



MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3411402 (13) T2

(51) Int. Cl.:C07K 16/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 1178 (22) Data de depozit: 2017.02.02 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european:17703376.8, 2017.02.02 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3411402, 2018.12.12 (31) Numărul cererii prioritare: 201662290831 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.02.03 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2022, 2022.05.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 51/2021, 2021.12.22 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2019, 2019.01.31
(71) Solicitanți: AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH, DE; AMGEN INC., US (72) Inventatori: RAUM Tobias, DE; MUENZ Markus, DE; BROZY Johannes, DE; KUFR Peter, DE; HOFFMANN Patrick, DE; FRIEDRICH Matthias, DE; RATTEL Benno, DE; BOGNER Pamela, DE; WOLF Andreas, DE; POMPE Cornelius, DE (73) Titulari: AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH, DE; AMGEN INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Constructe de anticorpi bispecfici BCMA și CD3 de angajare a celulei T

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție oferă construcții de anticorpi bispecfici cu o modalitate Fc specifică, caracterizate prin faptul că cuprind un prim domeniu care se leagă de BCMA, un al doilea domeniu care se leagă de un epitop extracelular al lanțului CD3ε uman și/sau al lanțului CD3ε de Macaca și un al treilea domeniu, care este modalitatea Fc specifică. Mai mult, invenția oferă o polinucleotidă, care

2

codifică construcția de anticorpi, un vector care cuprinde această polinucleotidă, celule gazdă, care exprimă construcția și o compoziție farmaceutică care o cuprinde.

Secvențe: 129

Revendicări: 19

Figuri: 9

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

(54) BCMA and CD3 bispecific T cell engaging antibody constructs**(57) Abstract:**

1
The present invention provides bispecific antibody constructs of a specific Fc modality characterized by comprising a first domain binding to BCMA, a second domain binding to an extracellular epitope of the human and/or the Macaca CD3? chain and a third domain, which is the specific Fc modality. Moreover, the invention provides a

2
polynucleotide, encoding the antibody construct, a vector comprising this polynucleotide, host cells, expressing the construct and a pharmaceutical composition comprising the same.

Sequences: 129

Claims: 19

Fig.: 9

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****STADIUL TEHNICII**

Molecule derivate de anticorpi bispecfici, cum ar fi, constructe de anticorpi BiTE® (de angajare a celulelor T bispecifice) sunt constructe de proteine recombinante realizate din două domenii de legare derivate din anticorpi legate flexibil. Un domeniu de legare al constructelor de anticorpi BiTE® este specific pentru un antigen de suprafață asociat tumorii selectat pe celulele țintă; al doilea domeniu de legare este specific pentru CD3, o subunitate a complexului receptor al celulelor T de pe celulele T. Prin designul lor particular, constructele de anticorpi BiTE® sunt adecvate în mod unic pentru a conecta tranzitoriu celulele T cu celulele țintă și, în același timp, pentru a activa puternic potențialul citolitic inherent al celulelor T împotriva celulelor țintă. O dezvoltare importantă în continuare a primei generații de constructe de anticorpi BiTE® (vezi WO 99/54440 și WO 2005/040220) dezvoltată în clinică ca AMG 103 și AMG 110 a fost furnizarea de constructe de anticorpi bispecfici care se leagă la un epitop independent de context la capătul N-terminal al lanțului CD3ε (WO 2008/119567). Constructele de anticorpi BiTE® care se leagă de acest epitop selectat nu prezintă doar specificitate între specii încrucișate pentru om și lanțul CD3ε *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* sau *Saimiri sciureus*, dar, de asemenea, datorită recunoașterii acestui epitop specific (în loc de epitopii descriși anterior ai lanțurilor CD3 în moleculele bispecifice care angajează celulele T), nu activează nespecific celulele T în același grad ca cel observat pentru generația anterioară de anticorpi de angajare a celulelor T. Această reducere a activării celulelor T a fost corelată cu o redistribuire mai mică, sau redusă a celulelor T la pacienți, aceasta din urmă fiind identificată ca un risc pentru efecte secundare.

Constructele de anticorpi așa cum s-a descris în WO 2008/119567 sunt susceptibile să sufere de eliminare rapidă din organism; astfel, deși sunt capabile să ajungă rapid în majoritatea părților corpului și sunt rapid de produs și mai ușor de manipulat, aplicațiile lor in vivo pot fi limitate de persistența lor scurtă in vivo. Administrarea prelungită prin perfuzie intravenoasă continuă a fost utilizată pentru a obține efecte terapeutice datorită timpului scurt de înjumătățire in vivo al acestei molecule mici, cu un singur lanț. Cu toate acestea, astfel de perfuzii intravenoase continue sunt clasificate ca incomode pentru pacienți și, astfel, în cazul unor abordări alternative de tratament mai convenabile, împiedică alegerea compusului dovedit a fi mai eficient în tratamentul bolii respective. Prin urmare, există o nevoie în domeniu de terapii bispecifice care să păstreze o eficacitate terapeutică similară, care să aibă un format care este ușor de produs și care să aibă proprietăți farmacocinetice favorabile, inclusiv un timp de înjumătățire mai lung.

Un timp de înjumătățire crescut este în general util în aplicațiile in vivo ale imunoglobulinelor, în special anticorpi și mai ales fragmente de anticorpi de dimensiuni mici. Abordările descrise în domeniu pentru a obține un astfel de efect cuprind fuziunea constructului de anticorp bispecific mic cu proteine mai mari, care de preferință nu interferează cu efectul terapeutic al BiTE®. Exemplele pentru astfel de dezvoltări ulterioare de angajatori ai celulelor T bispecifice cuprind molecule Fc bispecifice, de ex., descrise în US 2014/0302037, US 2014/0308285, WO 2014/144722, WO 2014/151910 și WO 2015/048272. O strategie alternativă este utilizarea HSA fuzionată cu molecula bispecifică sau simpla fuziune a peptidelor de legare a albuminei umane (vezi de ex., WO2013/128027, WO2014/140358).

BCMA (antigen de maturare a celulelor B, TNFRSF17, CD269) este o proteină transmembranară care aparține super-familiei receptorilor TNF. Acesta este stabilit a fi un marker al celulelor B care este esențial pentru dezvoltarea și homeostazia celulelor B (Schliemann ș.a., (2001) Science 293 (5537):2111-2114) datorită interacțiunii sale probabil esențială cu liganzii săi BAFF (factor de activare a celulelor B, denumit și TALL-1 sau TNFSF13B) și APRIL (ligand de inducere a proliferării A).

Expresia BCMA este limitată la linia celulelor B și este prezentă în principal pe celulele plasmatică și plasmablaste și într-o oarecare măsură pe celulele B de memorie, dar practic absentă pe celulele B periferice și naive. BCMA este, de asemenea, exprimat pe celulele de mielom multiplu (MM) și este implicat în leucemie și limfoame. Împreună cu membrii familiei TACI (activator transmembranar și interactor al ligandului ciclofilinei) și BAFF-R (receptorul factorului de activare a celulelor B, cunoscut și sub numele de superfamilie a receptorului factorului de necroză tumorală 13C), BCMA reglează diferite aspecte ale imunității umorale, dezvoltării și homeostaziei celulelor B. Exprimarea BCMA apare destul de târziu în diferențierea celulelor B și contribuie la supraviețuirea pe termen lung a plasmablastelor și a celulelor plasmatică din măduva osoasă. Ștergerea țintită a genei BCMA la șoareci are ca rezultat reducerea semnificativă a numărului de celule plasmatică cu viață lungă în măduva osoasă, indicând importanța BCMA pentru supraviețuirea lor.

În conformitate cu această descoperire, BCMA sprijină, de asemenea, creșterea și supraviețuirea celulelor de mielom multiplu (MM). Novak ș.a., au descoperit că liniile celulare MM și celulele MM

proaspăt izolate exprimă proteine BCMA și TACI pe suprafața lor celulară și au expresie variabilă a proteinei BAFF-R pe suprafața lor celulară (Novak ș.a., (2004) Blood 103(2):689-694).

Mielomul multiplu (MM) este a doua cea mai frecventă malignitate hematologică și reprezintă 2% din toate decesele cauzate de cancer. MM este o boală eterogenă și cauzată în principal de translocatii ale cromozomilor, printre altele t(11; 14), t(4; 14), t(8;14), del(13) și del(17). Pacienții afectați de MM pot prezenta o varietate de simptome legate de boală din cauza infiltrației măduvei osoase, distrugerii osoase, insuficienței renale, imunodeficienței și poverii psihosociale a unui diagnostic de cancer.

Mielomul este o boală incurabilă care urmează de obicei un curs recidivant, cu mulți pacienți (pts) care necesită mai multe linii de terapie. Rezultatele în RRMM rămân slabe, în special după eșecul tratamentului pe bază de inhibitori de proteazom (PI) și/sau medicamente imunomodulatoare (IMiD).

MM este încă o boală greu de tratat și rămâne incurabilă. Aceasta urmează de obicei un curs recidivant, cu mulți pacienți care necesită mai multe linii de terapie. Terapii precum chimioterapia și abordările de transplant de celule stem devin disponibile și au rate de supraviețuire îmbunătățite, dar adesea aduc efecte secundare nedorite. Până în prezent, cele două opțiuni de tratament cel mai frecvent utilizate pentru pacienții cu mielom multiplu sunt combinațiile de steroizi, talidomidă, lenalidomidă, bortezomib sau diverși agenți citotoxici, iar pentru pacienții mai tineri conceptele de chimioterapie cu doze mari cu transplant de celule stem autoloage.

Majoritatea transplanturilor sunt de tip autolog, adică utilizează celulele proprii ale pacienților. Astfel de transplanturi, deși nu sunt curative, s-a dovedit că prelungesc viața la pacienți selectați. Ele pot fi efectuate ca terapie inițială la pacienții nou diagnosticați, sau în momentul recăderii. Uneori, la pacienții selectați, se poate recomanda mai mult de un transplant pentru a controla în mod adecvat boala. Transplantul de celule stem poate să nu fie o opțiune pentru mulți pacienți din cauza vârstei înaintate, a prezenței altor boli grave sau a altor limitări fizice. Chimioterapia controlează doar parțial mielomul multiplu, rareori duce la remisie completă. Rezultatele în MM refractar recidivat rămân slabe, în special după eșecul tratamentului pe bază de medicamente cu inhibitori de proteazom (PI) și/sau imunomodulator. Astfel, este nevoie urgentă de tratamente noi, inovatoare.

Bellucci ș.a., (Blood. 2005 mai 15;105(10)) au identificat anticorpi specifici BCMA la pacienții cu mielom multiplu după ce au primit perfuzii de limfocite donatoare. Serul acestor pacienți a fost capabil să medieze liza celulară specifică BCMA prin ADCC și CDC și a fost detectat numai la pacienții cu răspunsuri antitumorale (4/9), dar nu și la pacienții care nu răspund (0/6). Autorii speculează că inducerea anticorpilor specifici BCMA contribuie la eliminarea celulelor mielomului și la remisiunea pe termen lung a pacienților. Ryan ș.a. (Mol Cancer Ther. 2007 Nov; 6(11):3009-18) au raportat generarea unui anticorp specific BCMA antagonist care previne activarea NF-κB care este asociată cu o cale puternică de semnalizare pro-supraviețuire în celulele B normale și maligne. WO 2013/072406 dezvăluie molecule de legare care sunt cel puțin bispecifice care cuprind un prim și un al doilea domeniu de legare, în care primul domeniu de legare este capabil să se lege la clusterul epitop 3 al BCMA, iar al doilea domeniu de legare este capabil să se lege la complexul receptor CD3 al celulelor T. WO 2014/122143 este direcționat către anticorpii monoclonali care se leagă în mod specific la BCMA. Documentul învață, de asemenea, că un anticorp poate fi bispecific cu sau fără un Fc și se poate lega la BCMA și CD3.

În ciuda faptului că BCMA; BAFF-R și TACI, adică receptorii de celule B care aparțin superfamiliei receptorilor TNF și liganzii lor BAFF și APRIL fac obiectul unor terapii în lupta împotriva cancerului și/sau a tulburărilor autoimune, mai este nevoie de opțiuni suplimentare disponibile pentru tratamentul unor astfel de afecțiuni medicale. O astfel de abordare este un angajator de celule T derivate din anticorp bispecific.

REZUMAT

Toate formatele de extindere a timpului de înjumătățire (formate HLE) ale moleculelor bispecifice care implică celulele T descrise în domeniu, care au inclus formatul hetero Fc (denumit și Fc heterodimeric, hetFc sau hFc) și fuziunea albuminei serice umane (denumită și HAS, sau hALB), au avut dezavantaje individuale, cum ar fi, activarea nespecifică a celulelor T, activarea complementului, instabilitatea sau un profil farmacocinetic care nu îndeplinește prelungirea dorită a timpului de înjumătățire a moleculelor. Prin urmare, obiectul prezentei invenții este de a oferi un format de extindere a timpului de înjumătățire al moleculelor de angajare a celulelor T bispecifice BCMAxCD3, care depășește cel puțin unul și, desigur, de preferință, mai multe dintre aceste defecte individuale observate pentru moleculele din stadiul tehnicii. În consecință, prezenta invenție furnizează constructe de anticorpi ale unei modalități Fc specifice, caracterizate prin aceea că cuprind un prim domeniu care se leagă la BCMA, un al doilea domeniu care se leagă la un epitop extracelular al omului și/sau lanț *Macaca* CD3ε și un al treilea domeniu, care este modalitatea Fc specifică, așa cum este definită în revendicări. Mai mult, invenția furnizează o polinucleotidă care codifică constructul de anticorp, un vector care cuprinde această polinucleotidă, celule gazdă care exprimă constructul și o compoziție farmaceutică care îl conține așa cum este definită în revendicări.

DESCRIEREA FIGURILOR

Figura 1: FIG. 1a prezintă o diagramă a unui exemplu de realizare a unui construct de anticorp conform invenției. Fig. 1b prezintă un construct de anticorp Fc heterodimeric și Fig. 1c prezintă un construct de corp X descris în domeniu. Perechile încărcate indicate sunt introduse pentru a impune heterodimerizarea. Fig. 1d prezintă fuziunea unui construct de anticorp cu o albumină serică umană (HSA/hALB).

Figura 2: Evaluarea constructelor de anticorpi de activare a celulelor T independente de țintă prin ținta A HLE BiTE®. 2(a) construct de anticorp conform invenției într-un test de activare de 48 h cu PBMC uman (3x); diluții în serie HLE BiTE® (start 20 nM; 1:5, 7x+martor); fără, sau cu blocarea FcR [10 mg/mL hulG (Kiovog, Baxter)]; Măsurarea FACS a expresiei CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celule T CD4⁺, CD8⁺. 2(b) Constructe de anticorpi hetero-Fc în testul de activare de 48 h cu PBMC uman și celulă PBMC epuizată de CD14⁺/CD33⁺ (3x); diluții în serie HLE BiTE® (start 20 nM; 1:5, 7x+martor); Măsurarea FACS a expresiei CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T CD4⁺, CD8⁺.

Figura 3: Evaluarea activării celulelor T independente de țintă prin constructe de anticorp HLE BiTE®. 3(a) Constructul de anticorp țintă B conform invenției într-un test de activare de 48 h cu PBMC uman (3x); HLE BiTE® diluții în serie (start 20 nM; 1:5, 7x+martor); fără sau cu blocarea FcR [10 mg/mL hulG (Kiovog, Baxter)]; Măsurarea FACS a expresiei CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T CD4⁺, CD8⁺. 3(b) Constructul de anticorp hetero-Fc țintă B într-un test de activare de 48 h cu PBMC uman și celulă PBMC epuizată de CD14⁺/CD33⁺ (3x); HLE BiTE® diluții în serie (start 20 nM; 1:5, 7x+martor); Măsurarea FACS a expresiei CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T CD4⁺, CD8⁺. 3(c) Construcția de corp X țintă B într-un test de activare de 48 h cu PBMC uman și celulă PBMC epuizată de CD14⁺/CD33⁺ (3x); HLE BiTE® diluții în serie (start 20 nM; 1:5, 7x+martor); Măsurarea FACS a expresiei CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T CD4⁺, CD8⁺. 3(d) - 3(f) PBMC izolate de la trei donatori umani sănătoși diferiți au fost cultivate cu concentrații crescânde de constructe de anticorpi bispecfici HLE specifi pentru ținta B timp de 48 h. Expresia markerului de activare CD69 pe celulele T CD4⁺ și CD8⁺ a fost determinată prin analiza citometrică în flux utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

Figura 4: Complement C1q Legarea a constructelor de anticorpi de fuziune BiTE® Fc. Constructele de anticorpi de fuziune BiTE® Fc (BiTE® un singur lanț Fc (triunghi), BiTE® hetero Fc (pătrate), BiTE® canonic (cerc)) au fost acoperite pe o placă Maxisorp (în serie de diluții), înainte de incubare cu ser uman reunit și incubare cu anticorp murin policlonal anti-uman CC1q, vizualizat prin conjugatul Fc-AP de capră anti-șoarece.

Figura 5: Profiluri PK medii ale a două BCMA diferite care țintesc constructele de anticorpi BiTE® după administrarea unei doze unice la maimuțele cynomolgus. Din motive de comparabilitate, concentrațiile serice au fost normalizate în funcție de doză la 15 μg/kg și indicate în nmol.

Figura 6: Profiluri PK medii a nouă constructe de anticorpi BiTE diferite®, fiecare fuzionat la un fragment de extindere a timpului de înjumătățire scFc. Din motive de comparabilitate, concentrațiile serice au fost normalizate în funcție de doză la 15 μg/kg și indicate în nmol.

Figura 7: Variante scFc bispecifice D9F (SECV ID NR: 105), T2G (SECV ID NR: 106), D3L (SECV ID NR: 107), T7I (SECV ID NR: 108) și K6C (SECV ID NR: 109). Un al treilea domeniu preferat al unui construct de anticorp al prezentei invenții este al treilea domeniu cuprins de SECV ID NR: 105.

Figura 8: Determinarea pe bază de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR) a legării la FcRn uman. Constructele D9F, T2G, D3L, T7I și K6C au fost testate, fiecare, pentru capacitatea lor de a se lega de FcRn uman în experimentele SPR (Biacore). Legarea maximă în timpul fazei de injecție a fost măsurată pentru toate constructele ca unități de răspuns respective (RU), echivalentă cu creșterea masei moleculare pe cipul CM5 acoperit cu FcRn datorită constructului legat. Toate constructele au fost măsurate în duplicat. Valorile medii ale determinărilor duplicate sunt prezentate în Figura 8A și 8B.

Figura 9: Constructele D9F, T2G, D3L, T7I și K6C și un anticorp uman IgG1-kappa MT201 au fost testate, fiecare, pentru capacitatea lor de a se lega de FcRn uman în experimentele SPR (Biacore). Legarea maximă în timpul fazei de injecție a fost măsurată pentru toate constructele ca unități de răspuns respective (RU), echivalentă cu creșterea masei moleculare pe cipul CM5 acoperit cu FcRn datorită constructului legat. Toate constructele au fost măsurate în duplicat. Valorile medii ale determinărilor duplicate sunt reprezentate, inclusiv barele de eroare ale abaterii standard.

DESCRIERE DETALIATA

În plus față de timpul de înjumătățire semnificativ prelungit al constructelor de anticorpi bispecfici ale invenției, fuziunea modalității specifice Fc este, de asemenea, responsabilă pentru un impact semnificativ surprinzător asupra primului și al doilea domeniu de legare al constructului de anticorpi conform invenției. Astfel, în timp ce alte modalități de extindere a timpului de înjumătățire ale constructelor de anticorpi care implică celulele T prezintă caracteristici individuale preferate, alegerea

modalității specifice Fc prezente permite furnizarea de molecule bispecifice care prezintă de obicei un spectru larg de caracteristici preferate ale unui format molecular robust și, astfel, permit dezvoltarea de compoziții farmaceutice promițătoare.

Astfel, prezenta invenție furnizează un construct de anticorp cu un singur lanț care cuprinde:

- un prim domeniu care se leagă de BCMA,
- un al doilea domeniu care se leagă la un epitop extracelular al omului și/sau al lanțului *Macaca* CD3ε; și
- un al treilea domeniu care cuprinde doi monomeri polipeptidici, fiecare cuprinzând o balama, un domeniu CH2 și un domeniu CH3, în care respectivii doi monomeri polipeptidici sunt fuzionați unul cu altul printr-un linker peptidic.

Termenul "construct de anticorp" se referă la o moleculă în care structura și/sau funcția se bazează pe structura și/sau funcția unui anticorp, *de ex.*, a unei molecule de imunoglobulină de lungime completă sau întreagă și/sau este/sunt extras/e din domeniile variabile ale lanțului greu (VH) și/sau variabile ale lanțului ușor (VL) ale unui anticorp sau fragment al acestuia. Prin urmare, un construct de anticorp este capabil să se lege la ținta sau antigenul său specific. Mai mult, domeniul de legare al unui construct de anticorp conform invenției cuprinde cerințele structurale minime ale unui anticorp care permit legarea țintei. Această cerință minimă poate *de ex.*, să fie definită prin prezența a cel puțin trei CDRs ale lanțului ușor (adică CDR1, CDR2 și CDR3 din regiunea VL) și/sau a trei CDRs ale lanțului greu (adică CDR1, CDR2 și CDR3 din regiunea VH), de preferință toate cele șase CDRs. O abordare alternativă pentru a defini cerințele minime de structură ale unui anticorp este definirea epitopului anticorpului în structura țintei specifice, respectiv, domeniul proteic al proteinei țintă care compune regiunea epitopului (cluster de epitop), sau prin referire la un anticorp specific care concurează cu epitopul anticorpului definit. Anticorpul pe care se bazează constructele conform invenției includ, de exemplu, anticorpi monoclonali, recombinanți, himerici, deimunizați, umanizați și umani.

Domeniul de legare al unui construct de anticorp conform invenției poate, *de ex.*, cuprinde grupurile de CDRs menționate anterior. De preferință, acele CDRs sunt cuprinse în cadrul unei regiuni variabile a lanțului ușor al anticorpului (VL) și a unei regiuni variabile a lanțului greu al anticorpului (VH); cu toate acestea, nu trebuie să le cuprindă pe amândouă. Fragmentele Fd, de exemplu, au două regiuni VH și rețin, adesea, o anumită funcție de legare a antigenului a domeniului intact de legare a antigenului. Exemplele suplimentare pentru formatul fragmentelor de anticorpi, variantelor de anticorpi sau domeniilor de legare includ (1) un fragment Fab, un fragment monovalent având domeniile VL, VH, CL și CH1; (2) un fragment F(ab')₂, un fragment bivalent având două fragmente Fab legate printr-o punte disulfurică în regiunea balama; (3) un fragment Fd având cele două domenii VH și CH1; (4) un fragment Fv având domeniile VL și VH ale unui singur braț al unui anticorp, (5) un fragment dAb (Ward *ș.a.*, (1989) *Nature* 341:544-546), care are un domeniu VH; (6) o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR) și (7) un singur lanț Fv (scFv), acesta din urmă fiind preferat (de exemplu, derivat dintr-o bibliotecă scFv). Exemplele de exemple de realizare a constructelor de anticorpi conform invenției sunt descrise *de ex.*, în 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, și WO 2015/048272.

