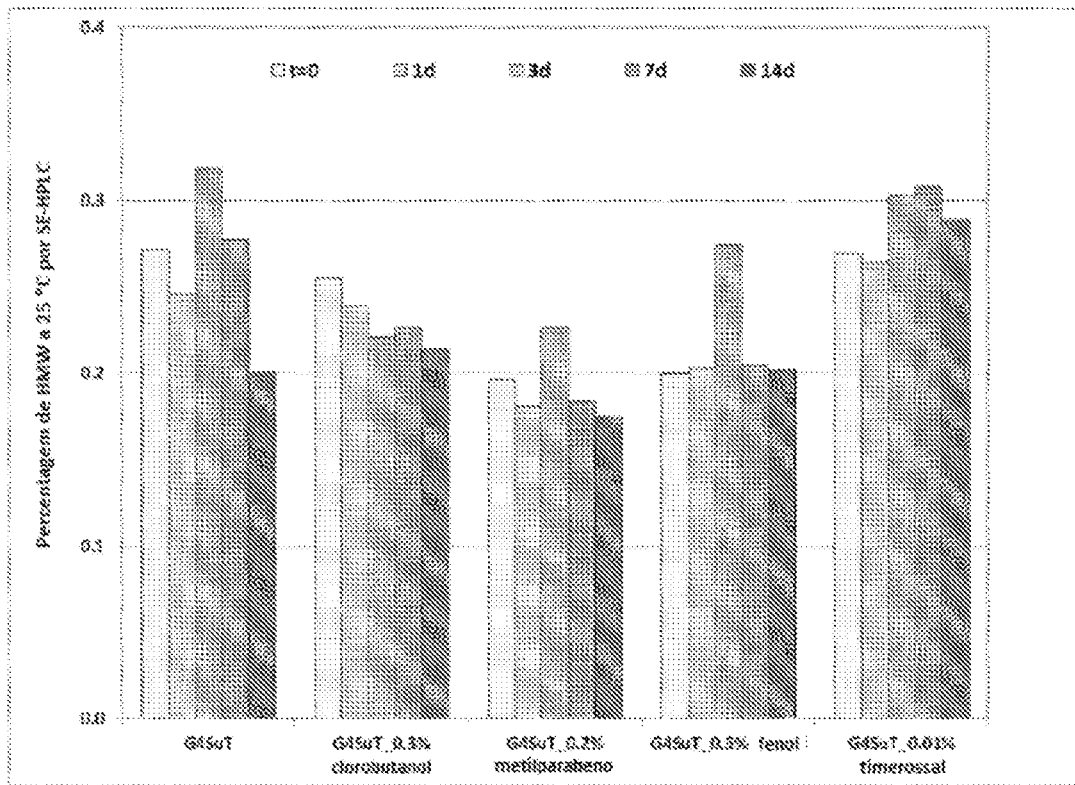


Figura 1

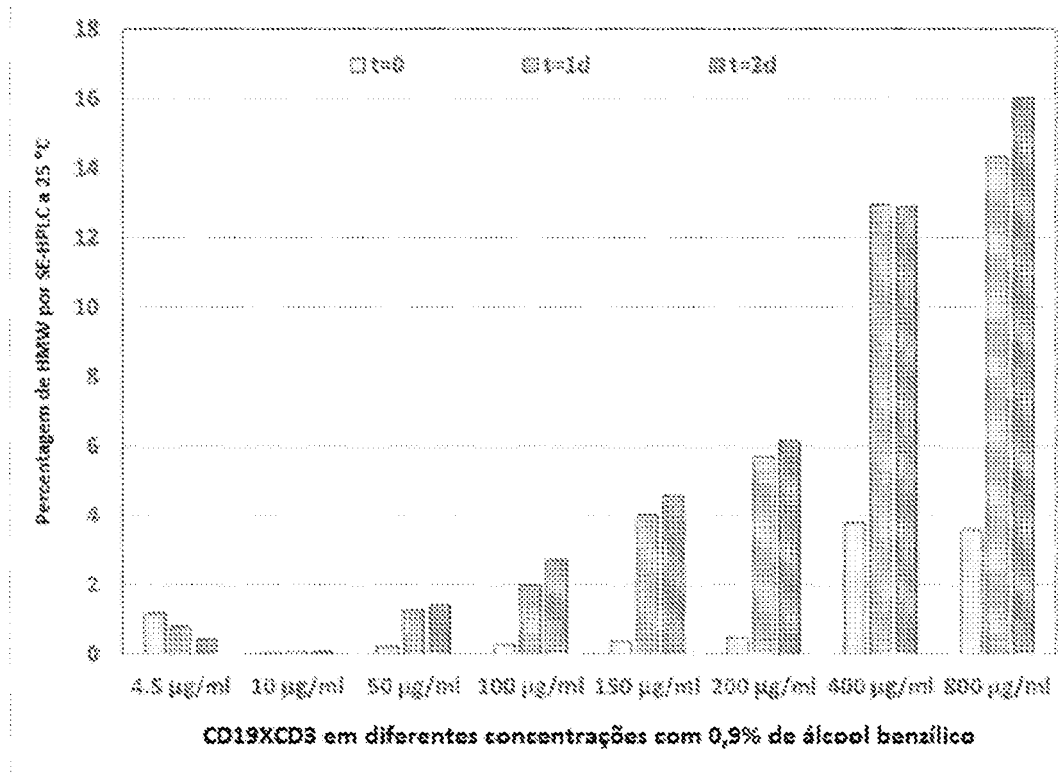


Figura 2

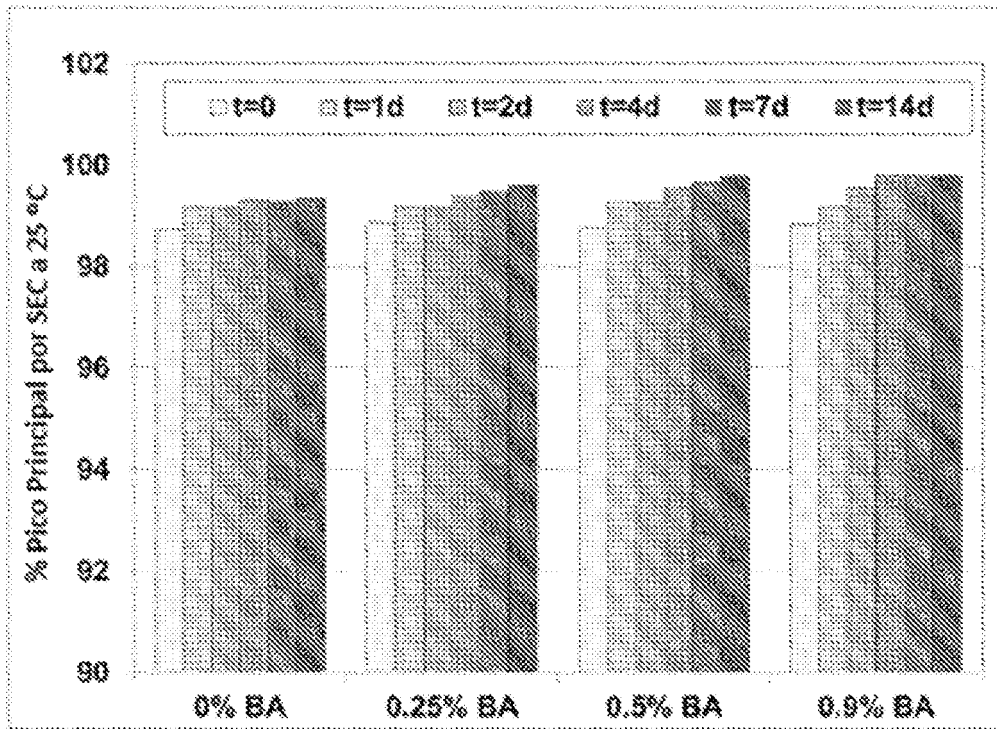


Figura 3A

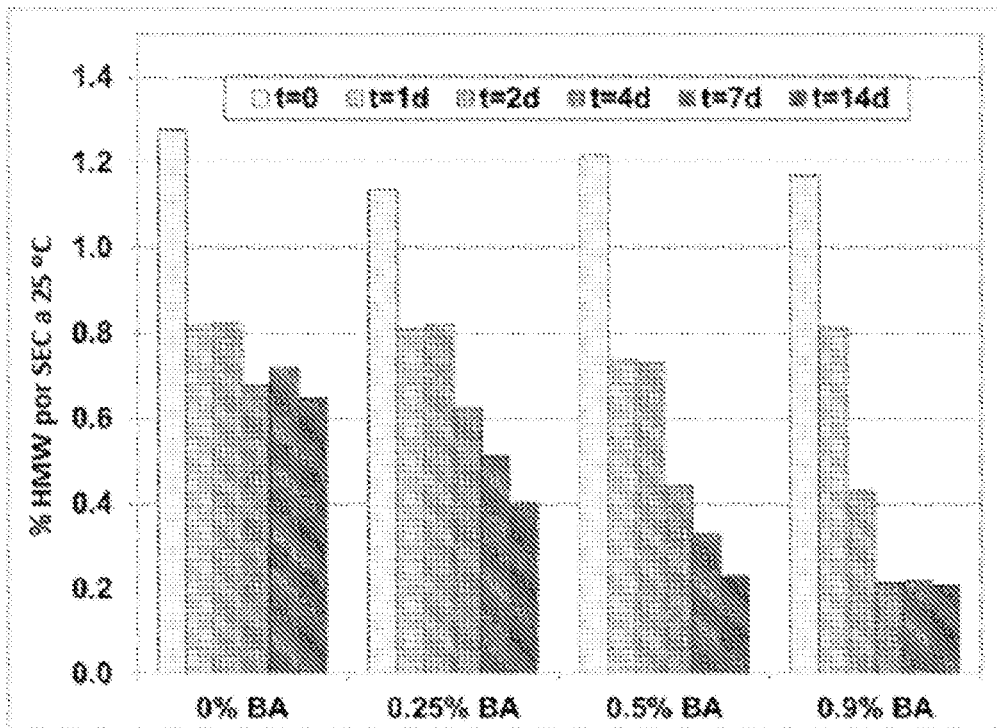


Figura 3B

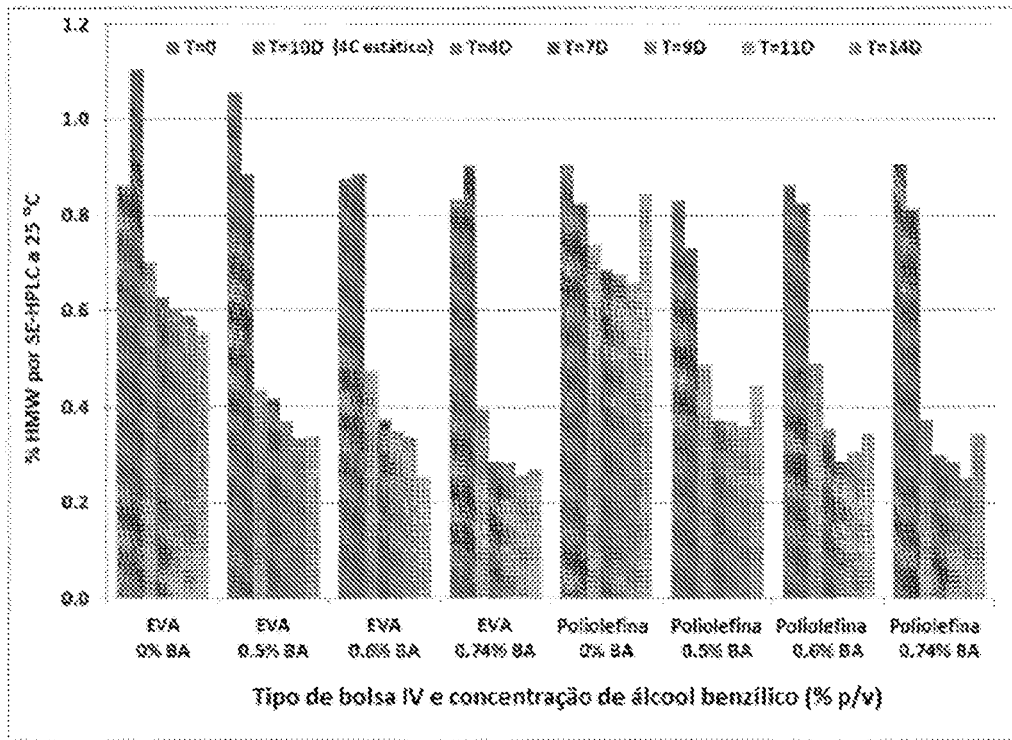


Figura 3C

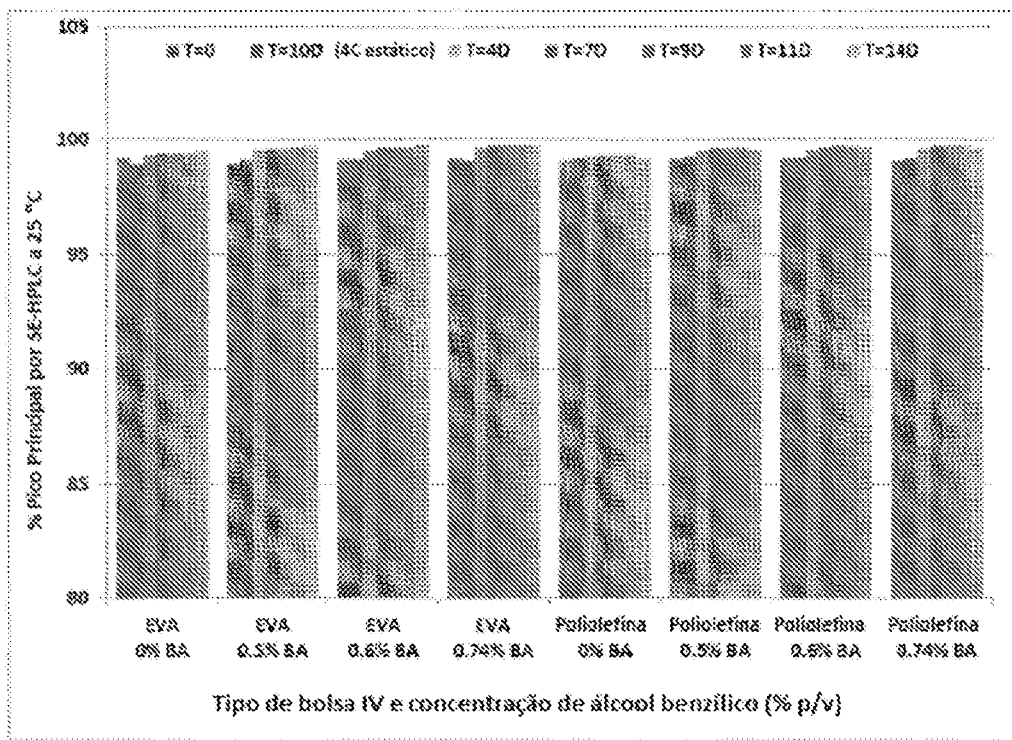