De asemenea, în definiția "domeniului de legare" sau "domeniu care se leagă" sunt fragmente de anticorpi cu lungime completă, cum ar fi, VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ sau "r IgG" ("jumătate de anticorp"). Constructele de anticorpi conform invenției pot cuprinde, de asemenea, fragmente modificate de anticorpi, numite și variante de anticorpi, cum ar fi, scFv, di-scFv sau bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFab, diacorpi cu un singur lanț, tandem di-scFv, tandem tri-scFv, și anticorpi cu un singur domeniu, cum ar fi, nanocorpi, sau anticorpi cu un singur domeniu variabil, care cuprind doar un domeniu variabil, care ar putea fi VHH, VH sau VL, care leagă în mod specific un antigen, sau epitop independent de alte regiuni sau domenii V.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii "Fv cu un singur lanț", "anticorpi cu un singur lanț" sau "scFv" se referă la fragmente de anticorpi cu un singur lanț polipeptidic care cuprind regiunile variabile atât ale lanțului greu cât și ale lanțului ușor, dar lipsesc regiunile constante. În general, un anticorp cu un singur lanț mai cuprinde un linker polipeptidic între domeniile VH și VL care îi permite să formeze structura dorită care ar permite legarea antigenului. Anticorpul cu un singur lanț sunt discutați în detaliu de Pluckthun în *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg și Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Sunt cunoscute diferite metode de generare a anticorpilor cu un singur lanț, inclusiv cele descrise în brevetele U.S. nr. 4.694.778 și 5.260.203; cererea de brevet de invenție internațional nr. WO 88/01649; Bird (1988) *Science* 242:423-442; Huston *ș.a.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Ward *ș.a.*, (1989) *Nature* 334:54454; Skerra *ș.a.*, (1988) *Science* 242:1038-1041. În exemplele de realizare specifice, anticorpul cu un singur lanț pot fi, de asemenea, bispecfici, multispecfici, umani și/sau umanizați și/sau sintetici.

Mai mult, definiția termenului "Constructul de anticorp" include constructe monovalente, bivalente și polivalente/multivalente și, prin urmare, constructe bispecifice, care se leagă în mod specific doar la două structuri antigenice, precum și constructe polispecifice/multispecifice, care leagă în mod specific mai mult de două structuri antigenice, de ex., trei, patru sau mai multe, prin domenii de legare distincte. Mai mult, definiția termenului "Constructul de anticorp" include molecule care constau dintr-un singur lanț polipeptidic, precum și molecule care constau din mai mult de un lanț polipeptidic, care pot fi fie identice (homodimeri, homotrimeri sau homo oligomeri) fie diferite (heterodimer, heterotrimer sau heterooligomer). Sunt descrise exemple pentru anticorpii identificați anterior și variantele sau derivații acestora *printre altele* în Harlow și Lane, Antibodies a laboratory manual, CSHL Press (1988) și Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999), Kontermann și Dübel, Antibody Engineering, Springer, ed. a 2-a 2010 și Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009.

Termenul "bispecific" așa cum este utilizat aici se referă la un construct de anticorp care este "cel puțin bispecific", *adică*, acesta cuprinde cel puțin un prim domeniu de legare și un al doilea domeniu de legare, în care primul domeniu de legare se leagă la un antigen sau țintă (aici: BCMA), iar al doilea domeniu de legare se leagă la un alt antigen sau țintă (aici: CD3). În consecință, constructele de anticorpi conform invenției cuprind specificități pentru cel puțin doi antigeni sau ținte diferite. De exemplu, primul domeniu nu se leagă de preferință la un epitop extracelular al CD3ε al uneia sau mai multor specii așa cum este descris aici. Termenul "antigen de suprafață a celulei țintă" se referă la o structură antigenică exprimată de o celulă și care este prezentă la suprafața celulei astfel încât să fie accesibilă pentru un construct de anticorp așa cum este descris aici. Poate fi o proteină, de preferință porțiunea extracelulară a unei proteine, sau o structură de carbohidrat, de preferință o structură de carbohidrat a unei proteine, cum ar fi, o glicoproteină. Este de preferință un antigen tumoral. Termenul "construct de anticorp bispecific" al invenției cuprinde, de asemenea, constructe de anticorpi multispecfici, cum ar fi, constructe de anticorpi trispecfici, acestea din urmă incluzând trei domenii de legare sau constructe care au mai mult de trei (de ex., patru, cinci...) specificități.

Având în vedere că constructele de anticorpi conform invenției sunt (cel puțin) bispecifice, ele nu apar în mod natural și sunt semnificativ diferite de produsele naturale. Un construct de anticorp "bispecific", sau imunoglobulină este, prin urmare, un anticorp hibrid artificial, sau o imunoglobulină care are cel puțin două laturi de legare distincte cu specificități diferite. Constructele de anticorpi bispecfici pot fi produse printr-o varietate de metode care includ fuziunea hibridoamelor, sau legarea fragmentelor Fab'. Vezi, *de ex.*, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

Cele cel puțin două domenii de legare și domeniile variabile (VH/VL) ale constructului de anticorpi conform prezentei invenții pot cuprinde sau nu linkerii peptidici (peptide spacer). Termenul "linker peptidic" cuprinde conform prezentei invenții o secvență de aminoacizi prin care secvențele de aminoacizi ale unui domeniu (variabil și/sau de legare) și al altui domeniu (variabil și/sau de legare) al constructului de anticorpi conform invenției. sunt legate între ele. Linkerii peptidici pot fi utilizați, de asemenea, pentru a fuziona al treilea domeniu cu celelalte domenii ale constructului de anticorpi conform invenției. O caracteristică tehnică esențială a unui astfel de linker peptidic este aceea că nu cuprinde nicio activitate de polimerizare. Printre linkerii peptidici adecvați sunt cei descriși în brevetele U.S. 4.751.180 și 4.935.233 sau WO 88/09344. Linkerii peptidici pot fi utilizați, de asemenea, pentru a atașa alte domenii, sau module, sau regiuni (cum ar fi, domenii de extindere a timpului de înjumătățire) la Constructul de anticorp conform invenției.

Constructele de anticorpi ale prezentei invenții sunt de preferință "constructe de anticorpi generate *in vitro*". Acest termen se referă la un construct de anticorp conform definiției de mai sus în care toată regiunea variabilă, sau o parte a acesteia (de ex., cel puțin o CDR) este generată într-o selecție de celule non-imune, *de ex.*, o afișare *in vitro* a fagilor, cip proteic, sau orice altă metodă prin care secvențele candidate pot fi testate pentru capacitatea lor de a se lega la un antigen. Acest termen exclude astfel, de preferință, secvențele generate numai de rearanjarea genomică într-o celulă imunitară la un animal. Un "anticorp recombinant" este un anticorp produs prin utilizarea tehnologiei ADN recombinant, sau a ingineriei genetice.

Termenul "anticorp monoclonal" (mAb), sau construct de anticorp monoclonal, așa cum este utilizat aici, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație de anticorpi substanțial omogenă, *adică*, anticorpii individuali care sunt cuprinși în populație sunt identici, cu excepția posibilelor mutații care apar în mod natural și/sau modificări post-translație (de ex., izomerizări, amidări) care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali sunt foarte specifici, fiind îndreptați împotriva unei singure părți antigenice, sau a unui determinant al antigenului, spre deosebire de preparatele convenționale de anticorpi (policlonali) care include, în mod tipic, anticorpi diferiți direcționați împotriva diferiților determinanți (sau epitopi). Pe lângă specificitatea lor, anticorpii monoclonali sunt avantajoși prin faptul că sunt sintetizați prin cultura hibridomului, deci necontaminați de alte imunoglobuline. Modificatorul

"monoclonal" indică caracterul anticorpului ca fiind obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi și nu trebuie interpretat ca necesitând producerea anticorpului printr-o metodă particulară.

Pentru prepararea anticorpilor monoclonali, poate fi utilizată orice tehnică care furnizează anticorpi produși prin culturi de linii celulare continue. De exemplu, anticorpii monoclonali care trebuie utilizați pot fi produși prin metoda hibridomului descrisă mai întâi de Koehler ș.a., *Nature*, 256: 495 (1975), sau poate fi făcută prin metode ADN recombinant (vezi, de ex., brevetul U.S. nr. 4.816.567). Exemplele de tehnici suplimentare pentru producerea de anticorpi monoclonali umani includ tehnica triomului, tehnica hibridomului cu celule B umane (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) și tehnica EBV-hibridom (Cole ș.a., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Hibridoamele pot fi apoi testate folosind metode standard, cum ar fi, testul imunosorbent legat de enzime (ELISA) și rezonanța plasmonilor de suprafață (BIAcore™), pentru a identifica unul sau mai multe hibridoame care produc un anticorp care se leagă în mod specific cu un antigen specificat. Orice formă a antigenului relevant poate fi utilizată ca imunogen, de ex., antigen recombinant, forme care apar în mod natural, orice variante sau fragmente ale acestuia, precum și o peptidă antigenică a acestuia. Rezonanța plasmonilor de suprafață, așa cum este folosită în sistemul BIAcore, poate fi utilizată pentru a crește eficiența anticorpilor fagi care se leagă la un epitop al unui antigen de suprafață a celulei țintă (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

O altă metodă exemplificativă de producere a anticorpilor monoclonali include screening-ul bibliotecilor de expresie a proteinelor, de ex., biblioteci de prezentare a fagilor, sau biblioteci de prezentare a ribozomilor. Afișarea fagilor este descrisă, de exemplu, în Ladner ș.a., brevetul U.S. nr. 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317, Clackson ș.a., *Nature*, 352: 624-628 (1991) și Marks ș.a., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Pe lângă utilizarea bibliotecilor de afișare, antigenul relevant poate fi utilizat pentru a imuniza un animal non-uman, de ex., o rozătoare (cum ar fi, un șoarece, hamster, iepure sau șobolan). Într-un exemplu de realizare, animalul non-uman include cel puțin o parte a unei gene a imunoglobulinei umane. De exemplu, este posibil să se creeze tulpini de șoarece cu deficit de producție de anticorpi de șoarece cu fragmente mari de loci Ig (imunoglobulină) umani. Anticorpii monoclonali specifici antigenului derivați din gene cu specificitatea dorită pot fi produși și selectați folosind tehnologia hibridomului. Vezi, de ex., XENOMOUSE™, Green ș.a. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, și WO 96/33735.

Un anticorp monoclonal poate fi, de asemenea, obținut de la un animal non-uman și apoi modificat, de ex., umanizat, deimmunizat, făcut himeric, etc., folosind tehnici de ADN recombinant cunoscute în domeniu. Exemplele de structuri de anticorpi modificate includ variante umanizate de anticorpi non-umani, anticorpi "maturați prin afinitate" (vezi, de ex., Hawkins ș.a. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) și Lowman ș.a., *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) și mutații de anticorpi cu funcții efectoare modificate (vezi, de ex., brevetul US 5.648.260, Kontermann și Dübel (2010), *loc. cit.* și Little (2009), *loc. cit.*).

În imunologie, maturarea afinității este procesul prin care celulele B produc anticorpi cu afinitate crescută pentru antigen în cursul unui răspuns imun. Cu expuneri repetate la același antigen, o gazdă va produce anticorpi cu afinități succesiv mai mari. La fel ca prototipul natural, maturizarea afinității *in vitro* se bazează pe principiile mutației și selecției. Maturarea afinității *in vitro* a fost folosită cu succes pentru a optimiza anticorpii, structurile de anticorpi și fragmentele de anticorpi. Mutațiile aleatorii în interiorul CDRs sunt introduse folosind radiații, mutageni chimici, sau PCR predispus la erori. În plus, diversitatea genetică poate fi crescută prin amestecarea în lanț. Două sau trei runde de mutație și selecție folosind metode de afișare, cum ar fi, afișarea fagilor, duc, de obicei, la fragmente de anticorpi cu afinități în intervalul nanomolar scăzut.

Un tip preferat de variație de substituție cu aminoacizi a constructelor de anticorp implică substituția unui sau mai multor resturi ale regiunii hipervariabilă a unui anticorp părinte (de ex., un anticorp umanizat sau uman). În general, varianta(e) rezultată(e) selectată(e) pentru dezvoltare ulterioară vor avea proprietăți biologice îmbunătățite în raport cu anticorpul părinte din care sunt generate. O modalitate convenabilă de generare a unor astfel de variante de substituție implică maturarea afinității folosind afișarea fagilor. Pe scurt, mai multe părți ale regiunii hipervariabile (de ex., 6-7 laturi) sunt mutate pentru a genera toate substituțiile posibile de aminoacizi pe fiecare parte. Variantele de anticorpi astfel generate sunt prezentate într-o manieră monovalentă din particulele filamentoase de fagi ca fuziuni cu produsul genei III al M13 împachetat în fiecare particulă. Variantele prezentate de fagi sunt apoi analizate pentru activitatea lor biologică (de ex., afinitatea de legare) așa cum este dezvăluit aici. Pentru a identifica părțile candidate ale regiunii hipervariabile pentru modificare, poate fi efectuată mutageneza de scanare cu alanină pentru a identifica resturile regiunii hipervariabile care contribuie în mod semnificativ la legarea antigenului. Alternativ sau suplimentar, poate fi benefic să se analizeze o structură cristalină a complexului antigen-anticorp pentru a identifica punctele de contact între domeniul

de legare și, de ex., BCMA uman. Astfel de resturi de contact și resturi învecinate sunt candidați pentru substituție conform tehnicilor elaborate aici. Odată ce astfel de variante sunt generate, panoul de variante este supus screening-ului așa cum este descris aici și anticorpii cu proprietăți superioare într-unul sau mai multe teste relevante pot fi selectați pentru dezvoltare ulterioară.

Anticorpii monoclonali și structurile de anticorpi din prezenta invenție includ în mod specific anticorpi "himerici" (imunoglobuline) în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este identică, sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare în anticorpii derivați de la o anumită specie, sau care aparțin unei anumite specii, unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul lanțului (lanțurilor) este/sunt identic/e sau omolog/omoloage cu secvențele corespunzătoare în anticorpi derivați de la o altă specie, sau care aparțin unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atâta timp cât aceștia prezintă activitatea biologică dorită (brevet U.S. nr. 4.816.567; Morrison ș.a., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 81: 6851-6855 (1984)). Anticorpii himerici de interes aici includ anticorpi "primitizați" care cuprind secvențe de legare a antigenului de domeniu variabil derivate de la o primată non-umană (de ex., Old World Monkey, Ape, etc.) și secvențe de regiune constantă umană. Au fost descrise o varietate de abordări pentru producerea de anticorpi himerici. Vezi *de ex.*, Morrison ș.a., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda ș.a., Nature 314:452, 1985, Cabilly ș.a., brevet U.S. nr. 4.816.567; Boss ș.a., brevet U.S. nr. 4.816.397; Tanaguchi ș.a., EP 0171496; EP 0173494; și GB 2177096.

Un anticorp, un construct de anticorp, un fragment de anticorp, sau o variantă de anticorp poate fi, de asemenea, modificat prin eliminarea specifică a epitopilor celulelor T umane (o metodă numită "dezimunizare") prin metodele descrise, de exemplu, în WO 98/52976, sau WO 00/34317. Pe scurt, domeniile variabile ale lanțului greu și ușor ale unui anticorp pot fi analizate pentru peptide care se leagă la MHC clasa II; aceste peptide reprezintă epitopi potențiali ai celulelor T (așa cum sunt definiți în WO 98/52976 și WO 00/34317). Pentru detectarea potențialilor epitopi de celule T, poate fi aplicată o abordare de modelare computerizată numită "filetare peptidică" și, în plus, poate fi căutată o bază de date cu peptide de legare a MHC de clasă II umane pentru motivele prezente în secvențele VH și VL, așa cum este descris în WO 98/52976 și WO 00/34317. Aceste motive se leagă la oricare dintre cele 18 alotipuri majore DR MHC clasa II și, astfel, constituie epitopi potențiali ai celulei T. Epitopi potențiali de celule T detectați pot fi eliminați prin substituirea unui număr mic de resturi de aminoacizi în domeniile variabile sau, de preferință, prin substituții de un singur aminoacid. De obicei, se fac substituții conservatoare. Adesea, dar nu exclusiv, poate fi utilizat un aminoacid comun unei poziții în secvențele de anticorpi germinali umani. Sunt dezvăluite secvențe ale liniei germinale umane *de ex.*, în Tomlinson, ș.a., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. ș.a., (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; și Tomlinson ș.a., (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Directorul V BASE oferă un director cuprinzător de secvențe ale regiunii variabile a imunoglobulinei umane (compilat de Tomlinson, L.A. ș.a., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Aceste secvențe pot fi utilizate ca sursă de secvență umană, *de ex.*, pentru regiuni-cadru și CDRs. Regiunile cadru umane de consens pot fi, de asemenea, utilizate, de exemplu, așa cum este descris în brevetul US nr. 6.300.064.

Anticorpii "umanizați", structurile de anticorpi, variantele sau fragmentele acestora (cum ar fi, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, sau alte subsecvențe ale anticorpilor de legare la antigen) sunt anticorpi, sau imunoglobuline cu secvențe în mare parte umane, care conțin (a) secvențe minime derivate din imunoglobulină non-umană. În cea mai mare parte, anticorpii umanizați sunt imunoglobuline umane (anticorp receptor) în care resturile dintr-o regiune hipervariabilă (de asemenea, CDR) a primitorului sunt înlocuite cu resturi dintr-o regiune hipervariabilă a unei specii non-umane (*de ex.*, rozătoare) (anticorp donor), cum ar fi, șoarece, șobolan, hamster, sau iepure având specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, resturile regiunii cadru Fv (FR) ale imunoglobulinei umane sunt înlocuite cu resturile non-umane corespunzătoare. Mai mult, "anticorpii umanizați" așa cum sunt utilizați aici pot cuprinde, de asemenea, resturi care nu se găsesc nici în anticorpul primitor, nici în anticorpul donor. Aceste modificări sunt făcute pentru a rafina și optimiza și mai mult performanța anticorpilor. Anticorpul umanizat poate cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a imunoglobulinei (Fc), de obicei cea a unei imunoglobuline umane. Pentru mai multe detalii, vezi Jones ș.a., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann ș.a., Nature, 332: 323-329 (1988); și Presta, Curr. op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Anticorpii umanizați, sau fragmentele acestora pot fi generați prin înlocuirea secvențelor domeniului variabil Fv care nu sunt direct implicate în legarea antigenului cu secvențe echivalente din domeniile variabile Fv umane. Metode exemplificative pentru generarea de anticorpi umanizați sau fragmente ale acestora sunt furnizate de Morrison (1985) Science 229:1202-1207; de Oi ș.a. (1986) BioTechniques 4:214; și prin US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; și US 6.407.213. Aceste metode includ izolarea, manipularea și exprimarea secvențelor de acid nucleic care codifică toate, sau o parte din domeniile variabile Fv ale imunoglobulinei de la cel puțin unul dintr-un lanț greu sau ușor. Astfel de acizi nucleici pot fi obținuți dintr-un hibridom care produce un anticorp împotriva

unei ținte predeterminate, așa cum este descris mai sus, precum și din alte surse. ADN-ul recombinant care codifică molecula de anticorp umanizat poate fi apoi clonat într-un vector de expresie adecvat.

Anticorpul umanizat pot fi produși, de asemenea, utilizând animale transgenice, cum ar fi, șoarecii care exprimă gene ale lanțului greu și ușor uman, dar sunt incapabili să exprime genele endogene ale imunoglobulinei de șoarece. Winter descrie un exemplu de metodă de grefare CDR care poate fi utilizată pentru a prepara anticorpii umanizați descriși aici (brevet U.S. nr. 5.225.539). Toate CDRs ale unui anticorp uman particular pot fi înlocuite cu cel puțin o porțiune dintr-un CDR non-uman, sau numai unele dintre CDRs pot fi înlocuite cu CDRs non-umane. Aceasta este necesară doar pentru înlocuirea numărului de CDRs necesare pentru legarea anticorpului umanizat la un antigen predeterminat.

Un anticorp umanizat poate fi optimizat prin introducerea de substituții conservatoare, substituții de secvență consens, substituții de linie germinativă și/sau mutații inverse. Astfel de molecule de imunoglobulină modificate pot fi produse prin oricare dintre mai multe tehnici cunoscute în domeniu, (*de ex.*, Teng ș.a., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor ș.a., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson ș.a., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, și EP 239 400).

Termenul "anticorp uman", "construct de anticorp uman" și "domeniu de legare uman" includ anticorpi, constructe de anticorpi și domenii de legare care au regiuni de anticorpi, cum ar fi, regiuni variabile și constante, sau domenii care corespund în mod substanțial secvențelor de imunoglobuline ale liniei germinale umane cunoscute în domeniu, inclusiv, de exemplu, pe cele descrise de Kabat ș.a., (1991) (*loc. cit.*). Anticorpii umani, constructele de anticorpi sau domeniile de legare ale invenției pot include resturi de aminoacizi necodificate de secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane (*de ex.*, mutații introduse prin mutagenază aleatorie, sau specific laterală *in vitro*, sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu, în CDRs și, în special, în CDR3. Anticorpii umani, constructele de anticorpi, sau domeniile de legare pot avea cel puțin una, două, trei, patru, cinci sau mai multe poziții înlocuite cu un rest de aminoacid care nu este codificat de secvența de imunoglobulină germinativă umană. Definiția anticorpilor umani, a constructelor de anticorpi și a domeniilor de legare așa cum sunt utilizate aici, totuși, ia în considerare și "anticorpi complet umani", care includ numai secvențe umane de anticorpi modificate neartificial și/sau genetic, deoarece acestea pot fi obținute prin utilizarea tehnologiilor sau sistemelor, precum Xenomouse. De preferință, un "anticorp complet uman" nu include resturi de aminoacizi necodificate de secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane.

În unele exemple de realizare, constructele de anticorpi ale invenției sunt constructe de anticorpi "izolate" sau "substanțial pure". "Izolată" sau "substanțial pur", atunci când este utilizat pentru a descrie constructele de anticorpi dezbănuite aici, înseamnă un construct de anticorp care a fost identificat, separat și/sau recuperat dintr-o componentă a mediului său de producere. De preferință, constructul de anticorp este lipsit, sau substanțial lipsit de asociere cu toate celelalte componente din mediul său de producere. Componentele contaminante ale mediului său de producere, cum ar fi, cea care rezultă din celulele transfectate recombinante, sunt materiale care ar interfera în mod obișnuit cu utilizările de diagnosticare sau terapeutice ale polipeptidei și pot include enzime, hormoni și alte substanțe proteice sau neproteice dizolvate. Constructele de anticorpi pot constitui, de ex., cel puțin aproximativ 5%, sau cel puțin aproximativ 50% în greutate din proteina totală dintr-o probă dată. Se înțelege că proteina izolată poate constitui de la 5% până la 99,9% în greutate, din conținutul total de proteine, în funcție de circumstanțe. Polipeptida poate fi produsă la o concentrație semnificativ mai mare prin utilizarea unui promotor inductibil, sau a unui promotor de expresie ridicată, astfel încât să fie realizată la niveluri de concentrație crescute. Definiția include producerea unui construct de anticorp într-o mare varietate de organisme și/sau celule gazdă care sunt cunoscute în domeniu. În exemplele de realizare preferate, constructul de anticorp va fi purificat (1) într-un grad suficient pentru a obține cel puțin 15 resturi ale unei secvențe de aminoacizi N-terminală, sau internă prin utilizarea unui secvențiator cu cupă rotativă sau (2) la omogenitate prin SDS-PAGE în condiții nereducătoare, sau reducătoare folosind albastru Coomassie sau, de preferință, colorant argintiu. În mod obișnuit, totuși, un construct de anticorp izolat va fi preparat prin cel puțin o etapă de purificare.

Termenul "domeniu de legare" caracterizează în legătură cu prezenta invenție un domeniu care (în mod specific) se leagă la/interacționează cu/recunoaște un anumit epitop țintă, sau o parte țintă dată pe moleculele țintă (antigeni), aici: BCMA și respectiv CD3. Structura și funcția primului domeniu de legare (recunoașterea BCMA), și, de preferință, de asemenea, structura și/sau funcția celui de-al doilea domeniu de legare (recunoașterea CD3), se bazează pe structura și/sau funcția unui anticorp, de ex., a unei molecule de imunoglobulină de lungime completă, sau întreagă și/sau este/sunt extras/e din domeniile lanțului greu variabil (VH) și/sau lanțului ușor variabil (VL) ale unui anticorp sau fragment al acestuia. De preferință, primul domeniu de legare este caracterizat prin prezența a trei CDRs ale lanțului ușor (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VL) și/sau trei CDRs ale lanțului greu (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VH). Al doilea domeniu de legare cuprinde, de preferință, de asemenea, cerințele structurale minime ale unui anticorp care permit legarea țintei. Mai preferabil, al doilea domeniu de legare cuprinde cel puțin trei CDRs ale lanțului ușor (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VL) și/sau trei

CDRs ale lanțului greu (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VH). Se are în vedere ca primul și/sau al doilea domeniu de legare să fie produs, sau obținut prin metode de afișare a fagilor, sau de screening de bibliotecă, mai degrabă decât prin grefarea secvențelor CDR dintr-un anticorp preexistent (monoclonal) într-o schelă.

Conform prezentei invenții, domeniile de legare sunt sub forma unei polipeptide. Astfel de polipeptide pot include părți proteice și părți neproteice (de ex., linkeri chimici, sau agenți chimici de reticulare, cum ar fi, glutaraldehida). Proteinele (inclusiv fragmente ale acestora, de preferință fragmente biologice active, și peptide, având de obicei mai puțin de 30 de aminoacizi) cuprind doi, sau mai mulți aminoacizi cuplați unul cu altul printr-o legătură peptidică covalentă (rezultând un lanț de aminoacizi).

Termenul "polipeptidă" așa cum este utilizat aici descrie un grup de molecule, care constau de obicei din mai mult de 30 de aminoacizi. Polipeptidele pot forma în plus multimeri, cum ar fi, dimeri, trimeri și oligomeri superiori, *adică*, constând din mai mult de o moleculă de polipeptidă. Moleculele polipeptidice care formează astfel de dimeri, trimeri, etc., pot fi identice sau neidentice. Structurile de ordin superior corespunzătoare ale unor astfel de multimeri sunt, în consecință, denumite homo- sau heterodimeri, homo- sau heterotrimeri, etc. Un exemplu pentru un heteromultimer este o moleculă de anticorp, care, în forma sa naturală, constă din două lanțuri polipeptidice ușoare identice și două lanțuri polipeptidice grele identice. Termenii "peptidă", "polipeptidă" și "proteină" se referă, de asemenea, la peptide/polipeptide/proteine modificate în mod natural, în care modificarea este efectuată *de ex.*, prin modificări post-tranlaționale, cum ar fi, glicozilarea, acetilarea, fosforilarea și altele asemenea. O "peptidă", "polipeptidă" sau "proteină" atunci când se face referire aici la aceasta poate fi, de asemenea, modificată chimic, cum ar fi, peghilată. Astfel de modificări sunt bine cunoscute în domeniu și sunt descrise aici mai jos.

De preferință, domeniul de legare care se leagă la BCMA și/sau domeniul de legare care se leagă la CD3ε este/sunt domenii de legare umane. Anticorpul și constructele de anticorpi care cuprind cel puțin un domeniu de legare uman evită unele dintre problemele asociate cu anticorpul, sau constructele de anticorpi care posedă regiuni variabile și/sau constante non-umane, cum ar fi, de rozătoare (*de ex.*, murină, șobolan, hamster sau iepure). Prezența unor astfel de proteine derivate de rozătoare poate duce la eliminarea rapidă a anticorpilor, sau a constructelor de anticorpi, sau poate duce la generarea unui răspuns imun împotriva anticorpului sau a constructului de anticorpi de către un pacient. Pentru a evita utilizarea anticorpilor sau a constructelor de anticorpi derivați de la rozătoare, pot fi generați anticorpi/constructe de anticorpi umani sau complet umani prin introducerea funcției de anticorpi umani într-o rozătoare, astfel încât rozătoarea să producă anticorpi complet umani.

Capacitatea de a clona și de a reconstrui loci umani de mărime megabază în YAC și de a-l introduce în linia germinativă a șoarecelui oferă o abordare puternică pentru elucidarea componentelor funcționale ale locilor foarte mari, sau cartografiati grosier, precum și generarea de modele utile de boli umane. În plus, utilizarea unei astfel de tehnologii pentru înlocuirea locilor de șoarece cu echivalentele lor umane ar putea oferi perspective unice asupra expresiei și reglementării produselor genetice umane în timpul dezvoltării, a comunicării lor cu alte sisteme și a implicării lor în inducerea și progresia bolii.

O aplicație practică importantă a unei astfel de strategii este "umanizarea" sistemului imunitar umoral al șoarecelui. Introducerea loci de imunoglobulină umană (Ig) la șoareci la care genele endogene Ig au fost inactivate oferă oportunitatea de a studia mecanismele care stau la baza expresiei și asamblării programate a anticorpilor, precum și rolul lor în dezvoltarea celulelor B. Mai mult, o astfel de strategie ar putea oferi o sursă ideală pentru producerea de anticorpi monoclonali complet umani (mAbs) - o etapă importantă pentru îndeplinirea promisiunii terapiei cu anticorpi în bolile umane. Se așteaptă ca anticorpul complet uman, sau constructele de anticorpi să reducă la minimum răspunsurile imunogene și alergice intrinseci mAb-urilor de șoarece sau derivate de la șoarece și astfel să mărească eficacitatea și siguranța anticorpilor/constructelor de anticorpi administrate. Utilizarea anticorpilor complet umani sau constructelor de anticorpi poate fi de așteptat să ofere un avantaj substanțial în tratamentul bolilor umane cronice și recurente, cum ar fi, inflamația, autoimunitatea și cancerul, care necesită administrări repetate de compus.

O abordare către acest obiectiv a fost să se realizeze tulpini de șoarece cu deficit de producție de anticorpi de șoarece cu fragmente mari de loci Ig umani în așteptarea că, astfel de șoareci ar produce un repertoriu mare de anticorpi umani în absența anticorpilor de șoarece. Fragmentele mari de Ig umane ar păstra diversitatea mare variabilă a genelor, precum și reglarea adecvată a producției și exprimării anticorpilor. Prin exploatarea mecanismelor de șoarece pentru diversificarea și selecția anticorpilor și a lipsei de toleranță imunologică la proteinele umane, repertoriul de anticorpi umani reproduși în aceste tulpini de șoarece ar trebui să producă anticorpi cu afinitate ridicată împotriva oricărui antigen de interes, inclusiv antigeni umani. Folosind tehnologia hibridomului, ar putea fi produși și selectați, cu ușurință, mAbs umani specifici antigenului cu specificitatea dorită. Această strategie generală a fost demonstrată în legătură cu generarea primelor tulpini de șoareci XenoMouse (vezi Green ș.a. Nature Genetics 7:13-21 (1994)). Tulpinile XenoMouse au fost proiectate cu cromozomi artificiali de drojdie (YAC) care conțin

fragmente de configurație germinativă de 245 kb și 190 kb ale locusului lanțului greu uman și, respectiv, locusului lanțului ușor kappa, care au conținut secvențe de regiune variabilă și constantă de bază. Ig umană care conține YAC s-a dovedit a fi compatibilă cu sistemul de șoarece atât pentru rearanjare, cât și pentru exprimarea anticorpilor și a fost capabilă să înlocuiască genele inactivate de Ig de șoarece. Acest lucru a fost demonstrat prin capacitatea lor de a induce dezvoltarea celulelor B, de a produce un repertoriu uman asemănător adulților de anticorpi complet umani și de a genera mAbs umani specifici antigenului. Aceste rezultate au sugerat, de asemenea, că introducerea unor porțiuni mai mari de loci Ig umani care conțin un număr mai mare de gene V, elemente de reglare suplimentare și regiuni constante Ig umane poate recapitula, în mod substanțial, întregul repertoriu care este caracteristic răspunsului imunitar uman la infecție și imunizare. Lucrarea lui Green ș.a., a fost extinsă recent la introducerea a mai mult de aproximativ 80% din repertoriul de anticorpi umani prin introducerea de fragmente YAC de mărime megabază, configurație de linie germinativă, ale locilor lanțului greu uman și, respectiv, locilor lanțului ușor kappa. Vezi Mendez ș.a. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

Producția de șoareci XenoMouse este discutată și delimitată în continuare în brevetele U.S. nr. 6.673.986; 6.162.963; 6.150.584; 6.114.598; 6.075.181, și 5.939.598 precum și cererile de brevet americane subiacente și brevetele Japoneze nr. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, și 3 068 507 B2. Vezi și Mendez ș.a., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) și Green și 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, și WO 03/47336.

Într-o abordare alternativă, alții, inclusiv GenPharm International, Inc., au utilizat o abordare "minilocus". În abordarea minilocus, un locus Ig exogen este imitat prin includerea de bucăți (gene individuale) din locusul Ig. Astfel, una sau mai multe gene VH, una sau mai multe gene DH, una sau mai multe gene JH, o regiune constantă mu și o a doua regiune constantă (de preferință o regiune constantă gamma) sunt formate într-un construct pentru inserare într-un animal. Această abordare este descrisă în brevetul U.S. nr. 5.545.807 la Surani ș.a., și brevetele U.S. nr. 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; și 6.255.458 fiecare pentru Lonberg și Kay, brevetele U.S. nr. 5.591.669 și 6.023.010 pentru Krimpenfort și Berns, brevetele U.S. nr. 5.612.205; 5.721.367; și 5.789.215 pentru Berns ș.a., și brevetul U.S. nr. 5.643.763 pentru Choi și Dunn. Această abordare este descrisă în continuare în brevetele US GenPharm International nr. 5.569.825; 5.789.650; 5.545.806; 5.661.016; 5.814.318; și 5.364.079 precum și cererile de brevet americane subiacente. Vezi și 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, și WO 98/24884 și brevetul U.S. nr. 5.981.175. Vezi mai departe Taylor ș.a., (1992), Chen ș.a., (1993), Tuaillon ș.a., (1993), Choi ș.a., (1993), Lonberg ș.a., (1994), Taylor ș.a., (1994), și Tuaillon ș.a., (1995), Fishwild ș.a., (1996).

Kirin a demonstrat, de asemenea, generarea de anticorpi umani de la șoareci în care, prin fuziunea microcelulelor, au fost introduse părți mari de cromozomi, sau cromozomi întregi. A se vedea publicațiile privind cererea de brevet european nr. EP 773288 și EP 843961. Xenerex Biosciences dezvoltă o tehnologie pentru generarea potențială de anticorpi umani. În această tehnologie, șoarecii SCID sunt reconstituiți cu celule limfatice umane, de ex., celule B și/sau T. Șoarecii sunt apoi imunizați cu un antigen și pot genera un răspuns imunitar împotriva antigenului. Vezi brevetele U.S. nr. 5.476.996; 5.698.767; și 5.958.765.

Răspunsurile anticorpilor umani anti-șoarece (HAMA) au determinat industria să pregătească anticorpi himerici, sau umanizați altfel. Este totuși de așteptat ca anumite răspunsuri de anticorp uman anti-himeric (HACA) să fie observate, în special în utilizările cronice, sau multi-doză ale anticorpului. Astfel, ar fi de dorit să se furnizeze constructe de anticorpi care cuprind un domeniu de legare uman împotriva BCMA și un domeniu de legare uman împotriva CD3ε pentru a vicia preocupările și/sau efectele răspunsului HAMA sau HACA.

Termenii "se leagă (în mod specific) de", "recunoaște (în mod specific)", "este direcționat (în mod specific) către" și "reacționează (specific) cu" înseamnă în conformitate cu această invenție că un domeniu de legare interacționează, sau interacționează în mod specific cu un anumit epitop sau o parte țintă dată pe moleculele țintă (antigeni), aici: BCMA și respectiv CD3ε.

Termenul "epitop" se referă la o parte a unui antigen la care se leagă în mod specific un domeniu de legare, cum ar fi, un anticorp sau imunoglobulină, sau un derivat, fragment sau variantă a unui anticorp, sau a unei imunoglobuline. Un "epitop" este antigenic și astfel termenul epitop este uneori denumit aici și "structură antigenică", sau "determinant antigenic". Astfel, domeniul de legare este o "parte de interacțiune cu antigen". Respectiva legătură/interacțiune este, de asemenea, înțeleasă ca definind o "recunoaștere specifică".

"Epitopii" pot fi formați atât din aminoacizi învecinați, cât și din aminoacizi neînvecinați juxtapuși prin plierea terțiară a unei proteine. Un "epitop liniar" este un epitop în care o secvență primară de aminoacizi cuprinde epitopul recunoscut. Un epitop liniar include, uzual, cel puțin 3 sau cel puțin 4, și mai uzual, cel puțin 5 sau cel puțin 6, sau cel puțin 7, de ex., aproximativ 8 până la aproximativ 10 aminoacizi într-o secvență unică.

Un "epitop conformațional", spre deosebire de un epitop liniar, este un epitop în care secvența primară a aminoacizilor care cuprind epitopul nu este singura componentă definitorie a epitopului recunoscut (*de ex.*, un epitop în care secvența primară de aminoacizi nu este recunoscută neapărat de domeniul de legare). De obicei, un epitop conformațional cuprinde un număr crescut de aminoacizi în raport cu un epitop liniar. În ceea ce privește recunoașterea epitopilor conformaționali, domeniul de legare recunoaște o structură tridimensională a antigenului, de preferință o peptidă sau o proteină, sau un fragment al acesteia (în contextul prezentei invenții, structura antigenică pentru unul dintre domeniile de legare este cuprinsă în proteina antigenului pe suprafața celulei țintă). De exemplu, atunci când o moleculă de proteină se pliază pentru a forma o structură tridimensională, anumiți aminoacizi și/sau scheletul polipeptidic care formează epitopul conformațional devin juxtapuși, permițând anticorpului să recunoască epitopul. Metodele de determinare a conformației epitopilor includ, dar nu sunt limitate la, cristalografia cu raze X, spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară bidimensională (2D-NMR) și etichetare cu spin direcționat pe situs și spectroscopie de rezonanță paramagnetică de electron (EPR).

O metodă de cartografiere a epitopilor este descrisă în cele ce urmează: Când o regiune (o întindere a aminoacizilor învecinați) din proteina BCMA umană este schimbată/înlocuită cu regiunea corespunzătoare a unui BCMA non-uman și non-primat (*de ex.*, BCMA de șoarece, dar și altele cum ar fi, de pui, șobolan, hamster, iepure, etc., pot fi, de asemenea, imaginabile), este de așteptat să apară o scădere a legării domeniului de legare, cu excepția cazului în care domeniul de legare este reactiv încrucișat pentru BCMA non-uman, non-primat folosit. Respectiva scădere este, de preferință, de cel puțin 10%, 20%, 30%, 40% sau 50%; mai preferabil cel puțin 60%, 70% sau 80% și cel mai preferabil 90%, 95% sau chiar 100% în comparație cu legarea la regiunea respectivă din proteina BCMA umană, prin care se leagă la regiunea respectivă în proteina BCMA umană, unde legarea la respectiva regiune în proteina BCMA umană este setată să fie de 100%. Se are în vedere că himerele BCMA umane/BCMA non-umane menționate anterior sunt exprimate în celule CHO. De asemenea, se are în vedere că himerele BCMA umane/BCMA non-umane sunt fuzionate cu un domeniu transmembrantar și/sau un domeniu citoplasmatic al unei proteine diferite legate de membrană, cum ar fi, EpCAM.

Într-o metodă alternativă sau suplimentară pentru maparea epitopilor, pot fi generate mai multe versiuni trunchiate ale domeniului extracelular BCMA uman pentru a determina o regiune specifică care este recunoscută de un domeniu de legare. În aceste versiuni trunchiate, diferitele domenii/subdomenii sau regiuni BCMA extracelulare sunt șterse treptat, pornind de la capătul N-terminal. Se are în vedere că versiunile BCMA trunchiate pot fi exprimate în celule CHO. Se are în vedere, de asemenea, că versiunile BCMA trunchiate pot fi fuzionate cu un domeniu transmembrantar și/sau un domeniu citoplasmatic al unei proteine diferite legate de membrană, cum ar fi, EpCAM. Se are în vedere, de asemenea, că versiunile BCMA trunchiate pot cuprinde un domeniu peptidic semnal la capătul lor N-terminal, de exemplu, o peptidă semnal derivată din peptida semnal al lanțului greu IgG de șoarece. În plus, se are în vedere că versiunile BCMA trunchiate pot cuprinde un domeniu v5 la capătul lor N-terminal (în urma peptidei semnal) care permite verificarea exprimării lor corecte pe suprafața celulei. Este de așteptat să apară o scădere sau o pierdere a legării cu acele versiuni BCMA trunchiate care nu mai cuprind regiunea BCMA care este recunoscută de domeniul de legare. Scăderea legării este de preferință de cel puțin 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; mai preferabil cel puțin 60%, 70%, 80% și cel mai preferabil 90%, 95% sau chiar 100%, în care legarea la întreaga proteină BCMA umană (sau regiunea, sau domeniul său extracelular) este setată la 100%.

O altă metodă pentru a determina contribuția unui rest specific de BCMA la recunoașterea de către un construct de anticorp, sau un domeniu de legare este scanarea alanină (vezi de ex., Morrison KL și Weiss GA. *Cur Opin Chem Biol.* 2001 (3):302-7), unde fiecare rest de analizat este înlocuit cu alanină, de ex., prin mutagenază direcționată pe situs. Alanina este utilizată din cauza grupării sale funcționale metil, neoluminoasă, inertă din punct de vedere chimic, care imită totuși referințele structurii secundare pe care le posedă mulți dintre ceilalți aminoacizi. Uneori pot fi utilizați aminoacizi voluminoși, cum ar fi, valină sau leucina, în cazurile în care se dorește conservarea dimensiunii resturilor mutante. Scanarea cu alanine este o tehnologie matură care a fost folosită pentru o perioadă lungă de timp.

Interacțiunea dintre domeniul de legare și epitop, sau regiunea care cuprinde epitopul implică faptul că un domeniu de legare prezintă o afinitate apreciabilă pentru epitop/regiunea care cuprinde epitopul pe o anumită proteină sau antigen (aici: BCMA și respectiv CD3) și, în general, nu prezintă reactivitate semnificativă cu proteine sau antigeni, altele decât BCMA sau CD3. "Afinitate apreciabilă" include legarea cu o afinitate de aproximativ 10^{-6} M (KD) sau mai puternică. De preferință, legarea este considerată specifică atunci când afinitatea de legare este de aproximativ 10^{-12} la 10^{-8} M, 10^{-12} la 10^{-9} M, 10^{-12} la 10^{-10} M, 10^{-11} la 10^{-8} M, preferabil de aproximativ 10^{-11} la 10^{-9} M. Se poate testa dacă un domeniu de legare reacționează în mod specific cu, sau se leagă de o țintă cu ușurință prin: *printre altele*, comparând reacția domeniului de legare menționat cu o proteină sau un antigen țintă cu reacția domeniului de legare menționat cu alte proteine sau antigeni decât BCMA sau CD3. De preferință, un domeniu de legare al invenției nu se leagă în mod esențial, sau substanțial la proteine sau antigeni, altele

decât BCMA sau CD3 (*adică*, primul domeniu de legare nu este capabil să se lege la alte proteine decât BCMA și al doilea domeniu de legare nu este capabil să se lege la alte proteine decât CD3). Este o caracteristică avută în vedere a constructelor de anticorpi conform prezentei invenții să aibă caracteristici de afinitate superioare în comparație cu alte formate HLE. O astfel de afinitate superioară, în consecință, sugerează un timp de înjumătățire prelungit in vivo. Timpul de înjumătățire mai mare al constructelor de anticorpi conform prezentei invenții poate reduce durata și frecvența administrării, ceea ce contribuie în mod obișnuit la o conformitate îmbunătățită cu pacientul. Acest lucru este de o importanță deosebită deoarece constructele de anticorpi ale prezentei invenții sunt deosebit de benefice pentru pacienții cu cancer foarte slăbiți sau chiar cu morbidități multiple.

Termenul "nu se leagă în mod esențial/substanțial", sau "nu este capabil să se lege" înseamnă că un domeniu de legare al prezentei invenții nu se leagă la o proteină, sau un antigen altul decât BCMA sau CD3, *adică*, nu prezintă reactivitate mai mare de 30%, de preferință nu mai mare de 20%, mai preferabil nu mai mare de 10%, în special preferabil nu mai mare de 9%, 8%, 7%, 6% sau 5% cu proteine sau antigeni altele decât BCMA sau CD3, prin care legarea la BCMA sau, respectiv, CD3, este setată la 100%.

Se crede că legarea specifică este efectuată de motivele specifice din secvența de aminoacizi a domeniului de legare și a antigenului. Astfel, legarea este realizată ca rezultat al structurii lor primare, secundare și/sau terțiare, precum și ca rezultat al modificărilor secundare ale structurilor menționate. Interacțiunea specifică a părții de interacțiune a antigenului cu antigenul său specific poate avea ca rezultat o legare simplă a părții menționate la antigen. Mai mult, interacțiunea specifică a părții de interacțiune a antigenului cu antigenul său specific poate duce, alternativ sau suplimentar, la inițierea unui semnal, *de ex.*, datorită inducerii unei modificări a conformației antigenului, a unei oligomerizări a antigenului, etc.

Termenul "variabil" se referă la porțiunile de anticorpi, sau domeniile de imunoglobulină care prezintă variabilitate în secvența lor și care sunt implicate în determinarea specificității și afinității de legare a unui anumit anticorp (*adică*, "domenii variabil(e)"). Împerecherea dintre un lanț greu variabil (VH) și un lanț ușor variabil (VL) formează împreună un singur situs de legare a antigenului.

Variabilitatea nu este distribuită uniform în domeniile variabile ale anticorpilor; aceasta este concentrată în subdomeniile fiecăreia dintre regiunile variabile ale lanțului greu și ușor. Aceste subdomenii sunt numite "regiuni hipervariabile" sau "regiuni de determinare a complementarității" (CDRs). Porțiunile mai conservate (*adică*, nehipervariabile) ale domeniilor variabile sunt numite regiuni "cadru" (FRM sau FR) și oferă o schelă pentru cele șase CDRs în spațiul tridimensional pentru a forma o suprafață de legare a antigenului. Domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare care apar în mod natural cuprind, fiecare, patru regiuni FRM (FR1, FR2, FR3 și FR4), adoptând în mare parte o configurație β -sheet, conectate prin trei regiuni hipervariabile, care formează bucle care se conectează și, în unele cazuri, formează parte a structurii β -sheet. Regiunile hipervariabile din fiecare lanț sunt ținute împreună în imediata apropiere de FRM și, împreună cu regiunile hipervariabile din celălalt lanț, contribuie la formarea părții de legare a antigenului (vezi Kabat *ș.a., loc. cit.*).