Figura 3D

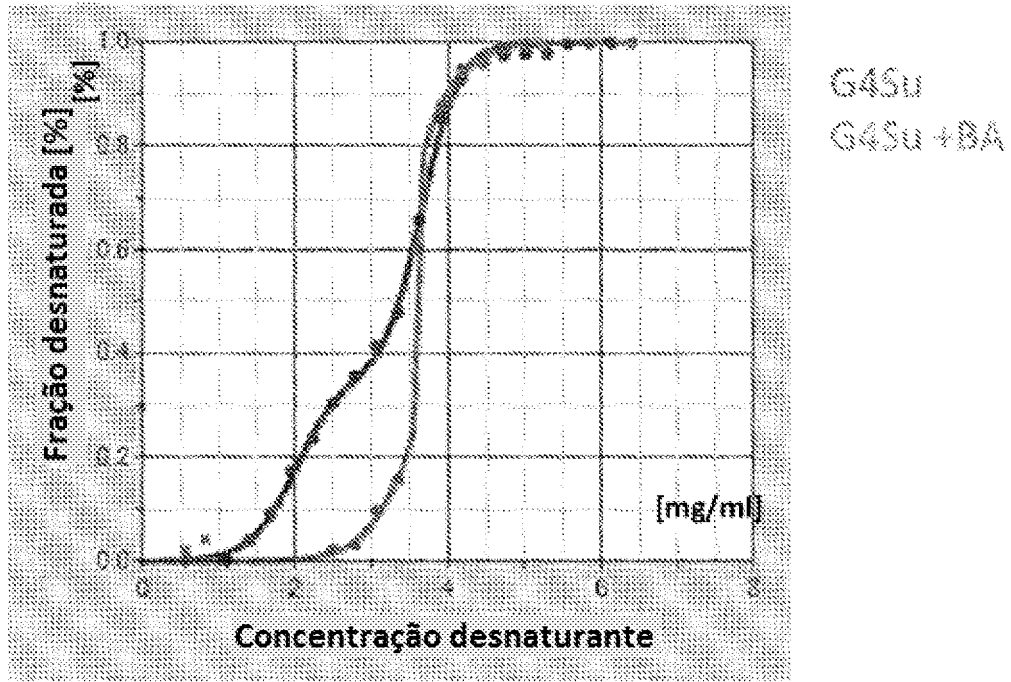


Figura 4

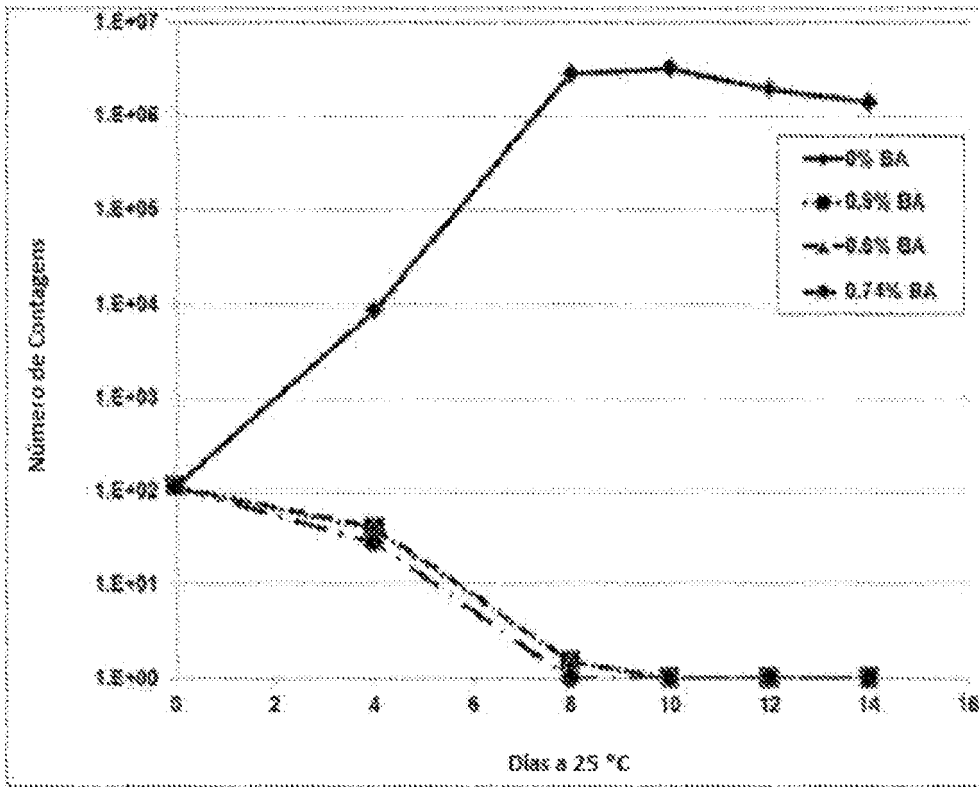


Figura 5A

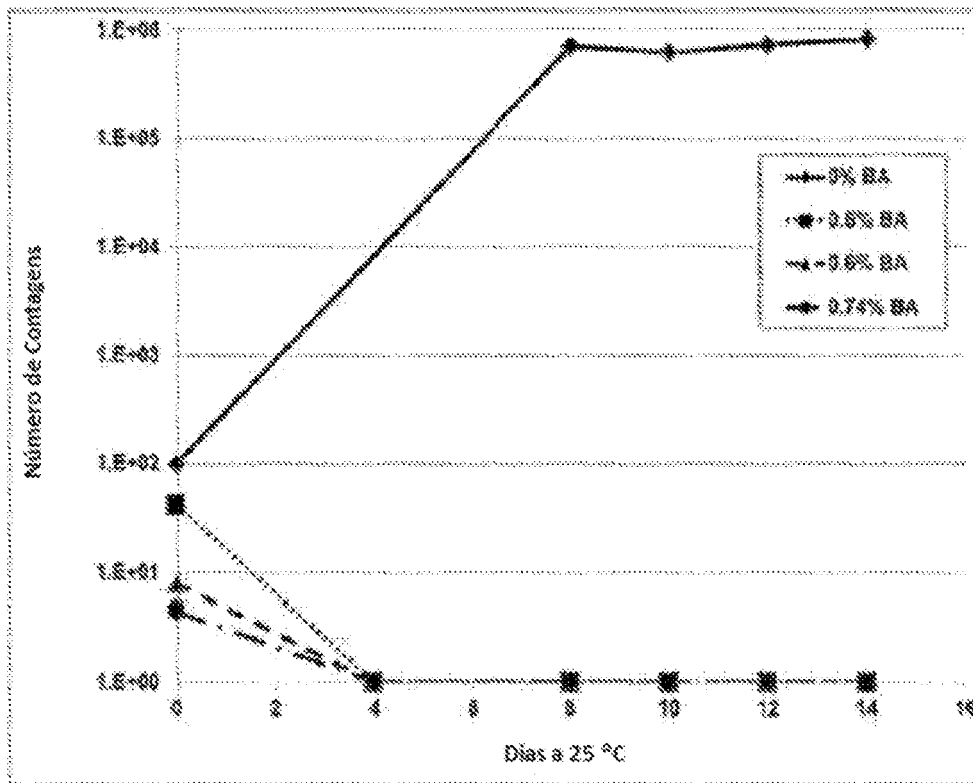


Figura 5B

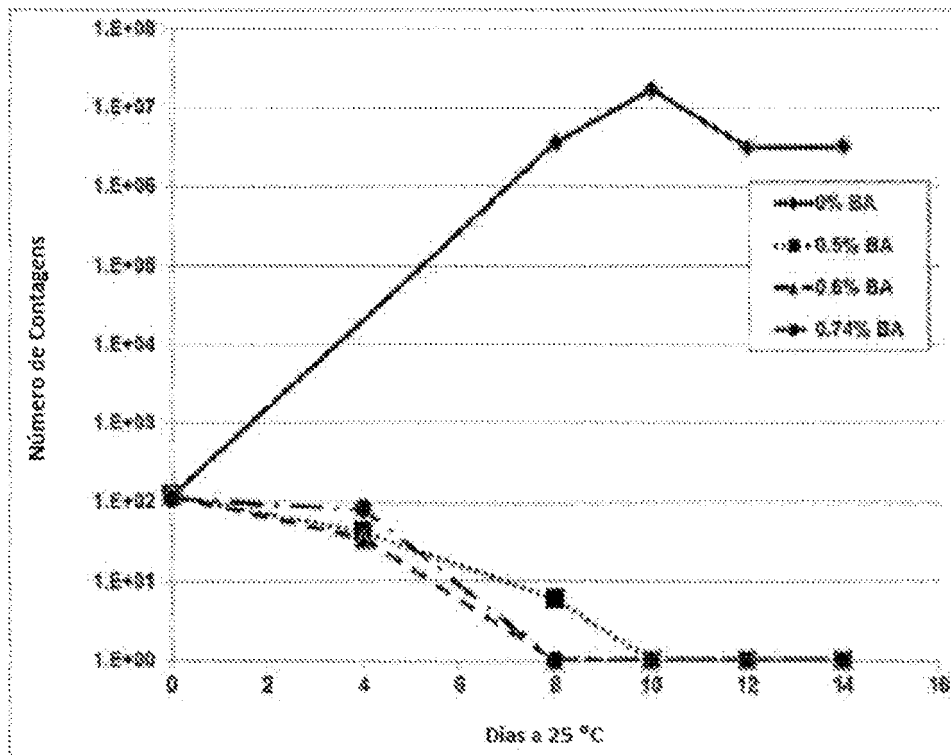


Figura 5C

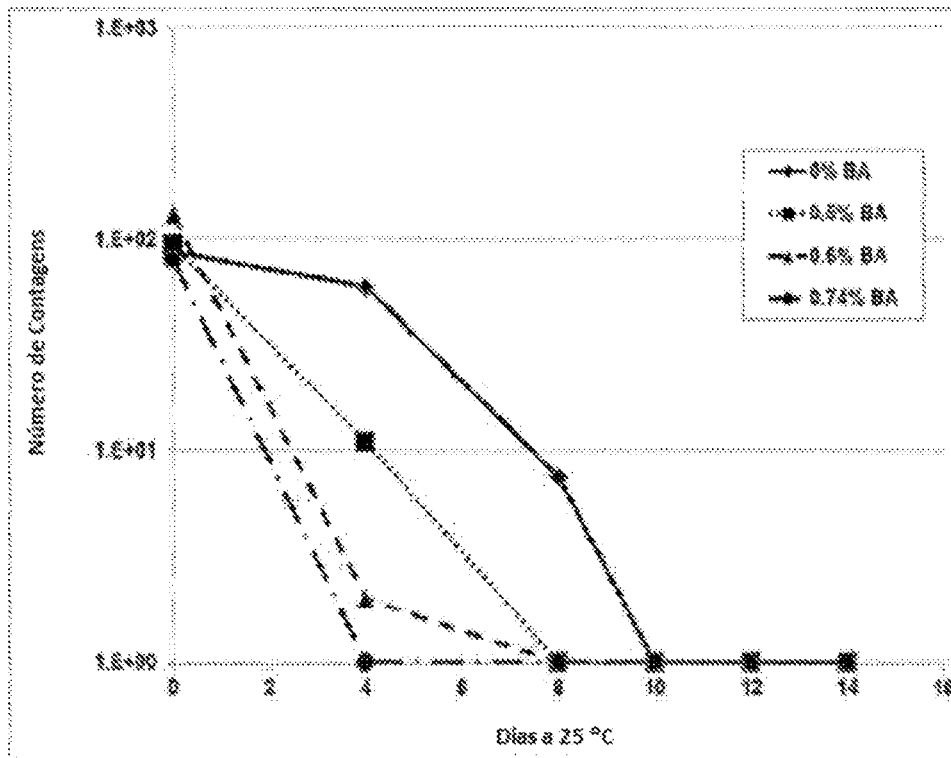


Figura 5D