Termenii "CDR" și pluralul său "CDRs" se referă la regiunea care determină complementaritatea dintre care trei alcătuiesc caracterul de legare al unei regiuni variabile a lanțului ușor (CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3) și trei alcătuiesc caracterul de legare al unei regiuni variabile a lanțului greu (CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3). CDRs conțin majoritatea resturilor responsabile pentru interacțiunile specifice ale anticorpului cu antigenul și, prin urmare, contribuie la activitatea funcțională a unei molecule de anticorp: ele sunt principalii determinanți ai specificității antigenului.

Limitele și lungimile definitorii exacte ale CDR sunt supuse unor sisteme diferite de clasificare și numerotare. Prin urmare, CDRs pot fi menționate de Kabat, Chothia, contact, sau orice alte definiții de limite, inclusiv sistemul de numerotare descris aici. În ciuda granițelor diferite, fiecare dintre aceste sisteme are un anumit grad de suprapunere în ceea ce constituie așa-numitele "regiuni hipervariabile" din secvențele variabile. Definițiile CDR în conformitate cu aceste sisteme pot diferi în lungime și în zonele de limită în raport cu regiunea cadru adiacentă. Vezi, de exemplu, Kabat (o abordare bazată pe variabilitatea secvenței între specii), Chothia (o abordare bazată pe studii cristalografice ale complexelor antigen-anticorp) și/sau MacCallum (Kabat *ș.a., loc. cit.*; Chothia *ș.a., J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917; și MacCallum *ș.a., J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Încă un alt standard pentru caracterizarea părții de legare a antigenului este definiția AbM utilizată de software-ul de modelare a anticorpilor AbM de la Oxford Molecular's AbM. Vezi, *de ex.*, Protein Sequence și Structure Analysis of Antibody Variable Domains. În: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. și Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). În măsura în care două tehnici de identificare a resturilor definesc regiuni de suprapunere, dar nu regiuni identice, ele pot fi combinate pentru a defini un CDR hibrid. Cu toate acestea, se preferă numerotarea în conformitate cu așa-numitul sistem Kabat.

De obicei, CDRs formează o structură de buclă care poate fi clasificată ca o structură canonică. Termenul "structură canonică" se referă la conformația principală a lanțului care este adoptată de buclele

de legare a antigenului (CDR). Din studiile structurale comparative, s-a descoperit că cinci dintre cele șase bucle de legare a antigenului au doar un repertoriu limitat de conformații disponibile. Fiecare structură canonică poate fi caracterizată prin unghiurile de torsiune ale scheletului polipeptidic. Prin urmare, buclele corespondente dintre anticorpi pot avea structuri tridimensionale foarte asemănătoare, în ciuda variabilității mari a secvenței de aminoacizi în majoritatea părților buclelor (Chothia și Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia ș.a., Nature, 1989, 342: 877; Martin și Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263: 800). Mai mult, există o relație între structura buclei adoptată și secvențele de aminoacizi care o înconjoară. Conformația unei anumite clase canonice este determinată de lungimea buclei și a resturilor de aminoacizi care se află în pozițiile cheie din buclă, precum și în cadrul conservat (*adică*, în afara buclei). Prin urmare, atribuirea unei anumite clase canonice poate fi făcută pe baza prezenței acestor resturi de aminoacizi cheie.

Termenul "structură canonică" poate include, de asemenea, considerații cu privire la secvența liniară a anticorpului, de exemplu, așa cum este catalogat de Kabat (Kabat ș.a., loc. cit.). Schema (sistemul) de numerotare Kabat este un standard adoptat pe scară largă pentru numerotarea resturilor de aminoacizi ale unui domeniu variabil de anticorp într-o manieră consecventă și este schema preferată aplicată în prezenta invenție, așa cum este menționat și în altă parte aici. Considerații structurale suplimentare pot fi, de asemenea, utilizate pentru a determina structura canonică a unui anticorp. De exemplu, acele diferențe care nu sunt pe deplin reflectate de numerotarea Kabat pot fi descrise de sistemul de numerotare al lui Chothia ș.a., și/sau dezvăluite prin alte tehnici, de exemplu, cristalografie și modelare computațională bidimensională sau tridimensională. În consecință, o anumită secvență de anticorp poate fi plasată într-o clasă canonică care permite, printre altele, identificarea secvențelor de bază adecvate (de ex., pe baza dorinței de a include o varietate de structuri canonice într-o bibliotecă). Numerotarea Kabat a secvențelor de aminoacizi a anticorpilor și considerații structurale așa cum este descris de Chothia ș.a., loc. cit. și implicațiile lor pentru construirea aspectelor canonice ale structurii anticorpilor sunt descrise în literatură. Structurile subunității și configurațiile tridimensionale ale diferitelor clase de imunoglobuline sunt bine cunoscute în domeniu. Pentru o revizuire a structurii anticorpilor, vezi Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow ș.a., 1988.

CDR3 al lanțului ușor și, în special, CDR3 al lanțului greu pot constitui cei mai importanți determinanți în legarea antigenului în regiunile variabile ale lanțului ușor și greu. În unele construite de anticorpi, lanțul greu CDR3 pare să constituie zona majoră de contact dintre antigen și anticorp. Schemele de selecție *in vitro* în care se variază numai CDR3 pot fi utilizate pentru a varia proprietățile de legare ale unui anticorp, sau pentru a determina ce resturi contribuie la legarea unui antigen. Prin urmare, CDR3 este de obicei cea mai mare sursă de diversitate moleculară din partea de legare a anticorpilor. H3, de exemplu, poate fi la fel de scurt ca două resturi de aminoacizi, sau mai mare de 26 de aminoacizi.

Într-un anticorp sau o imunoglobulină clasică de lungime completă, fiecare lanț ușor (L) este legat de un lanț greu (H) printr-o legătură disulfurică covalentă, în timp ce cele două lanțuri H sunt legate între ele printr-una, sau mai multe legături disulfurice, în funcție de izotipul lanțului H. Domeniul CH cel mai apropiat de VH este de obicei desemnat CH1. Domeniile constante ("C") nu sunt implicate direct în legarea antigenului, dar prezintă diferite funcții efectoare, cum ar fi, citotoxicitatea dependentă de anticorpi, mediată de celule și activarea complementului. Regiunea Fc a unui anticorp este cuprinsă în domeniile constante ale lanțului greu și este capabilă, de exemplu, să interacționeze cu receptori Fc localizați pe suprafața celulei.

Secvența genelor de anticorpi după asamblare și mutație somatică este foarte variată și se estimează că aceste gene variate codifică 10^{10} diferite molecule de anticorpi (Immunoglobulin Genes, ed. a 2-a, eds. Jonio ș.a., Academic Press, San Diego, CA, 1995). În consecință, sistemul imunitar oferă un repertoriu de imunoglobuline. Termenul "repertoriu" se referă la cel puțin o secvență de nucleotide derivată total sau parțial din cel puțin o secvență care codifică cel puțin o imunoglobulină. Secvența(e) poate(pot) fi generată(e) prin rearanjare *in vivo* a segmentelor V, D și J ale lanțurilor grele și ale segmentelor V și J ale lanțurilor ușoare. Alternativ, secvența(e) poate(pot) fi generată(e) dintr-o celulă ca răspuns la care are loc rearanjarea, de ex., stimulare *in vitro*. Alternativ, o parte sau toată(e) secvența(e) pot fi obținute prin splitare ADN, sinteza nucleotidelor, mutageneză și alte metode, vezi, de ex., brevetul U.S. 5.565.332. Un repertoriu poate include doar o secvență, sau poate include o multitudine de secvențe, inclusiv cele dintr-o colecție diversă genetic.

Termenul "porțiune Fc" sau "monomer Fc" înseamnă în legătură cu această invenție o polipeptidă care cuprinde cel puțin un domeniu care are funcția unui domeniu CH2 și cel puțin un domeniu care are funcția unui domeniu CH3 al unei molecule de imunoglobulină. După cum reiese din termenul "monomer Fc", polipeptida care cuprinde acele domenii CH este un "monomer polipeptidic". Un monomer Fc poate fi o polipeptidă care cuprinde cel puțin un fragment din regiunea constantă a unei imunoglobuline, excluzând primul domeniu constant al imunoglobulinei din lanțul greu (CH1), dar menținând cel puțin o parte funcțională a unui domeniu CH2 și o parte funcțională a un domeniu CH3, în

care domeniul CH2 este amino terminal la domeniul CH3. Într-un aspect preferat al acestei definiții, un monomer Fc poate fi o regiune constantă polipeptidică care cuprinde o porțiune din regiunea balama Ig-Fc, o regiune CH2 și o regiune CH3, în care regiunea balama este amino terminală la domeniul CH2. Se are în vedere că regiunea balamalei din prezenta invenție promovează dimerizarea. Asemenea molecule de polipeptidă Fc pot fi obținute prin digestia cu papaină a unei regiuni de imunoglobuline (desigur rezultând un dimer a două polipeptide Fc), de exemplu, fără limitare. Într-un alt aspect al acestei definiții, un monomer Fc poate fi o regiune polipeptidică care cuprinde o porțiune dintr-o regiune CH2 și o regiune CH3. Asemenea molecule de polipeptidă Fc pot fi obținute prin digestia cu pepsină a unei molecule de imunoglobulină, de exemplu și fără limitare. Într-un exemplu de realizare, secvența polipeptidică a unui monomer Fc este substanțial similară cu o secvență polipeptidică Fc a: unei IgG₁ regiunea Fc, unei IgG₂ regiunea Fc, unei IgG₃ regiunea Fc, unei IgG₄ regiunea Fc, unei IgM regiunea Fc, unei IgA regiunea Fc, unei IgD regiunea Fc și unei IgE regiunea Fc. (Vezi, de ex., Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). Deoarece există o oarecare variație între imunoglobuline și numai pentru claritate, monomerul Fc se referă la ultimele două domenii ale imunoglobulinei din regiunea constantă a lanțului greu ale IgA, IgD și IgG și ultimele trei domenii ale imunoglobulinei din regiune constantă a lanțului greu ale IgE și IgM. După cum s-a menționat, monomerul Fc poate include, de asemenea, balamaua flexibilă N-terminală la aceste domenii. Pentru IgA și IgM, monomerul Fc poate include lanțul J. Pentru IgG, porțiunea Fc cuprinde domeniile de imunoglobulină CH2 și CH3 și balamaua dintre primele două domenii și CH2. Deși limitele porțiunii Fc pot varia, un exemplu pentru o porțiune Fc a lanțului greu de IgG umană care cuprinde o balama funcțională, domeniul CH2 și CH3 poate fi definit, de ex., să cuprindă resturile D231 (din domeniul balama - corespunzând lui D234 din Tabelul 1 de mai jos) până la P476, respectiv L476 (pentru IgG₄) de la capătul carboxil-terminal al domeniului CH3, în care numerotarea este conform Kabat. Cele două porțiuni Fc sau monomeri Fc, care sunt fuzionați unul cu celălalt prin intermediul unui linker peptidic definesc al treilea domeniu al constructului de anticorp conform invenției, care poate fi, de asemenea, definit ca domeniu scFc.

Într-un exemplu de realizare a invenției se are în vedere că un domeniu scFc așa cum este dezvăluit aici, respectiv monomerii Fc fuzionați unul cu altul să fie cuprinși numai în al treilea domeniu al constructului de anticorp.

În conformitate cu prezenta invenție, o regiune balama IgG poate fi identificată prin analogie folosind numerotarea Kabat așa cum este prezentată în Tabelul 1. În conformitate cu cele de mai sus, se are în vedere că un domeniu/regiune balama din prezenta invenție să cuprindă resturile de aminoacizi. corespunzătoare IgG₁ secvența de la D234 la P243 conform numerotării Kabat. De asemenea, se are în vedere că un domeniu/regiune balama din prezenta invenție cuprinde sau constă din secvența balama IgG₁ DKTHTCPPCP (SECV ID NR: 99) (care corespunde întinderii D234 la P243 așa cum este prezentat în Tabelul 1 de mai jos - variațiile secvenței menționate sunt de asemenea avute în vedere, cu condiția ca regiunea balamalei să promoveze în continuare dimerizarea). Într-un exemplu de realizare preferat al invenției, situsul de glicozilare de la poziția Kabat 314 a domeniilor CH2 din al treilea domeniu al constructului de anticorp este îndepărtat printr-o substituție N314X, în care X este orice aminoacid excluzând Q. Substituția menționată este de preferință o substituție N314G. Într-un exemplu de realizare mai preferat, domeniul CH2 menționat cuprinde, în plus, următoarele substituții (poziție conform Kabat): V321C și R309C (aceste substituții introduc puntea disulfură de cisteină intra-domeniu la pozițiile Kabat 309 și 321).

Se are în vedere, de asemenea, că al treilea domeniu al constructului de anticorpi conform invenției cuprinde, sau constă într-un ordin amino la carboxil: DKTHTCPPCP (SECV ID NR: 99) (adică balama) -CH2-CH3-linker- DKTHTCPPCP (SECV ID NR: 99) (adică balama) -CH2-CH3. Linkerul peptidic al constructului de anticorp menționat anterior este într-un exemplu de realizare preferat caracterizat prin secvența de aminoacizi Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, adică Gly₄Ser (SECV ID NR: 1), sau polimerii acesteia, adică (Gly₄Ser)_x, unde x este un număr întreg de 5 sau mai mare (de ex., 5, 6, 7, 8, etc., sau mai mare), 6 fiind preferat ((Gly₄Ser)₆). Constructul menționat mai poate cuprinde substituțiile N314X menționate anterior, de preferință N314G și/sau substituțiile suplimentare V321C și R309C. Într-un exemplu de realizare preferat al constructelor de anticorpi ale invenției, așa cum s-a definit aici anterior, se are în vedere ca cel de-al doilea domeniu să se lege la un epitop extracelular al omului și/sau al lanțului *Macaca* CD3ε.

Tabelul 1: Numerotare Kabat a resturilor de aminoacizi a regiunii balama

Numerotare IMGT pentru balama	Translație aminoacid IgG1	Numerotare 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

În alte exemple de realizare ale prezentei invenții, domeniul/regiunea balama cuprinde, sau constă din secvența balama subtip IgG2 ERKCCVECPPCP (SECV ID NR: 100), secvența balama subtip IgG3 ELKTPLDTTHTCPRCP (SECV ID NR: 101) sau ELKTPLGDTTHTCPRCP (SECV ID NR: 103), și/sau secvența balama subtip IgG4 ESKYGPPCPSCP (SECV ID NR: 102). Secvența balama subtipului IgG1 poate fi următoarea: EPKSCDKTHTCPPCP (așa cum se arată în Tabelul 1 și SECV ID NR: 104). Aceste regiuni de balama de miez sunt astfel avute în vedere, de asemenea, în contextul prezentei invenții.

Locația și secvența domeniului IgG CH2 și IgG CD3 pot fi identificate prin analogie folosind numerotarea Kabat, așa cum este prezentată în Tabelul 2:

Tabelul 2: Numerotarea Kabat a resturilor de aminoacizi a IgG regiunea CH2 și CH3

Subtip IgG	Translație CH2 aa	Numerotare Kabat CH2	Translație CH3 aa	Numerotare Kabat CH3
IgG ₁	APE...KAK	244...360	GQP...PGK	361...478
IgG ₂	APP...KTK	244...360	GQP...PGK	361...478
IgG ₃	APE...KTK	244...360	GQP...PGK	361...478
IgG ₄	APE...KAK	244...360	GQP...LGK	361...478

Într-un exemplu de realizare al invenției, resturile de aminoacizi boldate evidențiate în domeniul CH3 al primului sau ambilor monomeri Fc sunt șterse.

Linkerul peptidic, prin care monomerii polipeptidici ("porțiunea Fc" sau "monomerul Fc") din al treilea domeniu sunt fuzionați unul cu celălalt, cuprinde de preferință cel puțin 25 de resturi de aminoacizi (25, 26, 27, 28, 29, 30, etc.). Mai preferabil, acest linker peptidic cuprinde cel puțin 30 de resturi de aminoacizi (30, 31, 32, 33, 34, 35, etc.). De asemenea, este de preferat ca linkerul să cuprindă până la 40 de resturi de aminoacizi, mai preferabil până la 35 de resturi de aminoacizi, cel mai preferabil exact 30 de resturi de aminoacizi. Un exemplu de realizare preferat al unui astfel de linker peptidic este caracterizat prin secvența de aminoacizi Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, adică Gly₄Ser (SECV ID NR: 1), sau polimerii acestora, adică (Gly₄Ser)_x, unde x este un număr întreg de 5, sau mai mare (de ex., 6, 7 sau 8). De preferință, numărul întreg este 6 sau 7, mai preferabil numărul întreg este 6.

În cazul în care un linker este utilizat pentru a fuziona primul domeniu cu al doilea domeniu, sau primul sau al doilea domeniu cu al treilea domeniu, acest linker are, de preferință, o lungime și o secvență suficiente pentru a se asigura că fiecare dintre primul și al doilea domeniu poate, independent unul de altul, să își păstreze specificitățile de legare diferențiale. Pentru linkerii peptidici care conectează cel puțin două domenii de legare (sau două domenii variabile) din Constructul de anticorp conform invenției, sunt preferați acei linkerii peptidici care cuprind doar un număr mic de resturi de aminoacizi, de ex., 12 reziduuri de aminoacizi sau mai puțin. Astfel, linkerii peptidici cu 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 sau 5 resturi de aminoacizi sunt preferați. Un linker peptidic avut în vedere cu mai puțin de 5 aminoacizi cuprinde 4, 3, 2 sau un aminoacid(i), în care linkerii bogați în Gly sunt preferați. Un exemplu de realizare preferat al linkerului peptidic pentru o fuziune a primului și celui de al doilea domeniu este descrisă în SECV ID NR: 1. Un exemplu de realizare preferat al linkerului, al linkerului peptidic pentru fuzionarea celui de-al doilea și celui de al treilea domeniu este un linker (Gly)₄, numit și G₄-linker.

Un aminoacid "singur" preferat în mod special în contextul unuia dintre "linkerii peptidici" descriși anterior este Gly. În consecință, respectivul linker peptidic poate consta din un singur aminoacid Gly. Într-un exemplu de realizare preferat al invenției, un linker peptidic este caracterizat prin secvența de aminoacizi Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, adică Gly₄Ser (SECV ID NR: 1), sau polimerii acestora, adică (Gly₄Ser)_x, unde x este un număr întreg de 1, sau mai mare (de ex., 2 sau 3). Linkerii preferați sunt descriși în SECV ID NR: 1 până la 12. Caracteristicile linkerului peptidic menționat, care cuprind absența promovării structurilor secundare, sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise de ex., în Dall'Acqua ș.a., (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle ș.a., (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) și Raag și Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Linkerii peptidici care, în plus, nu promovează nicio structură secundară sunt preferați. Legătura dintre domeniile menționate unul cu altul poate fi furnizată, de ex., prin inginerie genetică, așa cum este descris în exemple. Metodele de preparare a constructelor bispecifice cu un singur lanț fuzionate și legate operativ și de exprimare a acestora în celule, sau bacterii de mamifere sunt binecunoscute în domeniu (de ex., WO 99/54440 sau Sambrook ș.a., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Într-un exemplu de realizare preferat a constructului de anticorpi sau a prezentei invenții, primul și al doilea domeniu formează un construct de anticorp într-un format selectat din grupul care constă din (scFv)₂, mAb cu un singur domeniu scFv și oligomerii oricăreia dintre aceste formate.

În conformitate cu un exemplu de realizare preferat în mod special, și așa cum este documentat în exemplele anexate, primul și al doilea domeniu al constructului de anticorp conform invenției este un "construct de anticorp bispecific cu un singur lanț", mai preferabil un "un singur lanț Fv" bispecific (scFv). Deși cele două domenii ale fragmentului Fv, VL și VH, sunt codificate de gene separate, ele pot fi unite, folosind metode recombinante, printr-un linker sintetic - așa cum s-a descris anterior - care le permite să fie făcute ca un singur lanț proteic în care regiunile VL și VH se împerechează pentru a forma o moleculă monovalentă; vezi de ex., Huston ș.a. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Aceste fragmente de anticorpi sunt obținute utilizând tehnici convenționale cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu, iar fragmentele sunt evaluate pentru funcție în același mod ca și anticorpii întregi sau de lungime completă. Un fragment variabil cu un singur lanț (scFv) este, prin urmare, o proteină de fuziune a regiunii variabile a lanțului greu (VH) și a lanțului ușor (VL) al imunoglobulinelor, de obicei conectată cu o peptidă linker scurtă de aproximativ zece până la aproximativ 25 de aminoacizi, de preferință aproximativ 15 până la 20 de aminoacizi. Linkerul este de obicei bogat în glicină pentru flexibilitate, precum și serină sau treonină pentru solubilitate și poate conecta fie capătul N-terminal al VH cu capătul C-terminal al VL, fie *vice versa*. Această proteină păstrează specificitatea imunoglobulinei originale, în ciuda eliminării regiunilor constante și introducerii linkerului.

Constructele de anticorpi bispecifice cu un singur lanț sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise în WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kiprianov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Tehnicile descrise pentru producerea de anticorpi cu un singur lanț (vezi, *printre altele*, brevetul US 4.946.778, Kontermann și Dübel (2010), *loc. cit.* și Little (2009), *loc. cit.*) pot fi adaptate pentru a produce constructe de anticorpi cu lanț unic care recunosc în mod specific (o) țintă(e) aleasă(e).

Fragmente variabile bivalente (numite și divalente), sau bispecifice cu un singur lanț (bi-scFvs sau di-scFvs având formatul (scFv)₂ pot fi realizate prin legarea a două molecule scFv (de ex., cu linkeri așa cum s-a descris anterior). Dacă aceste două molecule scFv au aceeași specificitate de legare, molecula (scFv)₂ rezultată se va numi de preferință bivalentă (adică are două valențe pentru același epitop țintă). Dacă cele două molecule scFv au specificități de legare diferite, molecula (scFv)₂ rezultată va fi de preferință numită bispecifică. Legarea poate fi realizată prin producerea unui singur lanț peptidic cu două regiuni VH și două regiuni VL, producând scFvs tandem (vezi de ex., Kufer P. ș.a., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). O altă posibilitate este crearea de molecule scFv cu peptide de legătură care sunt prea scurte pentru ca cele două regiuni variabile să se plieze împreună (de ex., aproximativ cinci aminoacizi), forțând scFvs să dimerizeze. Acest tip este cunoscut sub numele de diacorpi (vezi de ex., Hollinger, Philipp ș.a., (iulie 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

În conformitate cu această invenție, fie primul, al doilea, fie primul și al doilea domeniu pot cuprinde un singur anticorp domeniu, respectiv domeniul variabil, sau cel puțin CDRs ale unui anticorp cu un singur domeniu. Anticorpii cu un singur domeniu cuprind doar un domeniu variabil de anticorp (monomeric) care este capabil să se lege selectiv la un antigen specific, independent de alte regiuni, sau domenii V. Primii anticorpi cu un singur domeniu au fost obținuți din anticorpi cu lanț greu găsiți la camelide, iar aceștia se numesc fragmente V_HH. Peștii cartilaginoși au, de asemenea, anticorpi cu lanț greu (IgNAR) din care se pot obține anticorpii cu un singur domeniu numiți fragmente V_{NAR}. O abordare alternativă este împărțirea domeniilor variabile dimerice de imunoglobuline comune, de ex., de la oameni, sau rozătoare în monomeri, obținând astfel VH, sau VL ca un singur domeniu Ab. Deși majoritatea

cercetărilor privind anticorpii cu un singur domeniu se bazează în prezent pe domenii variabile ale lanțului greu, s-a demonstrat, de asemenea, că nanocorpii derivați din lanțuri ușoare se leagă în mod specific la epitopii țintă. Exemplele de anticorpi cu un singur domeniu sunt numite sdAb, nanocorpi sau anticorpi cu un singur domeniu variabil.

Un (mAb cu un singur domeniu)₂ este, prin urmare, un construct de anticorp monoclonal compus din (cel puțin) doi anticorpi monoclonali cu un singur domeniu, care sunt selectați individual din grupul care cuprinde V_H, V_L, V_{HH} și V_{NAR}. Linkerul este de preferință sub forma unui linker peptidic. În mod similar, un "mAb cu un singur domeniu scFv" este un construct de anticorp monoclonal compus din cel puțin un anticorp cu un singur domeniu așa cum s-a descris anterior și o moleculă scFv așa cum s-a descris anterior. Din nou, linkerul este de preferință sub forma unui linker peptidic.

Dacă un construct de anticorp concurează sau nu pentru legarea cu un alt construct de anticorp dat se poate măsura într-un test competitiv, cum ar fi, un ELISA competitiv, sau un test competitiv pe bază de celule. Se pot utiliza, de asemenea, microparticule (granule) cuplate cu avidină. Similar cu o placă ELISA acoperită cu avidină, atunci când reacționează cu o proteină biotinitată, fiecare dintre aceste granule poate fi utilizată ca substrat pe care poate fi efectuat un test. Antigenul este acoperit pe o granulă și apoi preacoperit cu primul anticorp. Se adaugă al doilea anticorp și se determină orice legare suplimentară. Mijloacele posibile pentru citire includ citometria în flux.

Celulele T sau limfocitele T sunt un tip de limfocite (un tip de globule albe din sânge) care joacă un rol central în imunitatea mediată de celule. Există mai multe subseturi de celule T, fiecare cu o funcție distinctă. Celulele T pot fi distinse de alte limfocite, cum ar fi, celulele B și celulele NK, prin prezența unui receptor de celule T (TCR) pe suprafața celulei. TCR este responsabil pentru recunoașterea antigenilor legați de moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC) și este compus din două lanțuri proteice diferite. În 95% dintre celulele T, TCR constă dintr-un lanț alfa (α) și beta (β). Când TCR se angajează cu peptida antigenică și MHC (complex peptidă/MHC), limfocita T este activată printr-o serie de evenimente biochimice mediate de enzime asociate, co-receptori, molecule adaptatoare specializate și factori de transcripție activați sau eliberați.

Complexul receptor CD3 este un complex proteic și este compus din patru lanțuri. La mamifere, complexul conține un lanț CD3γ (gamma), un lanț CD3δ (delta) și două lanțuri CD3ε (epsilon). Aceste lanțuri se asociază cu receptorul celulelor T (TCR) și așa-numitul lanț ζ (zeta) pentru a forma complexul receptor al celulelor T CD3 și pentru a genera un semnal de activare în limfocitele T. Lanțurile CD3γ (gamma), CD3δ (delta) și CD3ε (epsilon) sunt proteine de suprafață celulară înrudite din superfamilia de imunoglobuline care conține un singur domeniu de imunoglobulină extracelular. Cozile intracelulare ale moleculelor CD3 conțin un singur motiv conservat cunoscut sub numele de motiv de activare a unui imunoreceptor pe bază de tirozină, sau pe scurt ITAM, care este esențial pentru capacitatea de semnalizare a TCR. Molecula epsilon CD3 este o polipeptidă care la om este codificată de gena *CD3E* care rezidă pe cromozomul 11. Epitopul cel mai preferat al CD3 epsilon este cuprins în resturile de aminoacizi 1-27 ale domeniului extracelular CD3 epsilon uman. Se are în vedere că constructele de anticorpi conform prezentei invenții prezintă în mod obișnuit și avantajos o activare mai puțin nespecifică a celulelor T, ceea ce nu este dorit în imunoterapia specifică. Acest lucru se traduce printr-un risc redus de efecte secundare.

Liza redirectionată a celulelor țintă prin recrutarea celulelor T de către un Constructul de anticorp multispecific, cel puțin bispecific, implică formarea sinapselor citolitice și eliberarea de perforină și granzime. Celulele T angajate sunt capabile de liza celulelor țintă în serie și nu sunt afectate de mecanismele de evadare imună care interferează cu procesarea și prezentarea antigenului peptidic sau diferențierea celulelor T clonale; vezi, de ex., WO 2007/042261.

Citotoxicitatea mediată de constructele de anticorpi ale invenției poate fi măsurată în diferite moduri. Celulele efectoare pot fi de ex., celule T CD8 pozitive stimulate (umane), sau celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) nestimulate (umane). Dacă celulele țintă sunt de origine de macac, sau exprimă, sau sunt transfectate cu BCMA de macac care este legat de primul domeniu, celulele efectoare ar trebui, de asemenea, să fie de origine de macac, cum ar fi, o linie de celule T de macac, de ex., 4119LnPx. Celulele țintă ar trebui să exprime (cel puțin domeniul extracelular al) BCMA, de ex., BCMA uman sau macac. Celulele țintă pot fi o linie celulară (cum ar fi, CHO) care este transfectată stabil sau tranzitoriu cu BCMA, de ex., BCMA uman sau de macac. Alternativ, celulele țintă pot fi o linie celulară expresoare naturală pozitivă BCMA, cum ar fi, linia celulară de mielom multiplu uman L363, sau NCI-H929. De obicei valorile EC₅₀ sunt de așteptat să fie mai mici cu liniile celulare țintă, care exprimă niveluri mai mari de BCMA pe suprafața celulei. Raportul efector la celula țintă (E:T) este de obicei de aproximativ 10:1, dar poate varia. Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecifici BCMAxCD3 poate fi măsurată într-un test de eliberare a ⁵¹Cr (timp de incubare de aproximativ 18 ore), sau într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS (timp de incubare de aproximativ 48 de ore). Sunt de asemenea posibile modificări ale timpului de incubare a testului (reacție citotoxică). Alte metode de măsurare a citotoxicității sunt binecunoscute persoanei de specialitate și cuprind teste MTT sau MTS,

teste pe bază de ATP incluzând teste bioluminiscente, testul sulforodamină B (SRB), testul WST, testul clonogenic și tehnologia ECIS.

Activitatea citotoxică mediată de constructele de anticorpi bispecfici BCMAxCD3 din prezenta invenție este măsurată de preferință într-un test de citotoxicitate pe bază de celule. Poate fi măsurat și într-un test de eliberare a ^{51}Cr . Acesta este reprezentat de valoarea EC_{50} , care corespunde jumătății concentrației efective maxime (concentrația constructului de anticorp care induce un răspuns citotoxic la jumătatea distanței dintre linia de bază și maximum). De preferință, valoarea EC_{50} a constructelor de anticorp bispecific BCMAxCD3 este ≤ 5000 pM sau ≤ 4000 pM, mai preferabil ≤ 3000 pM sau ≤ 2000 pM, chiar mai preferabil ≤ 1000 pM sau ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 400 pM sau ≤ 300 pM, chiar mai preferabil ≤ 200 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, chiar mai preferabil ≤ 50 pM, chiar mai preferabil ≤ 20 pM sau ≤ 10 pM, și cel mai preferabil ≤ 5 pM.

Valorile EC_{50} menționate anterior pot fi măsurate în diferite teste. Persoana de specialitate în domeniu este conștientă că o valoare EC_{50} poate fi de așteptat să fie mai mică atunci când sunt utilizate celulele T stimulate/îmbogățite CD8^+ ca celule efectoare, în comparație cu PBMC nestimulate. În plus, se poate aștepta ca valorile EC_{50} să fie mai mici atunci când celulele țintă exprimă un număr mare de BCMA în comparație cu un șobolan cu expresie țintă scăzută. De exemplu, atunci când sunt utilizate celulele T umane, stimulate/îmbogățite CD8^+ ca celule efectoare (și sunt utilizate ca celule țintă fie celule transfectate BCMA, cum ar fi, celulele CHO, fie linii de celule umane pozitive BCMA), valoarea EC_{50} a constructului de anticorp bispecific BCMAxCD3 este de preferință ≤ 1000 pM, mai preferabil ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 250 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, chiar mai preferabil ≤ 50 pM, chiar mai preferabil ≤ 10 pM, și cel mai preferabil ≤ 5 pM. Când PBMCs umane sunt utilizate ca celule efectoare, valoarea EC_{50} a constructului de anticorp bispecific BCMAxCD3 este de preferință ≤ 5000 pM sau ≤ 4000 pM (în special atunci când celulele țintă sunt linii celulare umane pozitive BCMA), mai preferabil ≤ 2000 pM (în special atunci când celulele țintă sunt celule transfectate BCMA, cum ar fi, celule CHO), mai preferabil ≤ 1000 pM sau ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 200 pM, chiar mai preferabil ≤ 150 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, și cel mai preferabil ≤ 50 pM, sau mai mică. Când o linie de celule T de macac, cum ar fi, LnPx4119, este utilizată ca celule efectoare și o linie de celule transfectate de macac, cum ar fi, celulele CHO, este utilizată ca linie de celule țintă, valoarea EC_{50} a constructului de anticorp bispecific BCMAxCD3 este de preferință ≤ 2000 pM sau ≤ 1500 pM, mai preferabil ≤ 1000 pM sau ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 300 pM sau ≤ 250 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, și cel mai preferabil ≤ 50 pM.

De preferință, constructele de anticorpi bispecfici BCMAxCD3 din prezenta invenție nu induc/mediază liza, sau nu induc/mediază în esență liza celulelor negative BCMA, cum ar fi, celulele CHO, sau celulele HL60, MES-SA sau SNU-16. Termenul "nu induc liza", "nu induc în esență liza", "nu mediază liza", sau "nu mediază în mod esențial liza" înseamnă că un Constructul de anticorp conform prezentei invenții nu induce, sau nu mediază liza mai mult de de 30 %, preferabil nu mai mult de 20%, mai preferabil nu mai mult de 10%, particular preferat nu mai mult de 9%, 8%, 7%, 6% sau 5% din celule negative BCMA, prin care liza unei linii celulare umane pozitive BCMA este setat să fie 100%. Acest lucru se aplică de obicei pentru concentrații ale constructului de anticorpi de până la 500 nM. Persoana de specialitate în domeniu știe cum să măsoare liza celulară fără altă dificultate. Mai mult, prezenta specificație învață instrucțiuni specifice despre cum să se măsoare liza celulară.

Diferența de activitate citotoxică dintre izoforma monomerică și dimerică a constructelor individuale de anticorpi bispecfici BCMAxCD3 este denumită "decălaj de potență". Acest decălaj de potență se poate calcula, de ex., ca raport între valorile EC_{50} ale formei monomerice și dimerice a moleculei. Decălajele de potență ale constructelor de anticorpi bispecfici BCMAxCD3 din prezenta invenție sunt de preferință ≤ 5 , mai preferabil ≤ 4 , chiar mai preferabil ≤ 3 , chiar mai preferabil ≤ 2 și cel mai preferabil ≤ 1 .

Primul și/sau cel de-al doilea (sau orice alt domeniu) de legare al constructului de anticorpi conform invenției este/sunt, de preferință, specfici încrucișați pentru membrii ordinului mamiferelor de primat. Domeniile de legare la CD3 specifice între specii sunt, de ex., descrise în WO 2008/119567. Conform unui exemplu de realizare, primul și/sau al doilea domeniu de legare, pe lângă legarea la BCMA uman și, respectiv, la CD3 uman, se vor lega, de asemenea, la BCMA/CD3 de primat incluzând (dar fără a se limita la) primat din lumea nouă (cum ar fi, *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedip* sau *Saimiri sciureus*), primat din lumea veche (cum ar fi, babuini și macaci), giboni și *homininae* non-umane.

Într-un exemplu de realizare a constructului de anticorpi conform invenției, primul domeniu se leagă de BCMA uman și se leagă în continuare la BCMA de macac, cum ar fi, BCMA de *Macaca fascicularis*, și mai preferabil, la BCMA de macac exprimat pe suprafața celulelor de macac. Afinitatea primului domeniu pentru BCMA, de preferință pentru BCMA uman, este de preferință ≤ 100 nM sau ≤ 50 nM, mai preferabil ≤ 25 nM sau ≤ 20 nM, mai preferabil ≤ 15 nM sau ≤ 10 nM, chiar mai preferabil ≤ 5 nM, chiar mai preferabil $\leq 2,5$ nM sau ≤ 2 nM, chiar mai preferabil ≤ 1 nM, chiar mai preferabil $\leq 0,6$ nM, chiar mai preferabil $\leq 0,5$ nM, și cel mai preferabil $\leq 0,4$ nM. Afinitatea poate fi măsurată, de ex., într-un test BIAcore, sau într-un test Scatchard. Alte metode de determinare a afinității sunt, de asemenea,

binecunoscute persoanei de specialitate. Afinitatea primului domeniu pentru BCMA de macac este de preferință ≤ 15 nM, mai preferabil ≤ 10 nM, chiar mai preferabil ≤ 5 nM, chiar mai preferabil ≤ 1 nM, chiar mai preferabil $< 0,5$ nM, chiar mai preferabil $\leq 0,1$ nM și cel mai preferabil $\leq 0,05$ nM sau chiar $\leq 0,01$ nM

De preferință, decalajul de afinitate al constructelor de anticorpi conform invenției pentru legarea macacului BCMA față de BCMA uman [ma BCMA: hu BCMA] (după cum este determinat, de ex., prin analiza BiaCore, sau prin analiza Scatchard) este < 100 , de preferință < 20 , mai preferabil < 15 , încă mai preferabil < 10 , chiar mai preferabil < 8 , mai preferabil < 6 și cel mai preferabil < 2 . Intervalele preferate pentru intervalul de afinitate al constructelor de anticorpi conform invenției pentru legarea BCMA de macac față de BCMA uman sunt între 0,1 și 20, mai preferabil între 0,2 și 10, chiar mai preferabil între 0,3 și 6, chiar mai preferabil între 0,5 și 3, sau între 0,5 și 2,5 și cel mai preferabil între 0,5 și 2 sau între 0,6 și 2.

Al doilea domeniu al constructului de anticorpi conform invenției se leagă la CD3 epsilon uman și/sau la CD3 epsilon de *Macaca*. Într-un exemplu de realizare preferat, al doilea domeniu se leagă în plus la CD3 epsilon de *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* sau *Saimiri sciureus*. *Callithrix jacchus* și *Saguinus oedipus* sunt ambele primate din lumea nouă care aparține familiei de *Callitrichidae*, în timp ce *Saimiri sciureus* este o primată de lume nouă care aparține familiei de *Cebidae*.

Pentru Constructul de anticorp din prezenta invenție este de preferat ca cel de-al doilea domeniu care se leagă la un epitop extracelular al omului și/sau al lanțului epsilon CD3 de *Macaca* să cuprindă o regiune VL care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate dintre:

(a) CDR-L1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 27 din WO 2008/119567, CDR-L2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 28 din WO 2008/119567 și CDR-L3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 29 din WO 2008/119567;

(b) CDR-L1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 117 din WO 2008/119567, CDR-L2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 118 din WO 2008/119567 și CDR-L3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 119 din WO 2008/119567; și

(c) CDR-L1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 153 din WO 2008/119567, CDR-L2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 154 din WO 2008/119567 și CDR-L3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 155 din WO 2008/119567.

Într-un exemplu de realizare preferat suplimentar al constructului de anticorpi din prezenta invenție, al doilea domeniu care se leagă la un epitop extracelular al omului și/sau al lanțului epsilon CD3 de *Macaca* să cuprindă o regiune VH care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 selectate dintre:

(a) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 12 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 13 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 14 din WO 2008/119567;

(b) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 30 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 31 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 32 din WO 2008/119567;

(c) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 48 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 49 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 50 din WO 2008/119567;

(d) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 66 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 67 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 68 din WO 2008/119567;

(e) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 84 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 85 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 86 din WO 2008/119567;

(f) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 102 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 103 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 104 din WO 2008/119567;

(g) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 120 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 121 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 122 din WO 2008/119567;

(h) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 138 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 139 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 140 din WO 2008/119567;

(i) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 156 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 157 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 158 din WO 2008/119567; și

(j) CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 174 din WO 2008/119567, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 175 din WO 2008/119567 și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 176 din WO 2008/119567.

Într-un exemplu de realizare preferat al construcției de anticorpi conform invenției, cele trei grupuri de VL CDRs descrise anterior sunt combinate cu cele zece grupuri de VH CDRs descrise anterior în al doilea domeniu de legare pentru a forma (30) grupări, fiecare cuprinzând CDR-L 1-3. și CDR-H 1-3.

Este de preferat pentru Constructul de anticorp din prezenta invenție ca cel de-al doilea domeniu care se leagă la CD3 să cuprindă o regiune VL selectată din grupul care constă din cele descrise în SECV ID NR: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 93, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 sau 183 din WO 2008/119567 sau așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 13.

De asemenea, este de preferat ca cel de-al doilea domeniu care se leagă la CD3 să cuprindă o regiune VH selectată din grupul care constă din cele descrise în SECV ID NR: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 sau 181 din WO 2008/119567 sau așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 14.

Mai preferabil, constructul de anticorp din prezenta invenție este caracterizat printr-un al doilea domeniu care se leagă la CD3 care cuprinde o regiune VL și o regiune VH selectată din grupul care constă din:

- (a) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 17 sau 21 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 15 sau 19 din WO 2008/119567;
- (b) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 35 sau 39 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 33 sau 37 din WO 2008/119567;
- (c) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 53 sau 57 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 51 sau 55 din WO 2008/119567;
- (d) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 71 sau 75 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 69 sau 73 din WO 2008/119567;
- (e) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 89 sau 93 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 87 sau 91 din WO 2008/119567;
- (f) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 107 sau 111 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 105 sau 109 din WO 2008/119567;
- (g) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 125 sau 129 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 123 sau 127 din WO 2008/119567;
- (h) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 143 sau 147 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 141 sau 145 din WO 2008/119567;
- (i) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 161 sau 165 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 159 sau 163 din WO 2008/119567; și
- (j) o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 179 sau 183 din WO 2008/119567 și o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 177 sau 181 din WO 2008/119567.

De asemenea, preferat în legătură cu Constructul de anticorp din prezenta invenție este un al doilea domeniu care se leagă la CD3 care cuprinde o regiune VL așa cum este descrisă în SECV ID NR: 13 și o regiune VH așa cum este descrisă în SECV ID NR: 14.

Conform unui exemplu de realizare preferat al constructului de anticorpi din prezenta invenție, primul și/sau al doilea domeniu au următorul format: Perechile de regiuni VH și regiuni VL sunt în formatul unui anticorp cu un singur lanț (scFv). Regiunile VH și VL sunt aranjate în ordinea VH-VL sau VL-VH. Este de preferat ca regiunea VH să fie poziționată la N-terminal al unei secvențe linker, iar regiunea VL să fie poziționată la C-terminal al secvenței linker.

Un exemplu de realizare preferat al constructului de anticorp descris anterior din prezenta invenție este caracterizat prin al doilea domeniu care se leagă la CD3 care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 sau 187 din WO 2008/119567 sau așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 15.

Se are în vedere, de asemenea, că primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției să cuprindă o regiune VL care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 și o regiune VH care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-3 selectate din grupul care constă din:

- (a) CDR-L1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 48, CDR-L2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 49, CDR-L3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 50, CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 45, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 46, și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 47;
- (b) CDR-L1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 66, CDR-L2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 67, CDR-L3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 68, CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 63, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 64, și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 65; și
- (c) CDR-L1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 84, CDR-L2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 85, CDR-L3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 86, CDR-H1 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 81, CDR-H2 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 82, și CDR-H3 așa cum este ilustrat în SECV ID NR: 83.

În plus, este avut în vedere că primul domeniu de legare al constructului de anticorpi conform invenției cuprinde o regiune VH și o regiune VL selectate din grupul care constă din:

(a) o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 51 și o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 52;

5 (b) o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 57 și o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 58;

(c) o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 69 și o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 70;

10 (d) o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 75 și o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 76;

(e) o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 87 și o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 88; și

(f) o regiune VH așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 93 și o regiune VL așa cum este ilustrată în SECV ID NR: 94.

15 În plus, este avut în vedere că primul domeniu de legare al constructului de anticorpi conform invenției cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din cei descriși în SECV ID NR: 53, 59, 71, 77, 89 sau 95.

Modificările covalente ale constructelor de anticorpi sunt, de asemenea, incluse în scopul acestei invenții și sunt, în general, dar nu întotdeauna, efectuate post-translațional. De exemplu, mai multe tipuri de modificări covalente ale constructului de anticorpi sunt introduse în moleculă prin reacția resturilor specifice de aminoacizi ale constructului de anticorpi cu un agent organic de derivatizare care este capabil să reacționeze cu lanțurile laterale selectate, sau cu resturile N- sau C-terminale.

20 Resturile de cisteinil reacționează cel mai frecvent cu α -haloacetații (și aminele corespunzătoare), cum ar fi, acidul cloroacetic, sau cloracetamida, pentru a da derivați de carboximetil, sau carboxiamidometil. Resturile cisteinil sunt, de asemenea, derivatizate prin reacția cu bromotrifluoroacetonă, acid α -bromo- β -(5-imidozolil)propionic, cloroacetil fosfat, N-alchilmaleimide, 3-nitro-2-piridil disulfură, metil 2-piridil disulfură, p-cloromercuribenzoat, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, sau cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

30 Resturile histidil sunt derivatizate prin reacția cu dietilpirocarbonat la pH 5,5-7,0 deoarece acest agent este relativ specific pentru lanțul lateral histidil. Bromura de para-bromfenacil este, de asemenea, utilă; reacția se efectuează de preferință în cacodilat de sodiu 0,1 M la pH 6,0. Resturile lizinil și amino terminale reacționează cu anhidride de acid succinic, sau cu alte anhidride de acid carboxilic. Derivatizarea cu acești agenți are ca efect inversarea sarcinii resturilor de lizinil. Alți reactivi adecvați pentru derivatizarea resturilor care conțin alfa-amino includ imidoesteri, cum ar fi, metil picolinimidatul; fosfat de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruță; acid trinitrobenzensulfonic; O-metilizouree; 2,4-pentandionă; și reacția catalizată de transaminaze cu glioxilal.

35 Resturile de arginil sunt modificate prin reacția cu unul sau mai mulți reactivi convenționali, printre care fenilglioxal, 2,3-butandionă, 1,2-ciclohexandionă și ninhidrina. Derivatizarea resturilor de arginină necesită ca reacția să fie efectuată în condiții alcaline din cauza pKa ridicat al grupului funcțional guanidină. Mai mult, acești reactivi pot reacționa cu grupările de lizină, precum și cu gruparea epsilon-amino de arginină.

Se poate face modificarea specifică a resturilor de tirozil, cu un interes deosebit în introducerea de marcaje spectrale în resturile de tirozil prin reacția cu compuși aromatici de diazoniu, sau tetranitrometan. Sunt utilizați cel mai frecvent, N-acetilimidazolul și tetranitrometanul pentru a forma specii de O-acetil tirozil și, respectiv, derivați 3-nitro. Resturile de tirozil sunt iodate folosind ^{125}I , sau ^{131}I pentru a prepara proteine marcate pentru utilizare în radioimunotest, metoda cloraminei T descrisă mai sus fiind adecvată.