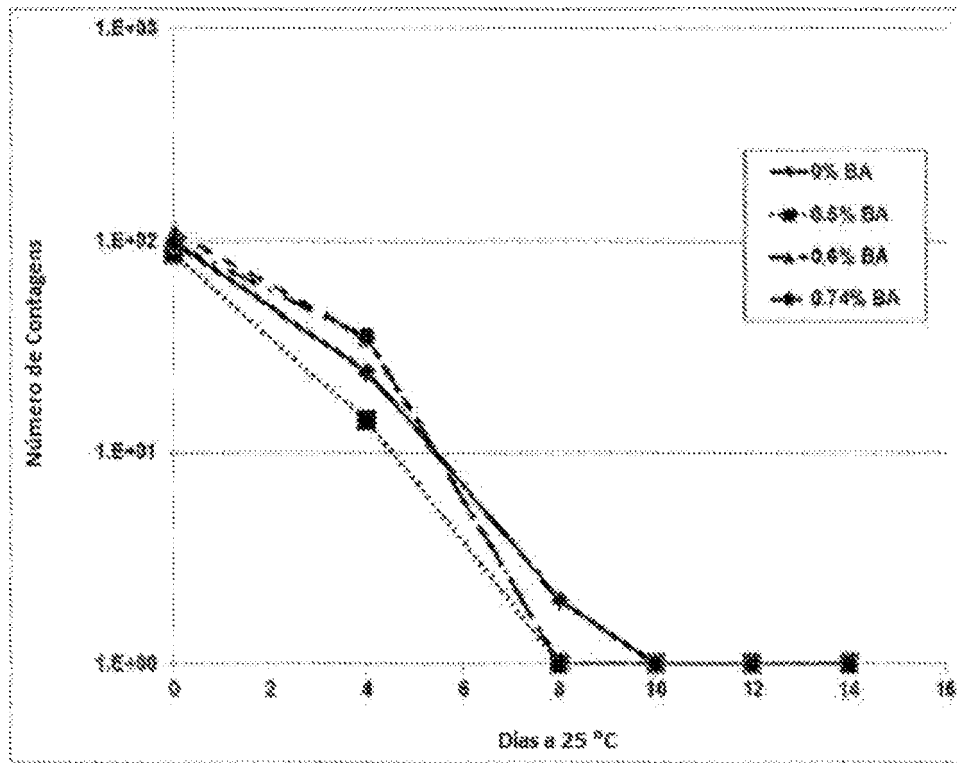


Figura 5E

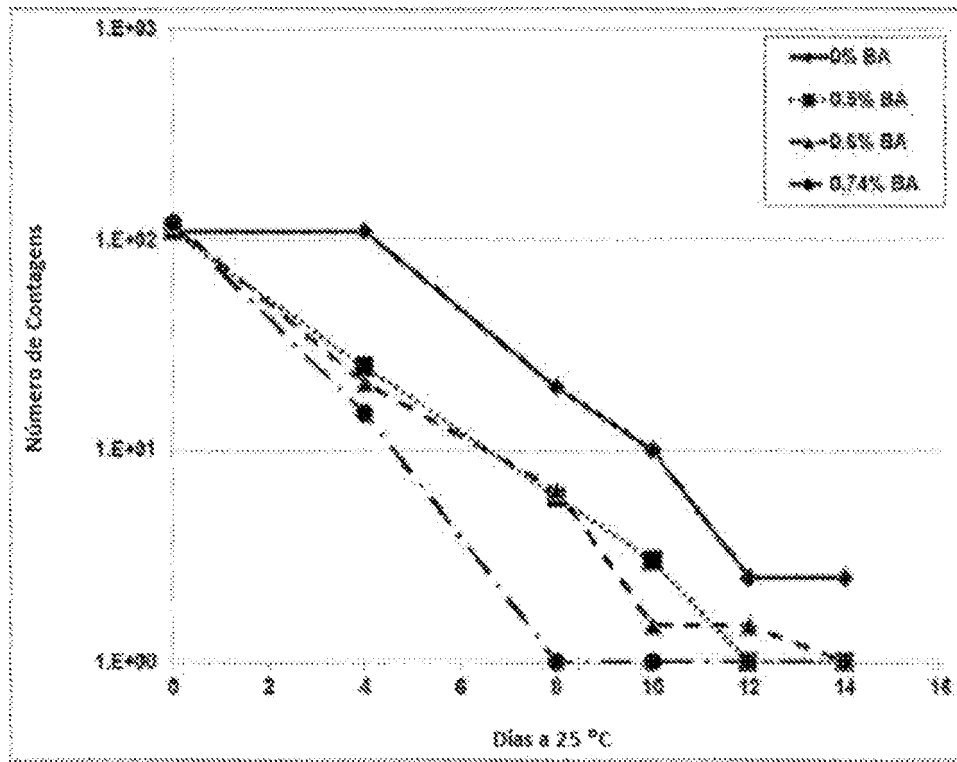


Figura 5F

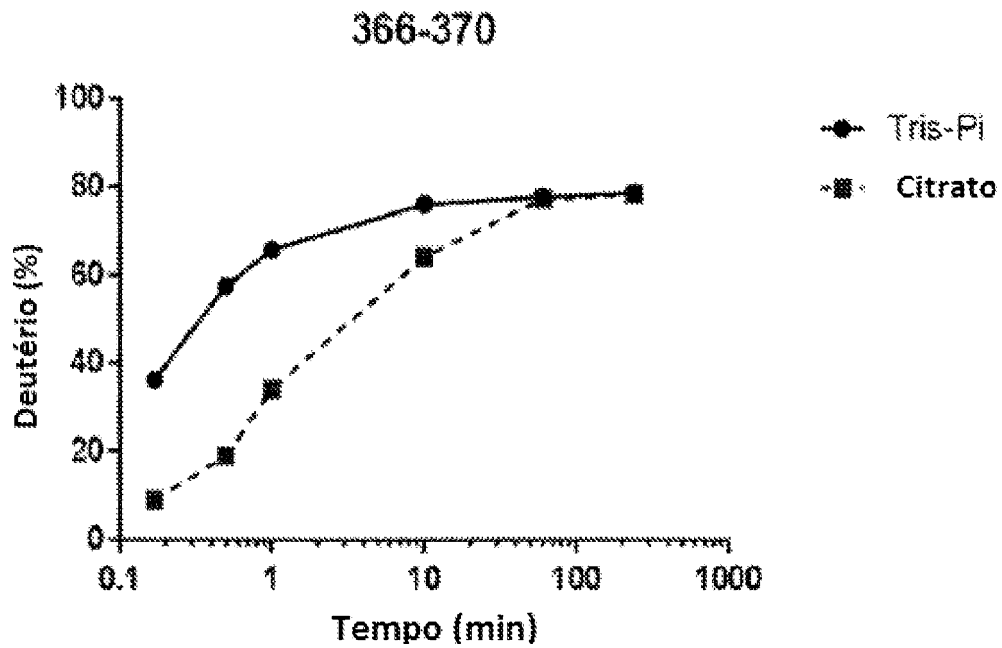


Figura 6A

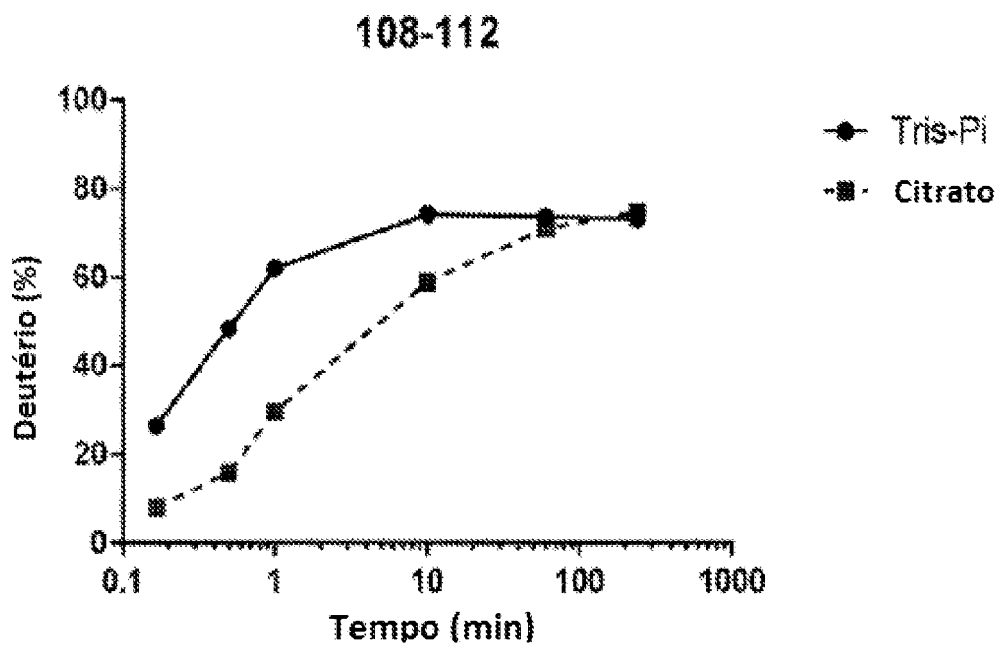


Figura 6B

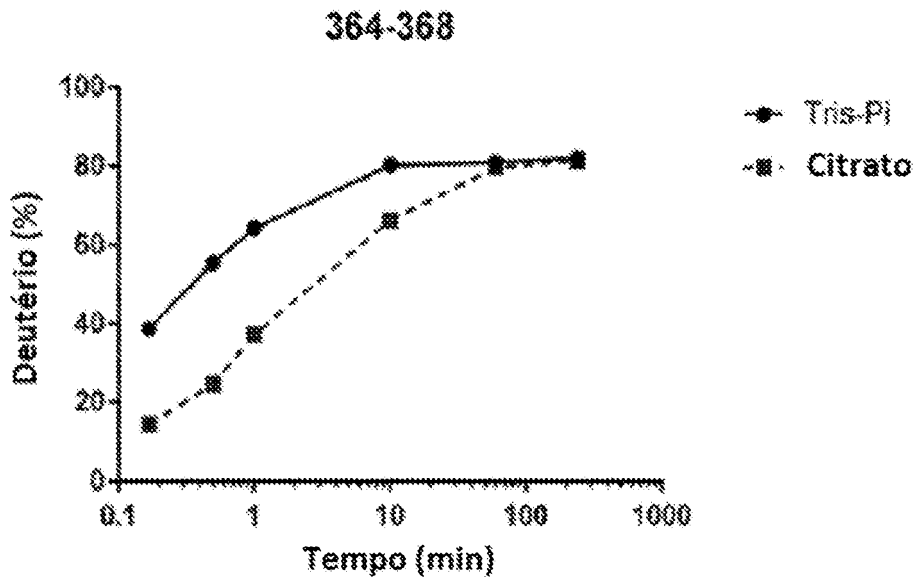


Figura 6C

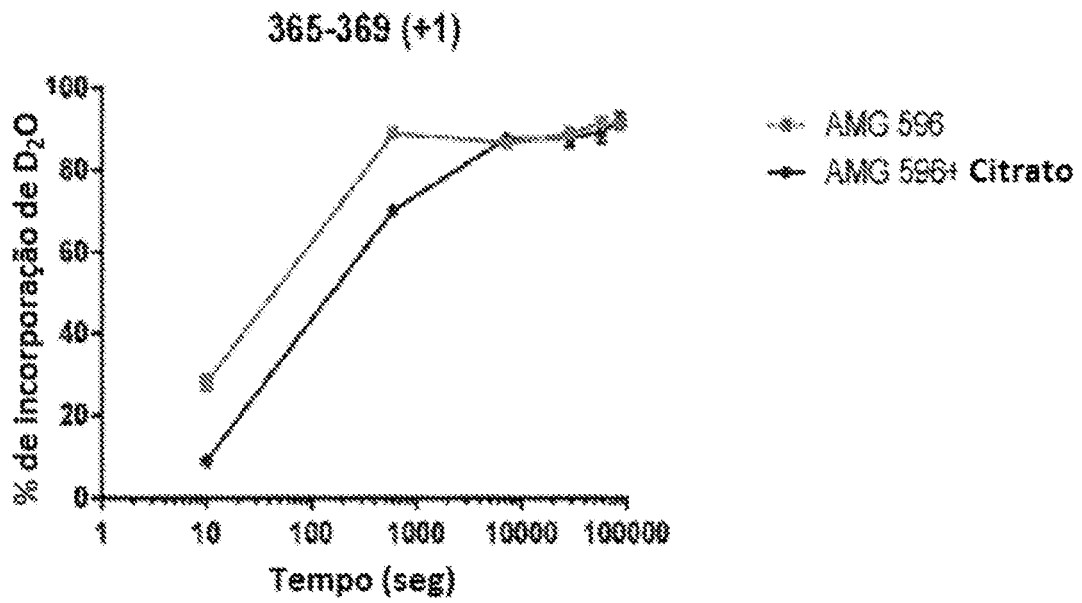


Figura 6D