45 Grupările laterale carboxil (aspartil sau glutamil) sunt modificate selectiv prin reacția cu carbodiimide ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N--R}'$), unde R și R' sunt opțional grupări alchil diferite, cum ar fi, 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimidă, sau 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimidă. Mai mult, resturile de aspartil și glutamil sunt transformate în resturi de asparaginil și glutaminil prin reacția cu ionii de amoniu.

50 Derivatizarea cu agenți bifuncționali este utilă pentru reticularea constructelor de anticorpi din prezenta invenție la o matrice, sau o suprafață suport insolubilă în apă pentru utilizare într-o varietate de metode. Agenții de reticulare utilizați în mod obișnuit includ, de ex., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletan, glutaraldehidă, esteri de N-hidroxisuccinimidă, de ex., esteri cu acid 4-azidosalicilic, imidoesteri homobifuncționali, inclusiv esteri disuccinimidilici, cum ar fi, 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionat) și maleimide bifuncționale, cum ar fi, bis-N-maleimido-1,8-octan. Agenții de derivatizare cum ar fi, metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidatul produc intermediari fotoactivabili care sunt capabili să formeze legături încrucișate în prezența luminii. Alternativ, matricile reactive, insolubile în apă, cum ar fi, carbohidrații activați cu bromură de cianogen și substraturile reactive, așa cum este descris în brevetele

U.S. nr. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; și 4.330.440 sunt folosite pentru imobilizarea proteinelor.

Resturile glutaminil și asparaginil sunt frecvent deamidate la resturile corespunzătoare de glutamil și, respectiv, aspartil. Alternativ, aceste resturi sunt deamidate în condiții ușor acide. Fiecare formă a acestor resturi intră în domeniul de aplicare al acestei invenții.

Alte modificări includ hidroxilarea prolinei și lizinei, fosforilarea grupărilor hidroxil ale resturilor seril sau treonil, metilarea grupărilor α -amino ale lanțurilor laterale de lizină, arginină și histidină (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), acetilarea aminei N-terminale și amidarea oricărei grupări carboxil C-terminale.

Un alt tip de modificare covalentă a constructelor de anticorpi incluse în scopul acestei invenții cuprinde modificarea modelului de glicozilare al proteinei. După cum este cunoscut în domeniu, modelele de glicozilare pot depinde atât de secvența proteinei (de ex., prezența sau absența unor resturi particulare de aminoacizi de glicozilare, discutate mai jos), cât și de celula gazdă, sau organismul în care este produsă proteina. Sistemele de expresie particulare sunt discutate mai jos.

Glicozilarea polipeptidelor este în mod tipic fie legată de N, fie legată de O. N-legat se referă la atașarea fragmentului carbohidrat la lanțul lateral al unui reziduu de asparagină. Secvențele tri-peptidice asparagină-X-serină și asparagină-X-treonină, în care X este orice aminoacid cu excepția prolinei, sunt secvențele de recunoaștere pentru atașarea enzimatică a fragmentului de carbohidrat la lanțul lateral de asparagină. Astfel, prezența oricăreia dintre aceste secvențe tri-peptidă într-o polipeptidă creează un situs potențial de glicozilare. Glicozilarea O-legată se referă la atașarea unuiia dintre zaharurile N-acetilgalactozamină, galactoză sau xiloză, la un hidroxiaminoacid, cel mai frecvent serină sau treonină, deși pot fi utilizate și 5-hidroxi-prolina sau 5-hidroxi-lizina.

Adăugarea situsurilor de glicozilare la constructul de anticorp este realizată în mod convenabil prin modificarea secvenței de aminoacizi astfel încât aceasta să conțină una sau mai multe dintre secvențele tri-peptidice descrise anterior (pentru situsurile de glicozilare N-legate). Modificarea poate fi, de asemenea, realizată prin adăugarea sau substituirea cu unul sau mai multe resturi serină sau treonină la secvența inițială (pentru situsurile de glicozilare O-legate). Pentru ușurință, secvența de aminoacizi a unui construct de anticorp este de preferință modificată prin modificări la nivel de ADN, în special prin mutarea ADN-ului care codifică polipeptida la baze preselecțate astfel încât să fie generați codoni care se vor traduce în aminoacizii doriți.

Un alt mijloc de creștere a numărului de fragmente de carbohidrați de pe constructul de anticorp este prin cuplarea chimică sau enzimatică a glicozidelor la proteină. Aceste proceduri sunt avantajoase prin faptul că nu necesită producerea proteinei într-o celulă gazdă care are capacități de glicozilare pentru glicozilare legată de N și O. În funcție de modul de cuplare utilizat, zahărul (zaharurile) poate fi atașat la (a) arginină și histidină, (b) grupări carboxil libere, (c) grupări sulfhidril libere, cum ar fi, cele ale cisteinei, (d) grupări hidroxil libere, cum ar fi, cele ale serinei, treoninei sau hidroxiprolinei, (e) resturi aromatice, cum ar fi, cele ale fenilalaninei, tirozinei sau triptofanului, sau (f) gruparea amidă a glutaminei. Aceste metode sunt descrise în WO 87/05330, și în Aplin și Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Îndepărtarea fragmentelor carbohidrat prezente pe constructul de anticorp inițial poate fi realizată chimic sau enzimatic. Glicozilarea chimică necesită expunerea proteinei la compusul acid trifluormetansulfonic, sau la un compus echivalent. Acest tratament are ca rezultat scindarea majorității, sau a tuturor zaharurilor, cu excepția zahărului de legătură (N-acetilglucozamină, sau N-acetilgalactozamină), lăsând în același timp polipeptida intactă. Glicozilarea chimică este descrisă de Hakimuddin ș.a., 1987, *Arch. Biochim. Biophys.* 259:52 și prin Edge ș.a., 1981, *Anal. Biochim.* 118:131. Scindarea enzimatică a resturilor de carbohidrați de pe polipeptide poate fi realizată prin utilizarea unei varietăți de endo- și exo-glicozidaze, așa cum este descris de Thotakura ș.a., 1987, *Meth. Enzimol.* 138:350. Glicozilarea la situsurile potențiale de glicozilare poate fi prevenită prin utilizarea compusului tunicamicină așa cum este descris de Duskin ș.a., 1982, *J. Biol. Chim.* 257:3105. Tunicamicina blochează formarea legăturilor proteină-N-glicozidă.

Alte modificări ale constructului de anticorpi sunt de asemenea avute în vedere aici. De exemplu, un alt tip de modificare covalentă a constructului de anticorp cuprinde legarea constructului de anticorp la diferiți polimeri neproteici, incluzând, dar fără a se limita la, diverși polioli, cum ar fi, polietilen glicol, polipropilen glicol, polioxi-alchilen, sau copolimeri de polietilen glicol și polipropilen glicol, în modul stabilit în brevetele U.S. nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 sau 4.179.337. În plus, după cum este cunoscut în domeniu, substituțiile de aminoacizi pot fi făcute în diferite poziții în cadrul constructului de anticorp, de ex., pentru a facilita adăugarea de polimeri precum PEG.

În unele exemple de realizare, modificarea covalentă a constructelor de anticorpi ale invenției cuprinde adăugarea uneia sau mai multor etichete. Gruparea de marcare poate fi cuplată la constructul de anticorp prin intermediul brațelor distanțiere de diferite lungimi pentru a reduce potențialul obstacol

steric. Diferite metode pentru marcarea proteinelor sunt cunoscute în domeniu și pot fi utilizate în realizarea prezentei invenții. Termenul "etichetă" sau "grup de etichetare" se referă la orice etichetă detectabilă. În general, etichetele se încadrează într-o varietate de clase, în funcție de testul în care urmează să fie detectate - următoarele exemple includ, dar nu se limitează la:

- 5 a) etichete izotopice, care pot fi izotopi radioactivi sau grei, cum ar fi, radioizotopi sau radionuclizi (de ex., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)
- b) etichete magnetice (de ex., particule magnetice)
- c) fragmente active redox
- d) coloranți optici (inclusiv, dar fără a se limita la, cromofori, fosfori și fluorofori), cum ar fi, grupări fluorescente (de ex., FITC, rodamină, fosfori de lantanidă), grupări chemiluminiscente și fluorofori care pot fi fie fluori cu "molecule mici", fie fluori proteinici
- 10 e) grupări enzimatică (de ex., peroxidază de hrean, β -galactozidază, luciferază, fosfatază alcalină)
- f) grupări biotinilate
- g) epitopi polipeptidici predeterminați recunoscuți de un raportor secundar (de ex., secvențe de perechi de fermoar de leucină, părți de legare pentru anticorpi secundari, domenii de legare a metalelor, etichete epitop, etc.)
- 15

Prin "etichetă fluorescentă" se înțelege orice moleculă care poate fi detectată *prin intermediul* proprietățile sale fluorescente inerente. Etichetele fluorescente adecvate includ, dar nu se limitează la, fluoresceină, rodamină, tetrametilrodamină, eozină, eritrozină, cumarină, metil-cumarine, piren, verde Malacit, stilben, galben Lucifer, Cascade BlueJ, roșu Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregon, coloranții 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), Cascade Blue, Cascade Yellow și R-ficoeritrină (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamină și roșu Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy 5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Coloranții optici adecvați, inclusiv fluorofori, sunt descriși în Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

- 20 Etichetele fluorescente proteice adecvate includ, de asemenea, dar nu se limitează la, proteină fluorescentă verde, inclusiv o specie Renilla, Ptilosarcus sau Aequorea de GFP (Chalfie ș.a., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Număr de Acces Genbank U55762), proteină fluorescentă albastră (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim ș.a., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteină fluorescentă galbenă îmbunătățită (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferază (Ichiki ș.a., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactozidază (Nolan ș.a., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) și Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, brevetele US nr. 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).
- 30
- 35

- Constructul de anticorp conform invenției poate cuprinde, de asemenea, domenii suplimentare, care sunt, de ex., utile în izolarea moleculei, sau se referă la un profil farmacocinetic adaptat al moleculei. Domeniile utile pentru izolarea unui Constructul de anticorp poate fi selectat dintre motive peptidice, sau fragmente introduse secundar, care pot fi capturate într-o metodă de izolare, de ex., o coloană de izolare. Exemplele de realizare nelimitative ale unor astfel de domenii suplimentare cuprind motive peptidice cunoscute ca Myc-tag, HAT-tag, HA-tag, TAP-tag, GST-tag, domeniul de legare a chitinei (CBD-tag), proteina de legare a maltozei (MBP-tag), Flag-tag, Strep-tag și variante ale acestora (de ex., Strept-tag) și His-tag. Toate constructele de anticorpi dezvăluite aici pot cuprinde un domeniu His-tag, care este în general cunoscut ca o repetare a resturilor His consecutive în secvența de aminoacizi a unei molecule, de preferință din cinci, și mai preferabil din șase resturi His (hexa-histidină). His-tag poate fi localizată de ex., la capătul N- sau C-terminal al constructului de anticorp, de preferință este situat la capătul C-terminal. Cel mai preferabil, o etichetă hexa-histidină (HHHHHH) (SECV ID NR: 16) este legată prin legătură peptidică la capătul C-terminal al constructului de anticorp conform invenției. În plus, un sistem conjugat de PLGA-PEG-PLGA poate fi combinat cu o etichetă de poli-histidină pentru aplicarea cu eliberare susținută și profil farmacocinetic îmbunătățit.
- 40
- 45
- 50

- De asemenea, sunt avute în vedere modificări ale secvenței de aminoacizi ale constructelor de anticorpi descrise aici. De exemplu, poate fi de dorit să se îmbunătățească afinitatea de legare și/sau alte proprietăți biologice ale constructului de anticorp. Variantele secvenței de aminoacizi ale constructelor de anticorpi sunt preparate prin introducerea modificărilor adecvate de nucleotide în constructele de anticorpi acid nucleic, sau prin sinteza peptidelor. Toate modificările secvenței de aminoacizi descrise mai jos ar trebui să aibă ca rezultat un construct de anticorp care păstrează încă activitatea biologică dorită (legare la BCMA și la CD3) a moleculei parentale nemodificate.
- 55

- Termenul "aminoacid" sau "rest de aminoacid" se referă în mod obișnuit la un aminoacid care are definiția recunoscută în domeniu, cum ar fi, un aminoacid selectat din grupul care constă din: alanină (Ala sau A); arginină (Arg sau R); asparagină (Asn sau N); acid aspartic (Asp sau D); cisteină (Cys sau
- 60

C); glutamină (Gln sau Q); acid glutamic (Glu sau E); glicină (Gly sau G); histidină (His sau H); izoleucină (He sau I); leucină (Leu sau L); lizină (Lys sau K); metionină (Met sau M); fenilalanină (Phe sau F); pro lină (Pro sau P); serină (Ser sau S); treonină (Thr sau T); triptofan (Trp sau W); tirozină (Tyr sau Y); și valină (Val sau V), deși aminoacizii modificați, sintetici sau rari pot fi utilizați după cum se dorește. În general, aminoacizii pot fi grupați ca având o catenă laterală nepolară (de ex., Ala, Cys, He, Leu, Met, Phe, Pro, Val); un lanț lateral încărcat negativ (de ex., Asp, Glu); un lanț lateral încărcat pozitiv (de ex., Arg, His, Lys); sau un lanț lateral polar neîncărcat (de ex., Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, și Tyr).

Modificările de aminoacizi includ, de ex., deleții din, și/sau inserții în, și/sau substituții ale, resturilor din secvențele de aminoacizi ale constructelor de anticorpi. Orice combinație de ștergere, inserare și substituție este făcută pentru a ajunge la constructul final, cu condiția ca constructul final să posede caracteristicile dorite. Modificările de aminoacizi pot modifica, de asemenea, procesele post-translaționale ale constructelor de anticorpi, cum ar fi, schimbarea numărului sau poziției situsurilor de glicozilare.

De exemplu, 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 aminoacizi pot fi inserați, substituiți sau șterși în fiecare dintre CDRs (desigur, în funcție de lungimea lor), în timp ce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, sau 25 de aminoacizi pot fi inserați, substituiți sau eliminați în fiecare dintre FRs. De preferință, inserțiile de secvență de aminoacizi în constructul de anticorp includ fuziuni amino- și/sau carboxil-terminale cu lungime de la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 resturi până la polipeptide care conțin o sută sau mai multe resturi, precum și inserții intra-secvență de resturi de aminoacizi unici sau multipli. Modificările corespunzătoare pot fi, de asemenea, efectuate în cadrul celui de-al treilea domeniu al constructului de anticorpi conform invenției. O variantă de inserție a constructului de anticorp conform invenției include fuziunea la capătul N-terminal, sau la capătul C-terminal al constructului de anticorp al unei enzime, sau fuziunea la o polipeptidă.

Situsurile de cel mai mare interes pentru mutageneza substituțională includ (dar nu sunt limitate la) CDRs ale lanțului greu și/sau ușor, în special regiunile hipervariabile, dar sunt, de asemenea, avute în vedere modificări FR în lanțul greu și/sau ușor. Substituțiile sunt, de preferință, substituții conservatoare așa cum s-a descris aici. De preferință, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 aminoacizi pot fi substituiți într-un CDR, în timp ce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, sau 25 de aminoacizi pot fi substituiți în regiunile cadru (FRs), în funcție de lungimea CDR sau FR. De exemplu, dacă o secvență CDR cuprinde 6 aminoacizi, se are în vedere ca unul, doi sau trei dintre acești aminoacizi să fie substituiți. În mod similar, dacă o secvență CDR cuprinde 15 aminoacizi, se are în vedere ca unul, doi, trei, patru, cinci sau șase dintre acești aminoacizi să fie substituiți.

O metodă utilă pentru identificarea anumitor resturi, sau regiuni ale constructelor de anticorpi care sunt locații preferate pentru mutageneză este numită "mutageneză cu scanarea alaninei", așa cum este descris de Cunningham și Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989)). Aici, un rest, sau un grup de resturi țintă din constructul de anticorp este/sunt identificat/e (de ex., resturi încărcate, cum ar fi, arg, asp, his, lys și glu) și înlocuite cu un aminoacid neutru, sau încărcat negativ (cel mai preferabil alanină sau polialanină) pentru a afecta interacțiunea aminoacizilor cu epitopul.

Acele locații de aminoacizi care demonstrează sensibilitate funcțională la substituții sunt apoi rafinate prin introducerea unor sau altor variante la, sau pentru, situsurile de substituție. Astfel, în timp ce situsul, sau regiunea pentru introducerea unei variații a secvenței de aminoacizi este predeterminată, natura mutației *in sine* nu trebuie predeterminată. De exemplu, pentru a analiza sau optimiza performanța unei mutații la un anumit situs, scanarea alaninei sau mutageneza aleatorie pot fi efectuate la un codon, sau o regiune țintă, iar variantele de construct de anticorp exprimate sunt analizate pentru combinația optimă a activității dorite. Tehnicile de realizare a mutațiilor de substituție la situsuri predeterminate din ADN-ul având o secvență cunoscută sunt bine cunoscute, de ex., mutageneza primerului M13 și mutageneza PCR. Screening-ul mutanților se face folosind teste ale activităților de legare a antigenului, cum ar fi, legarea BCMA sau CD3.

În general, dacă aminoacizii sunt substituiți în unul, sau mai multe, sau toate CDRs ale lanțului greu și/sau ușor, este de preferat ca secvența "substituită" obținută astfel să fie cel puțin 60% sau 65%, mai preferabil 70% sau 75%, chiar mai preferabil 80% sau 85%, și particular preferat 90% sau 95% identică cu secvența CDR "originală". Aceasta înseamnă că este dependentă de lungimea CDR în ce măsură este identică cu secvența "substituită". De exemplu, un CDR care are 5 aminoacizi este de preferință 80% identic cu secvența sa substituită pentru a avea cel puțin un aminoacid substituit. În consecință, CDRs ale constructului de anticorp pot avea grade diferite de identitate față de secvențele lor substituite, de ex., CDRL1 poate avea 80%, în timp ce CDRL3 poate avea 90%.

Substituțiile (sau înlocuirile) preferate sunt substituțiile conservatoare. Cu toate acestea, este avută în vedere orice substituție (inclusiv substituția neconservativă, sau una, sau mai multe din "substituțiile exemplificative" enumerate în Tabelul 3 de mai jos) atât timp cât constructul de anticorp își păstrează capacitatea de a se lega la BCMA prin primul domeniu și la epsilon CD3 prin cel de-al doilea

domeniu și/sau CDRs sale au o identitate cu secvența apoi substituită (cel puțin 60% sau 65%, mai preferabil 70% sau 75%, chiar mai preferabil 80% sau 85% și particular preferat 90% sau 95% identică cu secvența CDR "originală").

- 5 Substituțiile conservatoare sunt prezentate în Tabelul 3 sub titlul "substituții preferate". Dacă astfel de substituții au ca rezultat o schimbare a activității biologice, atunci pot fi introduse modificări mai substanțiale, denumite "substituții exemplificative" în Tabelul 3, sau așa cum este descris în continuare mai jos cu referire la clasele de aminoacizi, și produsele selectate pentru o caracteristică dorită.

Tabelul 3: Substituții de aminoacizi

Original	Substituții Exemplificative	Substituții preferate
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)	norleucine, 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

- 10 Modificările substanțiale ale proprietăților biologice ale constructului de anticorp din prezenta invenție sunt realizate prin selectarea substituțiilor care diferă semnificativ în efectul lor asupra menținerii (a) a structurii scheletului polipeptidic în zona substituției, de exemplu, sub formă de conformație de foaie sau elicoială, (b) sarcina sau hidrofobicitatea moleculei la locul țintă, sau (c) cea mai mare parte a lanțului lateral. Resturile naturale sunt împărțite în grupuri pe baza proprietăților comune ale lanțului lateral: (1) hidrofob: norleucină, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrofîl neutru: cys, ser, thr, asn, gln; (3) acid: asp, glu; (4) bazic: his, lys, arg; (5) resturi care influențează orientarea lanțului: gly, pro; și (6) aromatice: trp, tyr, phe.

- 15 Substituțiile neconservatoare vor presupune schimbarea unui membru al uneia dintre aceste clase cu o altă clasă. Orice rest de cisteină care nu este implicat în menținerea conformației adecvate a constructului de anticorp poate fi substituit, în general, cu serină, pentru a îmbunătăți stabilitatea oxidativă a moleculei și pentru a preveni reticulare aberantă. În schimb, legăturile de cisteină pot fi adăugate la anticorp pentru a-i îmbunătăți stabilitatea (în special în cazul în care anticorpul este un fragment de anticorp, cum ar fi, un fragment Fv).

- 20 Pentru secvențele de aminoacizi, identitatea și/sau similaritatea secvenței este determinată prin utilizarea tehnicilor standard cunoscute în domeniu, inclusiv, dar fără a se limita la, algoritmul de identitate a secvenței locale al lui Smith și Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, algoritmul de aliniere a identității secvenței al lui Needleman și Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, metoda de căutare a asemănării Pearson și Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. S.U.A. 85:2444, implementări computerizate ale acestor algoritmi GAP, BESTFIT, FASTA, și TFASTA în Wisconsin Genetics Software Package,

Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), programul de secvență Best Fit descris de Devereux ș.a., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, de preferință folosind setările implicite, sau prin inspecție. De preferință, procentul de identitate este calculat de FastDB pe baza următorilor parametri: penalizare de nepotrivire de 1; penalizare gap de 1; penalizare pentru dimensiunea decalajului de 0,33; și penalitate de alăturare de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un exemplu de algoritm util este PILEUP. PILEUP creează o aliniere de secvențe multiple dintr-un grup de secvențe înrudite folosind aliniamente progresive, în perechi. De asemenea, poate reprezenta un arbore care arată relațiile de grupare utilizate pentru a crea alinierea. PILEUP folosește o simplificare a metodei de aliniere progresivă a Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; metoda este similară cu cea descrisă de Higgins și Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Parametri PILEUP utili, inclusiv o greutate implicită a decalajului de 3,00, o greutate implicită a lungimii decalajului de 0,10 și decalaje de capăt ponderate.

Un alt exemplu de algoritm util este algoritmul BLAST, descris în: Altschul ș.a., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul ș.a., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; și Karin ș.a., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Un program BLAST deosebit de util este programul WU-BLAST-2, care a fost obținut de la Altschul ș.a., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 folosește mai mulți parametri de căutare, dintre care majoritatea sunt setați la valorile implicite. Parametrii ajustabili sunt setați cu următoarele valori: deschidere de suprapunere=1, fracțiune de suprapunere=0,125, prag de cuvinte (T)=II. Parametrii HSP S și HSP S2 sunt valori dinamice și sunt stabiliți de programul însuși în funcție de compoziția secvenței particulare și de compoziția bazei de date particulare în raport cu care este căutată secvența de interes; cu toate acestea, valorile pot fi ajustate pentru a crește sensibilitatea.

Un algoritm util suplimentar este BLAST, așa cum este raportat de Altschul ș.a., 1993, Nucl. Acizi Res. 25:3389-3402. Gapped BLAST folosește scoruri de înlocuire BLOSUM-62; parametrul de prag T setat la 9; metoda cu două lovituri pentru a declanșa extensii nedecalate, încarcă lungimi de decalaj de k un cost de 10+k; Xu setat la 16, iar Xg setat la 40 pentru etapa de căutare în baza de date și la 67 pentru etapa de ieșire a algoritmilor. Aliniamentele întrerupte sunt declanșate de un scor corespunzător la aproximativ 22 de biți.

În general, omologia aminoacizilor, asemănarea sau identitatea dintre variantele individuale de CDRs, sau secvențele VH/VL sunt cel puțin 60% cu secvențele descrise aici și, mai tipic, cu omologii sau identități în creștere, de preferință, de cel puțin 65% sau 70%, mai preferabil cel puțin 75% sau 80%, chiar mai preferabil cel puțin 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% și aproape 100 %. Într-o manieră similară, "procentul (%) de identitate a secvenței de acid nucleic" în raport cu secvența de acid nucleic a proteinelor de legare identificat aici este definit ca procentul de resturi de nucleotide dintr-o secvență candidată care sunt identice cu resturile de nucleotide din secvența care codifică constructul de anticorp. O metodă specifică utilizează modulul BLASTN al WU-BLAST-2 setat la parametrii implicați, cu intervalul de suprapunere și fracțiunea de suprapunere setate la 1 și, respectiv, 0,125.

În general, omologia secvenței de acid nucleic, asemănarea sau identitatea dintre secvențele de nucleotide care codifică variante individuale de CDRs sau secvențe VH/VL și secvențele de nucleotide descrise aici sunt cel puțin 60% și, mai tipic, cu omologii sau identități în creștere, de preferință, de cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% și aproape 100%. Astfel, o "variantă CDR" sau o "variantă de regiune VH/VL" este una cu omologia, similaritatea sau identitatea specificată cu CDR/VH/VL părinte al invenției și împărtășește funcția biologică, incluzând, dar fără a se limita la acestea, cel puțin 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% din specificitatea și/sau activitatea CDR sau VH/VL părinte.

Într-un exemplu de realizare, procentul de identitate cu linia germinativă umană a constructelor de anticorpi conform invenției este $\geq 70\%$ sau $\geq 75\%$, mai preferabil $\geq 80\%$ sau $\geq 85\%$, chiar mai preferabil $\geq 90\%$, și cel mai preferabil $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$ sau chiar $\geq 96\%$. Identitatea cu produsele genetice ale anticorpilor umani este considerată a fi o caracteristică importantă pentru a reduce riscul ca proteinele terapeutice să declanșeze un răspuns imun împotriva medicamentului la pacient în timpul tratamentului. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) demonstrează că reducerea porțiunilor non-umane ale constructelor de anticorpi de medicamente duce la o scădere a riscului de a induce anticorpi anti-medicament la pacienți în timpul tratamentului. Prin compararea unui număr exhaustiv de medicamente cu anticorpi evaluate clinic și a datelor respective de imunogenitate, se arată tendința că umanizarea regiunilor V ale anticorpilor face ca proteina să fie mai puțin imunogenă (în medie 5,1 % dintre pacienți) decât anticorpii purtători de regiuni V non-umane nealterate. (în medie 23,59 % dintre pacienți). Este deci de dorit un grad mai mare de identitate cu secvențele umane pentru terapiile proteice bazate pe regiunea V sub formă de constructe de

anticorpi. În acest scop de determinare a identității liniei germinale, regiunile V ale VL pot fi aliniate cu secvențele de aminoacizi ale segmentelor V și ale segmentelor J ale liniei germinale umane (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) folosind Software-ul Vector NTI și secvența de aminoacizi calculată prin împărțirea resturilor de aminoacizi identice la numărul total de resturi de aminoacizi ale VL în procente. Același lucru poate fi și pentru segmentele VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), cu excepția faptului că VH CDR3 poate fi exclus din cauza diversității sale mari și a lipsei existenței partenerilor de aliniere VH CDR3 ai liniei germinale umane. Tehnicile recombinante pot fi utilizate apoi pentru a crește identitatea secvenței la genele liniei germinale ale anticorpilor umani.

În plus, este avut în vedere că structurile de anticorpi bispecifice BCMAXCD3 din prezenta invenție nu se leagă (în esență) la, sau nu reacționează încrucișat cu BAFF-R uman și/sau TACI uman. Mai mult, se are în vedere că structurile de anticorpi bispecifice BCMAXCD3 din prezenta invenție nu se leagă (în esență) la, sau nu reacționează încrucișat cu BAFF-R macac/cyno și/sau TACI macac/cyno.

Într-un alt exemplu de realizare, structurile de anticorpi bispecifice ale prezentei invenții prezintă randamente mari de monomeri în condiții standard la scară de cercetare, de ex., într-un proces standard de purificare în două etape. De preferință, randamentul monomeric al constructelor de anticorpi conform invenției este $\geq 0,25$ mg/L supernatant, mai preferabil $\geq 0,5$ mg/L, chiar mai preferabil ≥ 1 mg/L și cel mai preferabil ≥ 3 mg/L supernatant.

De asemenea, randamentul de izoforme ale constructului de anticorpi dimerici și, prin urmare, se poate determina procentul de monomer (*adică*, monomer: (monomer+dimer)) al constructelor de anticorpi. Productivitatea constructelor de anticorpi monomerici și dimerici și procentul de monomer calculat poate, de ex. să fie obținute în etapa de purificare SEC a supernatantului de cultură din producția standardizată la scară de cercetare în sticle tip rolă. Într-un exemplu de realizare, procentul de monomer al constructelor de anticorpi este $\geq 80\%$, mai preferabil $\geq 85\%$, chiar mai preferabil $\geq 90\%$, și cel mai preferabil $\geq 95\%$.

Într-un exemplu de realizare, structurile de anticorpi au o stabilitate plasmatică preferată (raportul dintre EC50 cu plasmă și EC50 w/o cu plasmă) de ≤ 5 sau ≤ 4 , mai preferabil $\leq 3,5$ sau ≤ 3 , chiar mai preferabil $\leq 2,5$ sau ≤ 2 , și cel mai preferabil $\leq 1,5$ sau ≤ 1 . Stabilitatea plasmatică a unui construct de anticorp poate fi testată prin incubarea constructului în plasmă umană la 37°C timp de 24 de ore, urmată de determinarea EC50 într-un test de citotoxicitate cu eliberare de ^{51}Cr . Celulele efectoare din testul de citotoxicitate pot fi stimulate cu celule T CD8 umane, pozitive, îmbogățite. Celulele țintă pot fi, de ex., celule CHO transfectate cu BCMA uman. Raportul efector la celula țintă (E:T) poate fi ales ca 10:1. Lotul de plasmă umană utilizat în acest scop este derivat din sângele donatorilor sănătoși colectat cu seringi acoperite cu EDTA. Componentele celulare sunt îndepărtate prin centrifugare și faza superioară a plasmei este colectată și ulterior reunită. Ca martor, structurile de anticorpi sunt diluate imediat înaintea testului de citotoxicitate în mediu RPMI-1640. Stabilitatea plasmei este calculată ca raport dintre EC50 (după incubarea cu plasmă) și EC50 (martor).

În plus, este de preferat ca conversia monomerului la dimer a constructelor de anticorpi conform invenției să fie scăzută. Conversia poate fi măsurată în diferite condiții și analizată prin cromatografie de excludere a mărimii de înaltă performanță. De exemplu, incubarea izoformelor monomerice ale constructelor de anticorpi poate fi efectuată timp de 7 zile la 37°C și concentrații de, de ex. 100 $\mu\text{g/ml}$ sau 250 $\mu\text{g/ml}$ într-un incubator. În aceste condiții, este de preferat ca structurile de anticorpi ale invenției să prezinte un procent de dimer care este $\leq 5\%$, mai preferabil $\leq 4\%$, chiar mai preferabil $\leq 3\%$, chiar mai preferabil $\leq 2,5\%$, chiar mai preferabil $\leq 2\%$, chiar mai preferabil $\leq 1,5\%$ și cel mai preferabil $\leq 1\%$ sau chiar 0%.

De asemenea, se preferă ca structurile de anticorpi bispecifice ale prezentei invenții să prezinte o conversie a dimerului foarte scăzută după un număr de cicluri de înghețare/dezghețare. De exemplu, monomerul constructului de anticorp este ajustat la o concentrație de 250 $\mu\text{g/ml}$, de ex., în tampon de formulare generică și supus la trei cicluri de înghețare/dezghețare (înghețare la -80°C timp de 30 de min, urmată de dezghețare timp de 30 de min la temperatura camerei), urmată de SEC de înaltă performanță pentru a determina procentul de construct de anticorp monomeric inițial, care a fost transformat în constructul de anticorp dimeric. De preferință, procentele de dimeri ale constructelor de anticorpi bispecifice sunt $\leq 5\%$, mai preferabil $\leq 4\%$, chiar mai preferabil $\leq 3\%$, chiar mai preferabil $\leq 2,5\%$, chiar mai preferabil $\leq 2\%$, chiar mai preferabil $\leq 1,5\%$, și cel mai preferabil $\leq 1\%$ sau chiar $\leq 0,5\%$, de exemplu după trei cicluri de îngheț/dezgheț.

Structurile de anticorpi bispecifice din prezenta invenție prezintă de preferință o termostabilitate favorabilă cu temperaturi de agregare $\geq 45^\circ\text{C}$ sau $\geq 50^\circ\text{C}$, mai preferabil $\geq 52^\circ\text{C}$ sau $\geq 54^\circ\text{C}$, chiar mai preferabil $\geq 56^\circ\text{C}$ sau $\geq 57^\circ\text{C}$, și cel mai preferabil $\geq 58^\circ\text{C}$ sau $\geq 59^\circ\text{C}$. Parametrul de termostabilitate poate fi determinat în termeni de temperatură de agregare a anticorpilor, după cum urmează: Soluția de anticorp la o concentrație de 250 $\mu\text{g/ml}$ este transferată într-o cuvă de unică folosință și plasată într-un dispozitiv de împrăștiere dinamică a luminii (DLS). Proba este încălzită de la 40°C la

70°C, la o viteză de încălzire de 0,5°C/min cu achiziție constantă a razei măsurate. Creșterea razei care indică topirea proteinei și agregarea este utilizată pentru a calcula temperatura de agregare a anticorpului.

Alternativ, curbele temperaturii de topire pot fi determinate prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC) pentru a determina stabilitățile biofizice intrinseci ale proteinelor constructelor de anticorpi. Aceste experimente sunt efectuate folosind un dispozitiv VP-DSC MicroCal LLC (Northampton, MA, U.S.A). Absorbția de energie a unei probe care conține un construct de anticorp este înregistrată de la 20°C la 90°C, comparativ cu o probă care conține doar tamponul de formulare. Constructele de anticorpi sunt ajustate la o concentrație finală de 250 µg/ml, *de ex.*, în tampon de rulare SEC. Pentru înregistrarea curbei de topire respective, temperatura totală a probei este crescută treptat. La fiecare temperatură, se înregistrează absorbția de energie T a probei și referința tamponului de formulare. Diferența de absorbție de energie Cp (kcal/mol/°C) a probei minus referința este reprezentată în funcție de temperatura respectivă. Temperatura de topire este definită ca temperatura la primul maxim de absorbție de energie.

De asemenea, se are în vedere ca constructele de anticorpi bispecifice BCMAXCD3 din invenție să aibă o turbiditate (măsurată prin OD340 după concentrarea constructului de anticorp monomeric purificat la 2,5 mg/ml și incubare peste noapte) de $\leq 0,2$, de preferință de $\leq 0,15$, mai preferabil de $\leq 0,12$, chiar mai preferabil de $\leq 0,1$ și cel mai preferabil de $\leq 0,08$.

Într-un alt exemplu de realizare, constructul de anticorp conform invenției este stabil la pH fiziologic, sau ușor mai scăzut, adică aproximativ pH 7,4 până la 6,0. Cu cât constructul de anticorp se comportă mai tolerant la pH nefiziologic, cum ar fi, aproximativ pH 6,0, cu atât mai mare este recuperarea constructului de anticorpi eluat dintr-o coloană schimbătoare de ioni în raport cu cantitatea totală de proteină încărcată. Recuperarea constructului de anticorp dintr-o coloană de schimb ionic (*de ex.*, cationi) la aproximativ pH 6,0 este de preferință $\geq 30\%$, mai preferabil $\geq 40\%$, mai preferabil $\geq 50\%$, chiar mai preferabil $\geq 60\%$, chiar mai preferabil $\geq 70\%$, chiar mai preferabil $\geq 80\%$, chiar mai preferabil $\geq 90\%$, chiar mai preferabil $\geq 95\%$, și cel mai preferabil $\geq 99\%$.

În plus, se are în vedere că constructele de anticorpi bispecifice ale prezentei invenții prezintă eficacitate terapeutică, sau activitate anti-tumorală. Aceasta poate fi evaluată, *de ex.*, într-un studiu, așa cum este dezvăluit în următorul exemplu de model de xenogrefă tumorală umană în stadiu avansat:

În ziua 1 a studiului, 5×10^6 celule ale unui antigen al celulei țintă umane (aici: BCMA) a liniei de celule canceroase pozitive sunt injectate subcutanat în partea dorsală dreaptă a șoarecilor femele NOD/SCID. Când volumul mediu al tumorii atinge aproximativ 100 mm³, celulele T umane CD3 pozitive expandate in vitro sunt transplantate la șoareci prin injectarea a aproximativ 2×10^7 celulele în cavitatea peritoneală a animalelor. Șoarecii din grupul martor vehicul 1 nu primesc celule efectoare și sunt utilizați ca martor netransplantat pentru comparație cu grupul martor vehicul 2 (celule efectoare primitoare) pentru a monitoriza impactul doar al celulelor T asupra creșterii tumorii. Tratamentul cu anticorpi începe atunci când volumul mediu al tumorii atinge aproximativ 200 mm³. Dimensiunea medie a tumorii a fiecărui grup de tratament în ziua începerii tratamentului nu trebuie să fie diferită statistic de orice alt grup (analiza varianței). Șoarecii sunt tratați cu 0,5 mg/kg/zi dintr-un construct de anticorp bispecific BCMAXCD3 prin injecție intravenoasă în bolus timp de aproximativ 15 până la 20 de zile. Tumorile sunt măsurate cu șubler în timpul studiului și progresul evaluat prin compararea intergrup a volumelor tumorii (TV). Inhibarea creșterii tumorii T/C [%] este determinată prin calcularea TV ca $T/C\% = 100 \times (TV \text{ mediană a grupului analizat}) / (TV \text{ mediană a grupului martor 2})$.

Persoana de specialitate știe cum să modifice, sau să adapteze anumiți parametri ai acestui studiu, cum ar fi, numărul de celule tumorale injectate, locul de injectare, numărul de celule T umane transplantate, cantitatea de constructe de anticorpi bispecifice care urmează să fie administrate și termenele de timp, ajungând totuși la un rezultat semnificativ și reproductibil. De preferință, inhibarea creșterii tumorii T/C [%] este ≤ 70 sau ≤ 60 , mai preferabil ≤ 50 sau ≤ 40 , chiar mai preferabil ≤ 30 sau ≤ 20 și cel mai preferabil ≤ 10 sau ≤ 5 sau chiar $\leq 2,5$.

Constructul de anticorp conform invenției este un construct de anticorp cu un singur lanț.

Într-un exemplu de realizare preferat al constructului de anticorpi conform invenției, al treilea domeniu menționat cuprinde într-o ordine amino până la carboxil:

balama-CH2-CH3-linker-balama-CH2-CH3.

Într-un exemplu de realizare a invenției, fiecare dintre monomerii polipeptidici menționați ai celui de-al treilea domeniu are o secvență de aminoacizi care este cel puțin 90% identică cu o secvență selectată din grupul care constă din: SECV ID NR: 17-24. Într-un exemplu de realizare preferat, sau invenție, fiecare dintre monomerii polipeptidici menționați are o secvență de aminoacizi selectată din SECV ID NR: 17-24.

De asemenea, într-un exemplu de realizare al invenției, domeniul CH2 al unuia sau, de preferință, al fiecărui (ambilor) monomeri polipeptidici al celui de al treilea domeniu cuprinde o punte

disulfură de cisteină intra-domeniu. După cum este cunoscut în domeniu, termenul "punte disulfură de cisteină" se referă la o grupare funcțională cu structura generală *R-S-S-R*. Legătura se mai numește și o legătură SS, sau o punte disulfurică și este derivată prin cuplarea a două grupări tiol ale resturilor de cisteină. Este de preferat în special pentru constructul de anticorp conform invenției ca cisteinele care

formează puntea disulfură de cisteină din constructul de anticorp matur să fie introduse în secvența de aminoacizi a domeniului CH2 care corespunde la 309 și 321 (numerotarea Kabat).

Într-un exemplu de realizare a invenției, un situs de glicozilare în poziția Kabat 314 a domeniului CH2 este îndepărtat. Este de preferat ca această îndepărtare a situsului de glicozilare să fie realizată printr-o substituție N314X, în care X este orice aminoacid excluzând Q. Substituția menționată este de preferință o substituție N314G. Într-un exemplu realizare mai preferat, respectivul domeniu CH2 cuprinde, în plus, următoarele substituții (poziție conform Kabat) V321C și R309C (aceste substituții introduc puntea disulfură de cisteină intra-domeniu la pozițiile Kabat 309 și 321).

Se presupune că caracteristicile preferate ale constructului de anticorpi conform invenției comparate, de ex., cu constructul de anticorp heteroFc bispecific cunoscut în domeniu (figura 1b) poate fi legat, inter alia, de introducerea modificărilor descrise mai sus în domeniul CH2. Astfel, este de preferat pentru constructul invenției ca domeniile CH2 din al treilea domeniu al constructului de anticorp conform invenției să cuprindă puntea disulfură de cisteină intra-domeniu la pozițiile Kabat 309 și 321 și/sau situsul de glicozilare din poziția Kabat 314 este îndepărtat printr-o substituție N314X așa cum s-a descris anterior, de preferință printr-o substituție N314G.

Într-un alt exemplu de realizare preferat al invenției, domeniile CH2 din al treilea domeniu al constructului de anticorp conform invenției cuprind puntea disulfură de cisteină intradomeniu la pozițiile Kabat 309 și 321 și situsul de glicozilare din poziția Kabat 314 este îndepărtat printr-o substituție N314G. Cel mai preferabil, monomerul polipeptidic al celui de-al treilea domeniu al constructului de anticorp conform invenției are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17 și 18.

Într-un exemplu de realizare, invenția furnizează un construct de anticorp, în care:

- (i) primul domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorp și al doilea domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorp;
- (ii) primul domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorp și al doilea domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorp;
- (iii) primul domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorp și al doilea domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorpi; sau
- (iv) primul domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorp și al doilea domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorp.

În consecință, primul și al doilea domeniu pot fi domenii de legare care cuprind, fiecare, două domenii variabile de anticorp, cum ar fi, un domeniu VH și un domeniu VL. Exemplele pentru astfel de domenii de legare care cuprind două domenii variabile de anticorpi au fost descrise anterior aici și cuprind, de ex., fragmentele Fv, fragmentele scFv sau fragmentele Fab descrise aici anterior. Alternativ, unul sau ambele domenii de legare pot cuprinde doar un singur domeniu variabil. Exemplele pentru astfel de domenii de legare la un singur domeniu au fost descrise aici anterior și cuprind, de ex., nanocorpi sau anticorpi cu un singur domeniu variabil, care cuprinde doar un domeniu variabil, care poate fi VHH, VH sau VL, care leagă în mod specific un antigen, sau epitop independent de alte regiuni sau domenii V.

Într-un exemplu realizare preferat al constructului de anticorp conform invenției primul și al doilea domeniu sunt fuzionate cu al treilea domeniu prin intermediul unui linker peptidic. Linkerul peptidic preferat a fost descris aici anterior și este caracterizat prin secvența de aminoacizi Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, adică Gly₄Ser (SECV ID NR: 1), sau polimerii acestora, adică (Gly₄Ser)_x, unde x este un număr întreg de 1, sau mai mare (de ex., 2 sau 3). Un linker preferat în mod special pentru fuziunea primului și celui de-al doilea domeniu la al treilea domeniu este descris în SECV ID NR: 1.

Într-un exemplu de realizare preferat, constructul de anticorp conform invenției este caracterizat să cuprindă într-o ordine amino până la carboxil:

- (a) primul domeniu;
- (b) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1-3;
- (c) al doilea domeniu;
- (d) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1, 2, 3, 9, 10, 11 și 12;
- (e) primul monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu;
- (f) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 5, 6, 7 și 8; și
- (g) al doilea monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu.

Constructul de anticorp din prezenta invenție cuprinde un prim domeniu care se leagă la BCMA, de preferință la domeniul extracelular (ECD) al BCMA. Se înțelege că termenul "care se leagă la domeniul extracelular al BCMA", în contextul prezentei invenții, implică faptul că, domeniul de legare se leagă la BCMA exprimat pe suprafața unei celule țintă. Prin urmare, primul domeniu conform invenției se leagă de preferință la BCMA atunci când acesta este exprimat prin celule sau linii celulare care exprimă în mod natural și/sau prin celule sau linii celulare transformate, sau transfectate (stabil/tranzitoriu) cu BCMA. Într-un exemplu de realizare preferat, primul domeniu de legare se leagă de asemenea la BCMA atunci când BCMA este utilizat ca moleculă "țintă" sau "ligand" într-un test de legare *in vitro*, cum ar fi, BIAcore sau Scatchard. "Celula țintă" poate fi orice celulă procariotă sau eucariotă care exprimă BCMA pe suprafața sa; de preferință, celula țintă este o celulă care face parte din corpul uman sau animal, cum ar fi, un BCMA specific care exprimă celule canceroase sau tumorale.

De preferință, primul domeniu se leagă la BCMA/BCMA ECD uman. O secvență BCMA umană preferată este descrisă în SECV ID NR: 41 și o secvență preferată BCMA ECD umană este descrisă în SECV ID NR: 42. Într-un alt exemplu de realizare preferat, acesta se leagă la BCMA/BCMA ECD de macac. O secvență preferată de BCMA de macac este descrisă în SECV ID NR: 43 și o secvență preferată de BCMA ECD de macac este descrisă în SECV ID NR: 44. În conformitate cu cel mai preferat exemplu de realizare, primul domeniu se leagă atât de BCMA/BCMA ECD uman, cât și de macac. "Domeniul extracelular BCMA", sau "BCMA ECD" se referă la regiunea sau secvența BCMA care este în esență lipsită de domeniile transmembranare și citoplasmice ale BCMA. Persoana de specialitate în domeniu va înțelege că domeniul transmembranar identificat pentru polipeptida BCMA din prezenta invenție este identificat în conformitate cu criteriile utilizate în mod obișnuit în domeniu pentru identificarea celui tip de domeniu hidrofob. Limitele exacte ale unui domeniu transmembranar pot varia, dar cel mai probabil cu nu mai mult de aproximativ 5 aminoacizi la fiecare capăt al domeniului menționat în mod specific aici. O secvență de aminoacizi BCMA de lungime completă preferată este descrisă în SECV ID NR: 41. Un BCMA ECD preferat este prezentat în SECV ID NR: 42.

Domeniile de legare preferate care se leagă la BCMA sunt dezvăluite în WO 2013/072406, WO 2013/072415 și WO 2014/140248. Orice domeniu de legare pentru BCMA descris în aceste aplicații poate fi utilizat în contextul prezentei invenții.

Într-un aspect al invenției, constructul de anticorp cuprinde într-o ordine amino până la carboxil:

- (a) primul domeniu având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 53, 59, 71, 77, 89 sau 95;
- (b) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1-3;
- (c) al doilea domeniu având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 sau 187 din WO 2008/119567, sau SECV ID NR: 15;
- (d) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1, 2, 3, 9, 10, 11 și 12;
- (e) primul monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu având o secvență de polipeptide selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17-24;
- (f) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 5, 6, 7 și 8; și
- (g) al doilea monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu având o secvență de polipeptide selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17-24.