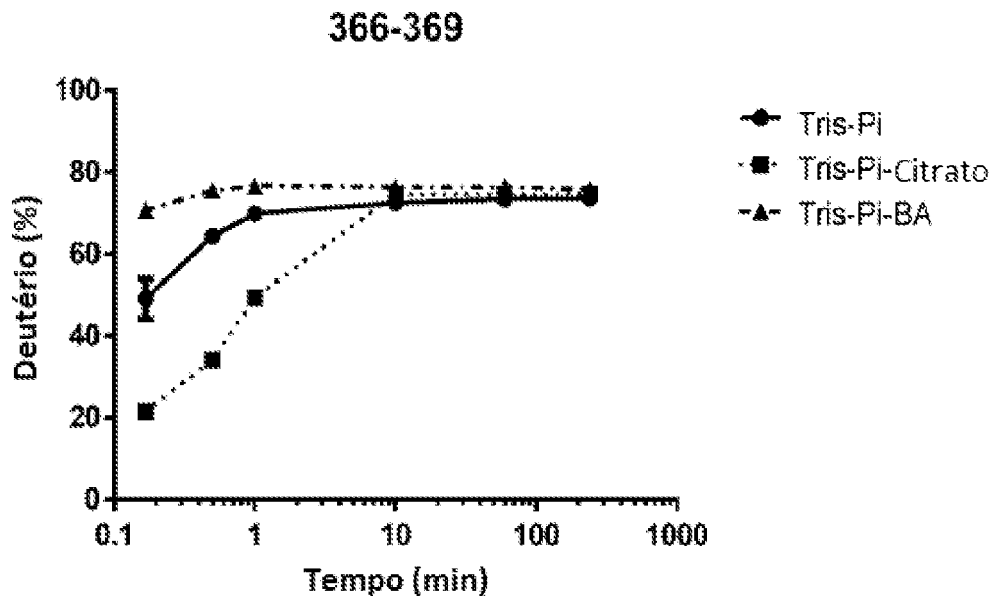


Figura 6E

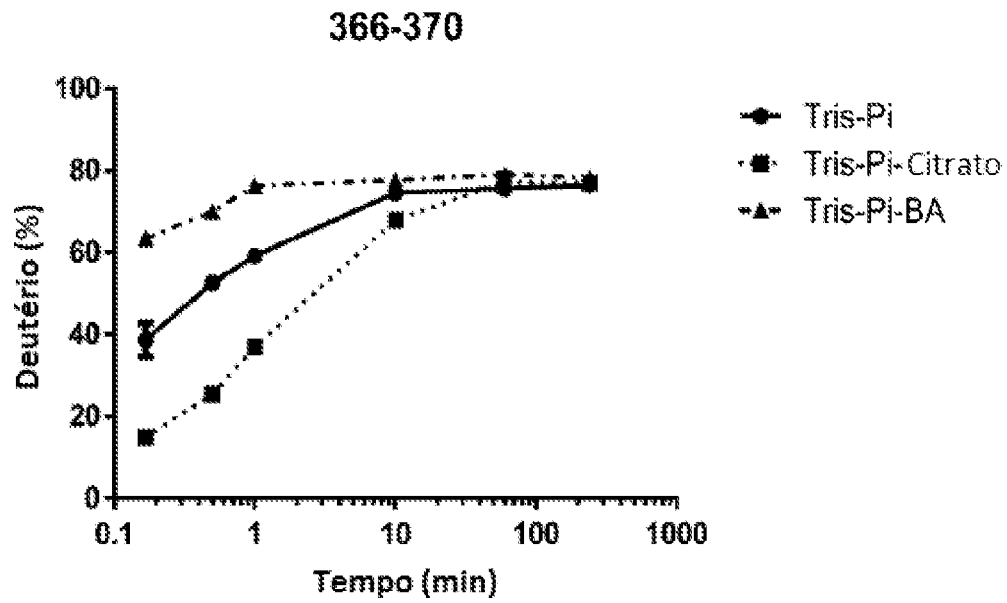


Figura 6F

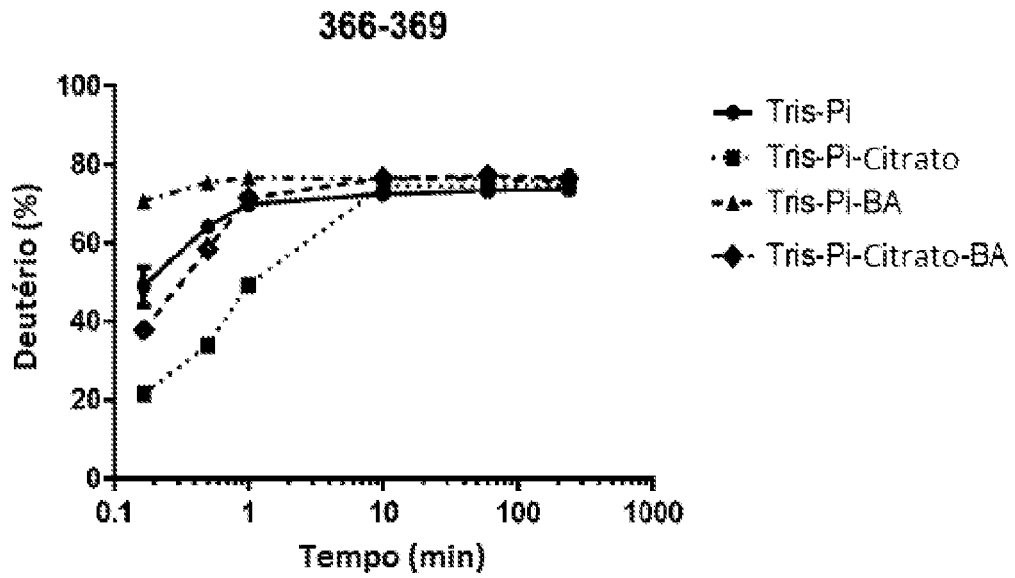


Figura 6G

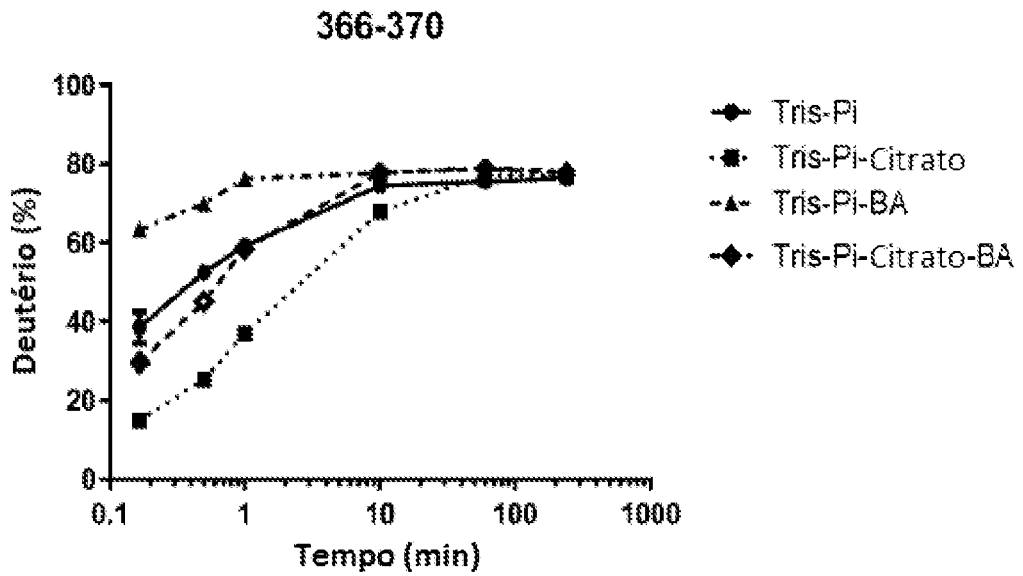


Figura 6H

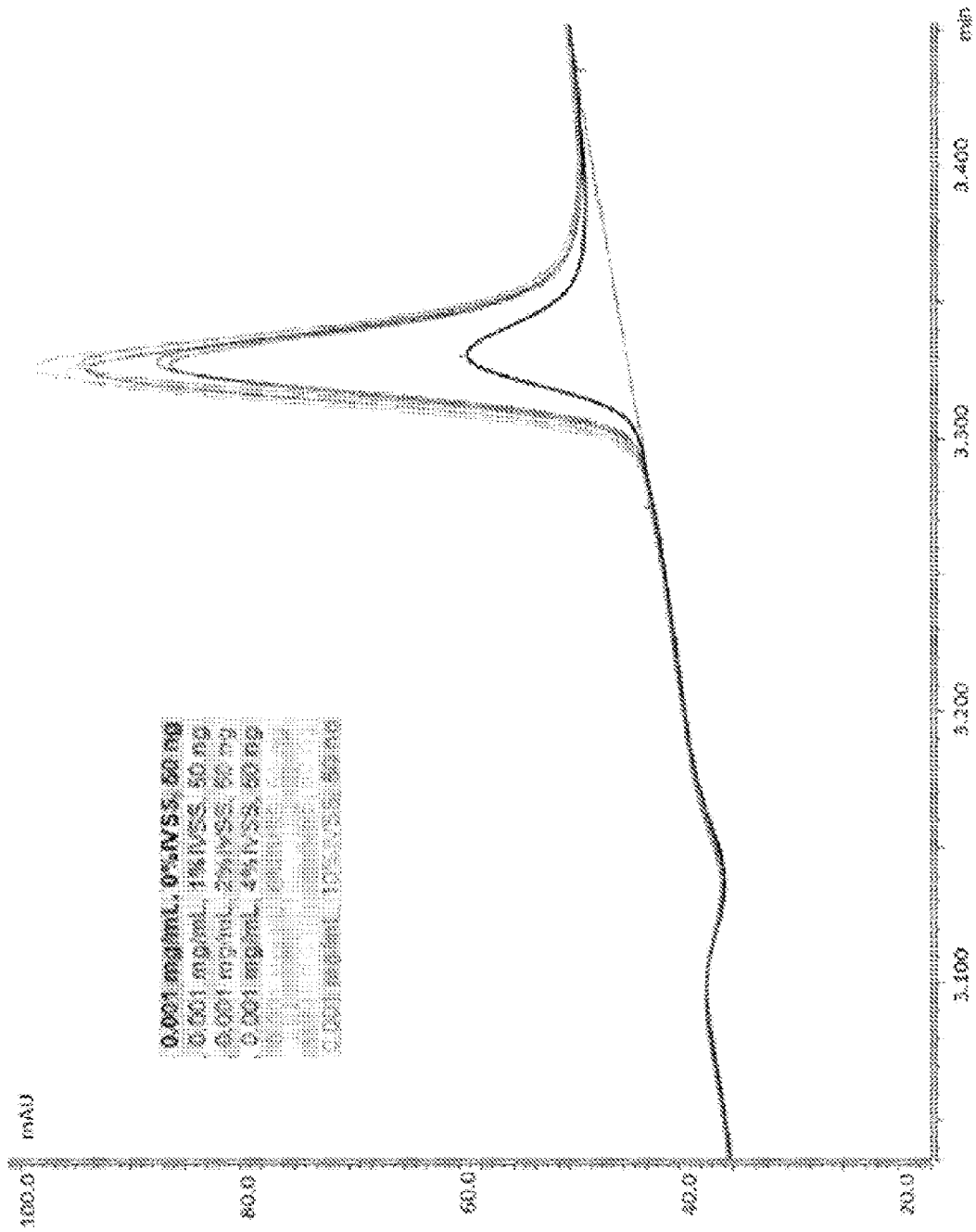


Figura 7

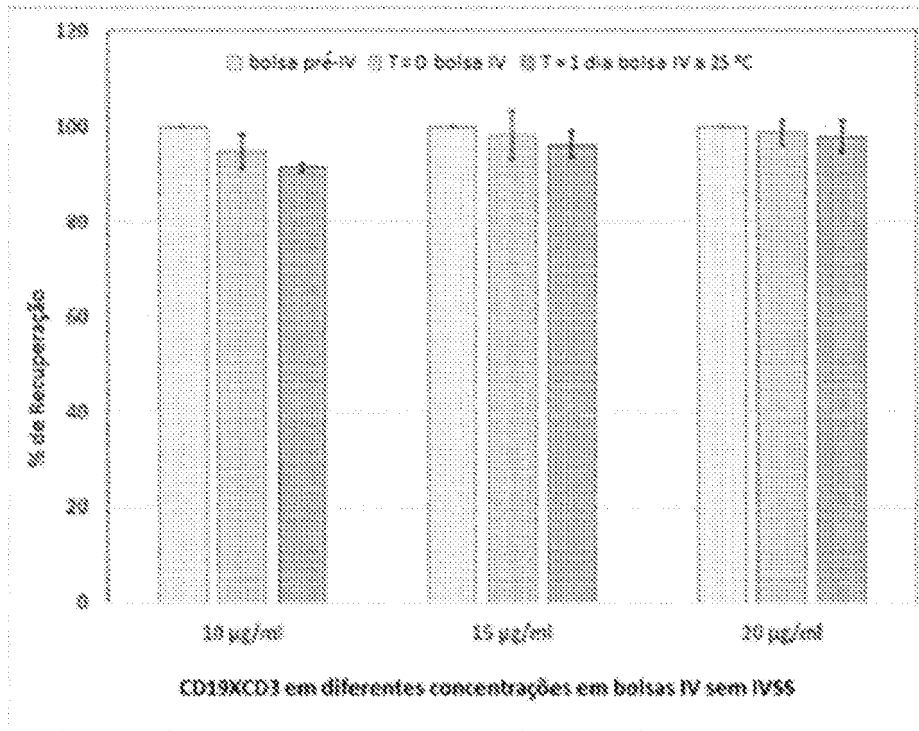


Figura 8A

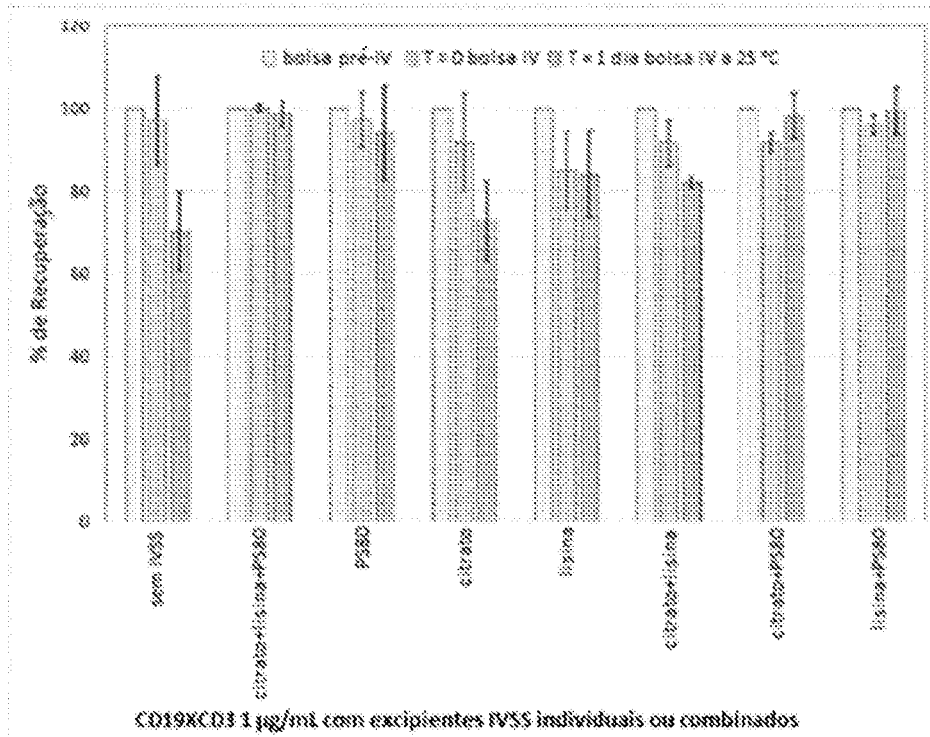


Figura 8B

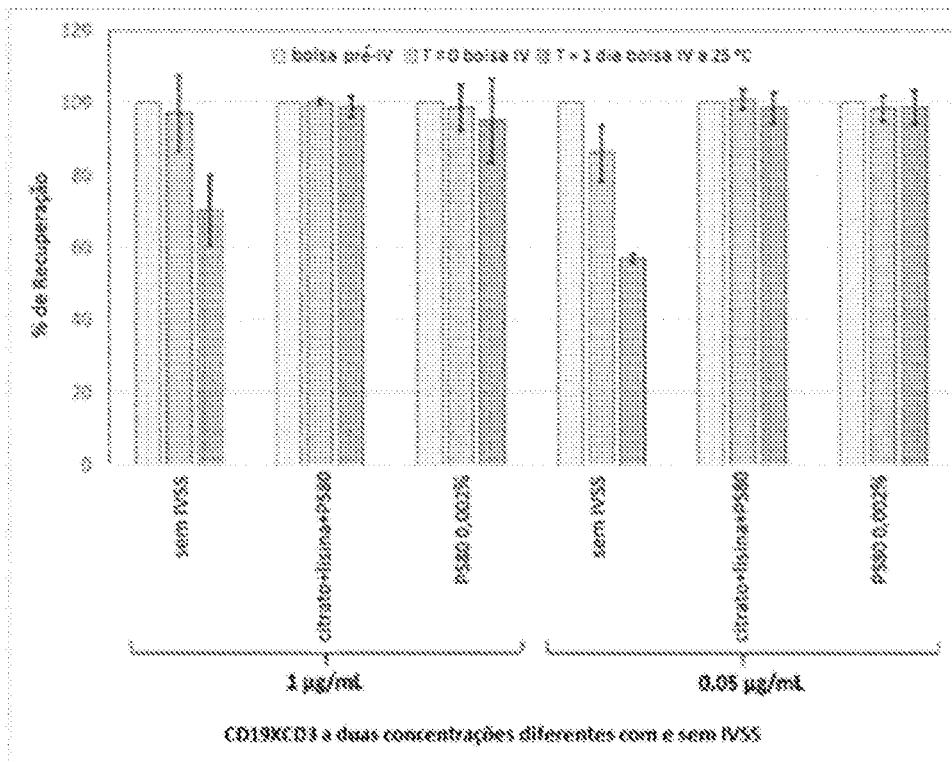


Figura 8C

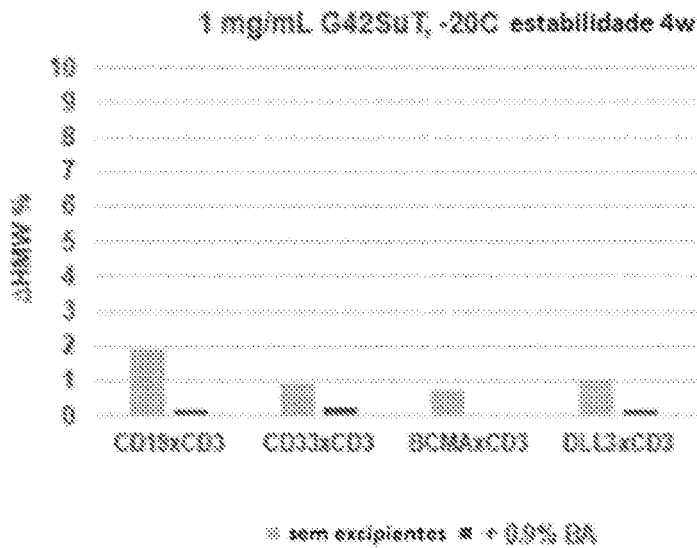


Figura 9

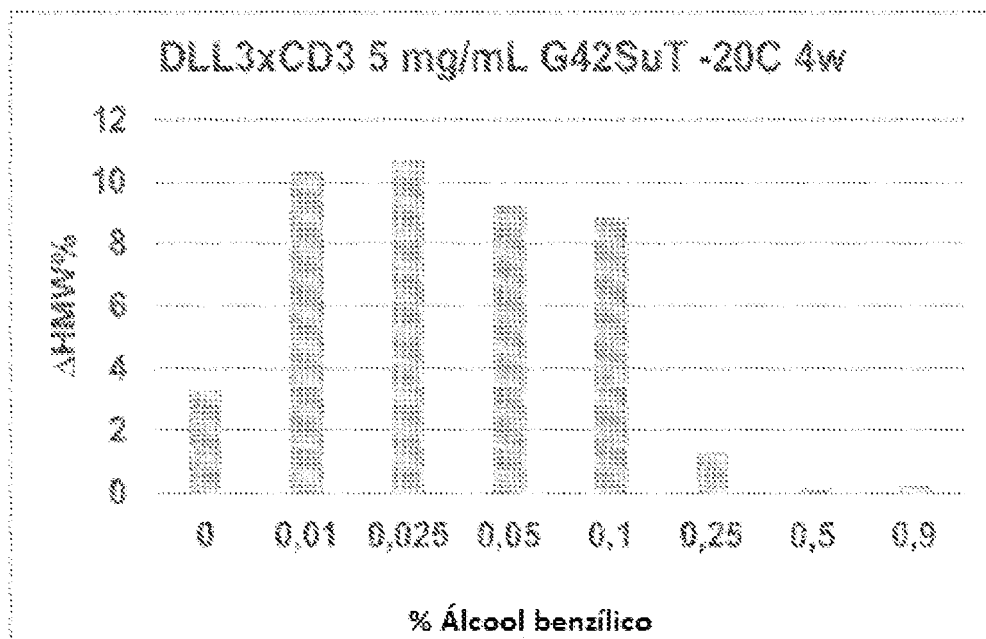


Figura 10

RESUMO

**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO CONSTRUTOS DE
ANTICORPOS BIESPECÍFICOS PARA ARMAZENAMENTO E ADMINISTRAÇÃO
MELHORADOS**

A presente invenção fornece uma composição farmacêutica melhorada para armazenamento e administração compreendendo (a) um construto de anticorpo biespecífico compreendendo um primeiro domínio de ligação a um antígeno da superfície da célula alvo e um segundo domínio de ligação a um segundo antígeno, em que o construto de anticorpo biespecífico está presente a uma concentração na gama de cerca de 0,5 µg/mL a 20 mg/mL, (b) um conservante a uma concentração eficaz para inibir o crescimento de micróbios e (c) um diluente em que o construto de anticorpo biespecífico é estável e recuperável.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201901430 WO-PCT-Brazilian-Sequences.txt
- Data de Geração do Código: 30/10/2019
- Hora de Geração do Código: 15:17:02
- Código de Controle:
 - Campo 1: 504BCD3584FF275A
 - Campo 2: D3CBBF2BAA098592