În conformitate cu acest exemplu de realizare preferat, primul și al doilea domeniu care sunt fuzionate prin intermediul unui linker peptidic la al treilea domeniu cuprind o secvență selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 53, 59, 71, 77, 89 sau 95. Într-un aspect, constructul de anticorp conform invenției este caracterizat prin faptul că are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 55, 56, 61, 62, 73, 74, 79, 80, 91, 92, 97 și 98.

Invenția furnizează, în plus, o moleculă de polinucleotidă/acid nucleic care codifică un construct de anticorp conform invenției. O polinucleotidă este un biopolimer compus din 13 sau mai mulți monomeri nucleotidici legați covalent într-un lanț. ADN-ul (cum ar fi, cADN) și ARN-ul (cum ar fi mARN) sunt exemple de polinucleotide cu funcție biologică distinctă. Nucleotidele sunt molecule organice care servesc ca monomeri, sau subunități ale moleculelor de acid nucleic, cum ar fi, ADN sau ARN. Molecula de acid nucleic, sau polinucleotida poate fi dublu catenară și monocatenară, liniară și circulară. Aceasta este de preferință cuprinsă într-un vector care este de preferință cuprins într-o celulă gazdă. Celula gazdă menționată este, de ex., după transformare sau transfecție cu vectorul sau polinucleotida conform invenției, capabilă să exprime constructul de anticorp. În acest scop, polinucleotida sau molecula de acid nucleic este legată operativ cu secvențe de control.

Codul genetic este setul de reguli prin care informațiile codificate în materialul genetic (acizi nucleici) sunt translatat în proteine. Decodificarea biologică în celulele vii este realizată de ribozom care

leagă aminoacizii într-o ordine specificată de mRNA, folosind molecule de tARN pentru a transporta aminoacizi și pentru a citi trei nucleotide mRNA la un moment dat. Codul definește modul în care secvențele acestor tripleți de nucleotide, numiți codoni, specifică ce aminoacid va fi adăugat în continuare în timpul sintezei proteinelor. Cu unele excepții, un codon cu trei nucleotide dintr-o secvență de acid nucleic specifică un singur aminoacid. Deoarece marea majoritate a genelor sunt codificate exact cu același cod, acest cod special este adesea denumit cod genetic canonic sau standard. În timp ce codul genetic determină secvența proteinelor pentru o anumită regiune de codificare, alte regiuni genomice pot influența când și unde sunt produse aceste proteine.

Mai mult, invenția furnizează un vector care cuprinde o moleculă de polinucleotidă/acid nucleic conform invenției. Un vector este o moleculă de acid nucleic folosită ca vehicul pentru a transfera material genetic (străin) într-o celulă. Termenul "vector" cuprinde – dar nu se limitează la – plasmide, virusi, cosmide și cromozomi artificiali. În general, vectorii modificați cuprind o origine de replicare, un situs de multiclonare și un marker selectabil. Vectorul însuși este în general o secvență de nucleotide, în mod obișnuit o secvență de ADN care cuprinde o inserție (transgenă) și o secvență mai mare care servește drept "coloana vertebrală" a vectorului. Vectorii moderni pot cuprinde caracteristici suplimentare pe lângă inserția transgenă și o coloană vertebrală: promotor, marker genetic, rezistență la antibiotice, genă reporter, secvență de țintire, etichetă de purificare a proteinei. Vectorii numiți vectori de expresie (construite de expresie) sunt în mod specific pentru exprimarea transgenei în celula țintă și, în general, au secvențe de control.

Termenul "secvențe de control" se referă la secvențe de ADN necesare pentru exprimarea unei secvențe de codificare legate operabil într-un anumit organism gazdă. Secvențele de control care sunt adecvate pentru procariote, de ex., includ un promotor, opțional o secvență operator și o parte de legare la ribozom. Celulele eucariote sunt cunoscute că utilizează promotori, semnale de poliadenilare și amplificatori.

Un acid nucleic este "legat operabil" atunci când este plasat într-o relație funcțională cu o altă secvență de acid nucleic. De exemplu, ADN-ul pentru o presecvență, sau lider secretor este legat operațional de ADN-ul pentru o polipeptidă dacă este exprimat ca o preproteină care participă la secreția polipeptidei; un promotor sau amplificator este legat operațional la o secvență de codificare dacă afectează transcrierea secvenței; sau o parte de legare a ribozomului este legată operațional la o secvență de codificare dacă este poziționată astfel încât să faciliteze translația. În general, "legat operabil" înseamnă că secvențele de ADN care sunt legate sunt contigue, iar, în cazul unui lider secretor, contigue și în faza de citire. Cu toate acestea, amplificatorii nu trebuie să fie învecinați. Legarea se realizează prin ligatură la locuri convenabile de restricție. Dacă astfel de situsuri nu există, adaptorii sau linkerii oligonucleotidelor sintetice sunt utilizați în conformitate cu practica convențională.

"Transfecția" este procesul de introducere deliberată a moleculelor de acid nucleic, sau polinucleotidelor (inclusiv vectori) în celulele țintă. Termenul este folosit mai ales pentru metodele non-virale în celulele eucariote. Transducția este adesea folosită pentru a descrie transferul mediat de virus al moleculelor de acid nucleic sau polinucleotidelor. Transfectarea celulelor animale implică de obicei deschiderea porilor tranzitori sau "găuri" în membrana celulară, pentru a permite absorbția materialului. Transfecția poate fi efectuată folosind fosfat de calciu, prin electroporare, prin presarea celulelor, sau prin amestecarea unei lipide cationice cu materialul pentru a produce lipozomi, care fuzionează cu membrana celulară și își depun încărcătura în interior.

Termenul "transformare" este utilizat pentru a descrie transferul non-viral al moleculelor de acid nucleic, sau polinucleotidelor (inclusiv vectori) în bacterii și, de asemenea, în celule eucariote non-animale, inclusiv celule vegetale. Transformarea este, prin urmare, modificarea genetică a unei celule eucariote bacteriene sau non-animale care rezultă din absorbția directă prin membrana (membranele) celulare din mediul ei și incorporarea ulterioară a materialului genetic exogen (molecule de acid nucleic). Transformarea poate fi realizată prin mijloace artificiale. Pentru ca transformarea să aibă loc, celulele sau bacteriile trebuie să fie într-o stare de competență, care ar putea apărea ca răspuns limitat în timp la condițiile de mediu, cum ar fi, foamea și densitatea celulară.

Mai mult, invenția furnizează o celulă gazdă transformată sau transfectată cu molecula de polinucleotidă/acid nucleic sau cu vectorul invenției. Așa cum sunt utilizați aici, termenii "celulă gazdă" sau "celulă destinată" sunt intenționați să includă orice celulă individuală sau cultură celulară care poate fi sau a fost receptori de vectori, molecule exogene de acid nucleic și polinucleotide care codifică constructul de anticorp al prezenta invenției; și/sau destinarii constructului de anticorp însuși. Introducerea materialului respectiv în celulă se realizează prin transformare, transfecție și altele asemenea. Termenul "celulă gazdă" este, de asemenea, destinat să includă descendența sau descendența potențială a unei singure celule. Deoarece anumite modificări pot apărea în generațiile următoare, fie din cauza unei mutații naturale, accidentale sau deliberate, fie din cauza influențelor mediului, astfel de descendenți pot să nu fie, de fapt, complet identici (în morfologie sau în complementul genomic sau ADN total) cu celula părinte, dar este încă inclus în domeniul de aplicare al termenului așa cum este utilizat

aici. Celulele gazdă adecvate includ celule procariote sau eucariote și includ, de asemenea, dar fără a se limita la, bacterii, celule de drojdie, celule fungice, celule vegetale și celule animale, cum ar fi, celule de insecte și celule de mamifere, de ex., murină, șobolan, macac sau umane.

Constructul de anticorpi conform invenției poate fi produs în bacterii. După exprimare, constructul de anticorp conform invenției este izolat din pasta celulară *E coli* într-o fracțiune solubilă și poate fi purificată prin, de ex., cromatografie de afinitate și/sau excludere a dimensiunii. Purificarea finală poate fi efectuată similar cu procesul de purificare a anticorpului exprimat, de ex., în celule CHO.

În plus față de procariote, microbi eucarioti, cum ar fi, ciupercile filamentoase sau drojdia, sunt gazde de clonare sau expresie adecvate pentru constructul de anticorp conform invenției. *Saccharomyces cerevisiae*, sau drojdia obișnuită de panificație, este cea mai frecvent utilizată printre microorganismele gazdă eucariote inferioare. Cu toate acestea, un număr de alte genuri, specii și tulpini sunt disponibile în mod obișnuit și utile aici, cum ar fi, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces hosts* such as *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, și *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis*; și filamentous fungi such as *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, și *Aspergillus* cum ar fi, *A. nidulans* și *A. niger*.

Celulele gazdă adecvate pentru exprimarea constructului de anticorp glicozilat conform invenției sunt derivate din organisme multicelulare. Exemplele de celule de nevertebrate includ celule vegetale și de insecte. Au fost identificate numeroase tulpini și variante baculovirale și celule gazdă de insecte permissive corespunzătoare de la gazde, cum ar fi, *Spodoptera frugiperda* (omida), *Aedes aegypti* (țânțar), *Aedes albopictus* (țânțar), *Drosophila melanogaster* (musculița de oțet) și *Bombyx mori*. O varietate de tulpini virale pentru transfecție sunt disponibile publicului, de ex., varianta L-1 a *Autographa californica* NPV și tulpina Bm-5 a *Bombyx mori* NPV, și astfel de virusuri pot fi utilizate ca virus aici conform prezentei invenții, în special pentru transfecția celulelor *Spodoptera frugiperda*.

Culturile de celule vegetale de bumbac, porumb, cartofi, soia, petunia, tomate, *Arabidopsis* și tutun pot fi, de asemenea, folosite ca gazde. Clonarea și vectorii de expresie utili în producerea de proteine în cultura de celule vegetale sunt cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu. Vezi de ex., Hiatt ș.a., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen ș.a., (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko ș.a., (1995) *The Plant J* 8: 745-750, și Fecker ș.a., (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Cu toate acestea, interesul a fost cel mai mare în celulele de vertebrate, iar propagarea celulelor de vertebrate în cultură (cultură de țesuturi) a devenit o procedură de rutină. Exemplele de linii de celule gazdă de mamifere utile sunt linia CV1 de rinichi de maimuță transformată de SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linie renală embrionară umană (293 sau 293 celule subclonate pentru creștere în cultură în suspensie, Graham ș.a., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); celule de rinichi de pui de hamster (BHK, ATCC CCL 10); celule ovariene de hamster chinezesc/-DHFR (CHO, Urlaub ș.a., *Proc. Natl. Acad. Sci. SUA* 77: 4216 (1980)); celule sertoli de șoarece (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); celule de rinichi de maimuță (CV1 ATCC CCL 70); celule de rinichi de maimuță verde africană (VERO-76, ATCC CRL1587); celule de carcinom cervical uman (HELA, ATCC CCL 2); celule renale canine (MDCK, ATCC CCL 34); celule hepatice de șobolan bivol (BRL 3A, ATCC CRL 1442); celule pulmonare umane (W138, ATCC CCL 75); celule hepatice umane (Hep G2, 1413 8065); tumoare mamară de șoarece (MMT 060562, ATCC CCL5 1); celule TRI (Mather ș.a., *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68); celule MRC 5; celule FS4; și o linie de hepatom uman (Hep G2).

Într-un alt exemplu de realizare, invenția furnizează un procedeu pentru producerea unui construct de anticorp conform invenției, procedeul menționat cuprinzând cultivarea unei celule gazdă a invenției în condiții care să permită exprimarea constructului de anticorp conform invenției și recuperarea constructului de anticorp produs din cultură.

Așa cum este utilizat aici, termenul "cultură" se referă la menținerea *in vitro*, diferențierea, creșterea, proliferarea și/sau propagarea celulelor în condiții adecvate într-un mediu. Termenul "expresie" include orice etapă implicată în producerea unui construct de anticorp conform invenției incluzând, dar fără a se limita la, transcripție, modificare post-transcripțională, translație, modificare post-translațională și secreție.

Când se utilizează tehnici de recombinare, constructul de anticorp poate fi produs intracelular, în spațiul periplasmatic sau secretat direct în mediu. Dacă constructul de anticorp este produs intracelular, ca primă etapă, resturile de particule, fie celule gazdă, fie fragmente lizate, sunt îndepărtate, de ex., prin centrifugare sau ultrafiltrare. Carter ș.a., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)) descriu o procedură pentru izolarea anticorpilor care sunt secretați în spațiul periplasmatic al *E coli*. Pe scurt, pasta celulară este dezghețată în prezență de acetat de sodiu (pH 3,5), EDTA și fluorură de fenilmetilsulfonil (PMSF) timp de aproximativ 30 de min. Resturile celulare pot fi îndepărtate prin centrifugare. Acolo unde anticorpul este secretat în mediu, supernatanții din astfel de sisteme de expresie sunt în general concentrați mai întâi utilizând un filtru de concentrație de proteine disponibil comercial, de ex., o unitate de ultrafiltrare

Amicon sau Millipore Pellicon. Un inhibitor de protează precum PMSF poate fi inclus în oricare dintre etapele de mai sus pentru a inhiba proteoliza și pot fi incluse antibiotice pentru a preveni creșterea contaminanților accidentali.

Constructul de anticorp conform invenției preparat din celulele gazdă poate fi recuperat sau purificat utilizând, de ex., cromatografie cu hidroxilapatită, electroforeză pe gel, dializă și cromatografie de afinitate. Alte tehnici de purificare a proteinelor, cum ar fi fracționarea pe o coloană cu schimb ionic, precipitarea cu etanol, HPLC cu fază inversă, cromatografia pe silice, cromatografia pe heparină SEPHAROSE™, cromatografia pe o rășină schimbătoare de anioni sau cationi (cum ar fi, o coloană de acid poliaspartic), focalizarea pe cromatografie, SDS-PAGE și precipitarea cu sulfat de amoniu sunt, de asemenea, disponibile în funcție de anticorpul care trebuie recuperat. Acolo unde constructul de anticorp conform invenției cuprinde un domeniu CH3, rășina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) este utilă pentru purificare.

Cromatografia de afinitate este o tehnică de purificare preferată. Matricea de care este atașat ligandul de afinitate este cel mai adesea agaroză, dar sunt disponibile și alte matrici. Matricile stabile mecanic, cum ar fi, sticla cu pori controlați sau poli(stirenedivinil)benzen, permit debite mai rapide și timpi de procesare mai scurți decât se pot obține cu agaroză.

Mai mult, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde un construct de anticorp conform invenției, sau un construct de anticorp produs conform procedurii invenției. Este de preferat pentru compoziția farmaceutică a invenției ca omogenitatea constructului de anticorp să fie $\geq 80\%$, mai preferabil $\geq 81\%, \geq 82\%, \geq 83\%, \geq 84\%$, sau $\geq 85\%$, încă mai preferabil $\geq 86\%, \geq 87\%, \geq 88\%, \geq 89\%$, sau $\geq 90\%$, mai preferabil, $\geq 91\%, \geq 92\%, \geq 93\%, \geq 94\%$, sau $\geq 95\%$ și cel mai preferabil $\geq 96\%, \geq 97\%, \geq 98\%$ sau $\geq 99\%$.

Așa cum este utilizat aici, termenul "compoziție farmaceutică" se referă la o compoziție care este adecvată pentru administrare la un pacient, de preferință la un pacient uman. Compoziția farmaceutică preferată în mod special a acestei invenții cuprinde unul sau mai multe constructe de anticorp conform invenției, de preferință într-o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic. De preferință, compoziția farmaceutică mai cuprinde formulări adecvate din unul sau mai mulți purtători (eficienți farmaceutici), stabilizatori, excipienți, diluanți, solubilizanți, agenți activi de suprafață, emulgatori, conservanți și/sau adjuvanți. Constituenții acceptabili ai compoziției sunt de preferință netoxici pentru primitori la dozele și concentrațiile folosite. Compozițiile farmaceutice ale invenției includ, dar nu se limitează la, compoziții lichide, congelate și liofilizate.

Compozițiile inventive pot cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic. În general, așa cum este utilizat aici, "purtător acceptabil farmaceutic" înseamnă orice și toate soluțiile apoase și neapoase, soluțiile sterile, solventii, soluțiile tampon, de ex., soluții saline tamponate cu fosfat (PBS), apă, suspensii, emulsii, cum ar fi, emulsii ulei/apă, diferite tipuri de agenți de umectare, lipozomi, medii de dispersie și acoperiri, care sunt compatibile cu administrarea farmaceutică, în special cu administrarea parenterală. Utilizarea unor astfel de medii și agenți în compozițiile farmaceutice este bine cunoscută în domeniu, iar compozițiile care cuprind astfel de purtători pot fi formulate prin metode convenționale bine-cunoscute.

Anumite exemple de realizare furnizează compoziții farmaceutice care cuprind constructul de anticorp conform invenției și în plus unul sau mai mulți excipienți, cum ar fi, cei descriși ilustrativ în această secțiune și în altă parte aici. Excipienții pot fi utilizați în invenție în acest sens pentru o mare varietate de scopuri, cum ar fi, ajustarea proprietăților fizice, chimice sau biologice ale formulărilor, cum ar fi, ajustarea viscozității și/sau procesele invenției pentru a îmbunătăți eficacitatea și sau pentru a stabili astfel de formulări și procese împotriva degradării și alterării datorate, de ex., solicitărilor care apar în timpul producției, transportului, depozitării, pregătirii înainte de utilizare, administrării și ulterior.

În anumite exemple de realizare, compoziția farmaceutică poate conține materiale de formulare în scopul modificării, menținerii sau păstrării, de ex., pH-ul, osmolaritatea, viscozitatea, claritatea, culoarea, izotonicitatea, mirosul, sterilitatea, stabilitatea, viteza de dizolvare sau eliberare, adsorbție sau pătrunderea compoziției (vezi, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Ediția 18", (A.R. Genmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). În astfel de exemple de realizare, materialele de formulare adecvate pot include, dar nu se limitează la:

- aminoacizi, cum ar fi, glicina, alanina, glutamina, asparagina, treonina, prolina, 2-fenilalanina, inclusiv aminoacizii încărcăți, de preferință lizină, acetat de lizină, arginină, glutamat și/sau histidină
- antimicrobiene, cum ar fi, agenți antibacterieni și antifungici
- antioxidanți, cum ar fi, acid ascorbic, metionină, sulfat de sodiu sau bisulfat de sodiu;
- tamponate, sisteme tampon și agenți de tamponare care sunt utilizați pentru a menține compoziția la pH fiziologic sau la un pH ușor mai scăzut; exemple de soluții tampon sunt boratul, bicarbonatul, Tris-HCl, citrații, fosfații, sau alți acizi organici, succinatul, fosfatul și histidina; de exemplu, tampon Tris de aproximativ pH 7,0-8,5;

- solvenți neapoși, cum ar fi, propilenglicolul, polietilenglicolul, uleiurile vegetale, cum ar fi, uleiul de măsline și esteri organici injectabili, cum ar fi, oleatul de etil;
- purtători apoși incluzând apă, soluții alcoolice/apoase, emulsii sau suspensii, inclusiv soluții saline și tamponate;
- 5 • polimeri biodegradabili, cum ar fi, poliesteri;
- agenți de încărcare, cum ar fi, manitol sau glicină;
- agenți de chelare, cum ar fi, acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA);
- agenți izotonici și de întârziere a absorbției;
- agenți de complexare, cum ar fi, cafeină, polivinilpirolidonă, beta-ciclodextrină sau hidroxipropil-beta-ciclodextrină)
- 10 • umpluturi;
- monozaharide; dizaharide; și alți carbohidrați (cum ar fi, glucoză, manoză sau dextrine); carbohidrații pot fi zaharuri nereducătoare, de preferință trehaloză, zaharoză, octasulfat, sorbitol sau xilitol;
- proteine (greutate moleculară mică), polipeptide sau purtători proteici, cum ar fi, albumina serică umană sau bovină, gelatină sau imunoglobulinele, de preferință, de origine umană;
- 15 • coloranți și aromatizanți;
- agenți reducători care conțin sulf, cum ar fi, glutationă, acid tioctic, tioglicolat de sodiu, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol și tiosulfat de sodiu
- agenți de diluare;
- 20 • agenți de emulsionare;
- polimeri hidrofilii, cum ar fi, polivinilpirolidona)
- contraioni care formează sare, cum ar fi, sodiu;
- conservanți, cum ar fi, antimicrobieni, anti-oxidanți, agenți de chelare, gaze inerte și altele asemenea; exemplele sunt: clorură de benzalconiu, acid benzoic, acid salicilic, timerosal, alcool fenetic, metilparaben, propilparaben, clorhexidină, acid sorbic, sau peroxid de hidrogen);
- 25 • complecși metalici, cum ar fi, complecși Zn-proteină;
- solvenți și co-solvenți (cum ar fi, glicerina, propilenglicolul sau polietilenglicolul);
- zaharuri și alcooli zaharați, cum ar fi, trehaloză, zaharoză, octasulfat, manitol, sorbitol sau xilitol stahioză, manoză, sorboză, xiloză, riboză, mioinizitoză, galactoză, lactitol, ribitol, mioinizitol, galactitol, glicerină, ciclitol (de ex., inozitol), polietilen glicol, și alcooli zaharați polihidrici;
- 30 • agenți de suspendare;
- surfactanți, sau agenți de umectare, cum ar fi, pluronici, PEG, esteri sorbitan, polisorbitați, cum ar fi, polisorbitat 20, polisorbitat, triton, trometamină, lecitină, colesterol, tiloxapal; surfactanții pot fi detergenți, de preferință cu o greutate moleculară > 1,2 KD și/sau un polieter, de preferință cu o greutate moleculară > 3 KD; exemple nelimitative pentru detergenții preferați sunt Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 și Tween 85; exemple nelimitative pentru polieteri preferați sunt PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 și PEG 5000;
- 35 • agenți de îmbunătățire a stabilității, cum ar fi, zaharoza sau sorbitolul;
- agenți de creștere a tonicității, cum ar fi, halogenuri de metale alcaline, de preferință clorură de sodiu, sau potasiu, manitol sorbitol;
- 40 • vehicule de livrare parenterală, inclusiv soluție de clorură de sodiu, dextroză Ringer, dextroză și clorură de sodiu, lactat Ringer, sau uleiuri fixe;
- vehicule de administrare intravenoasă, inclusiv substanțe de completare cu fluide și nutrienți, agenți de completare cu electroliți (cum ar fi, cele pe bază de dextroză Ringer).
- 45 Este evident pentru persoanele de specialitate în domeniu că diferiții constituenți ai compoziției farmaceutice (de ex., cei enumerați mai sus) pot avea efecte diferite, de ex., și aminoacidul poate acționa ca un tampon, un stabilizator și/sau un antioxidant; manitolul poate acționa ca un agent de volum și/sau un agent de creștere a tonicității; clorura de sodiu poate acționa ca vehicul de livrare și/sau agent de creștere a tonicității; etc.
- 50 Se are în vedere că compoziția conform invenției poate cuprinde, în plus față de polipeptida conform invenției definită aici, alți agenți biologic activi, în funcție de utilizarea intenționată a compoziției. Astfel de agenți ar putea fi medicamente care acționează asupra sistemului gastrointestinal, medicamente care acționează ca citostatice, medicamente care previn hiperuricemia, medicamente care inhibă imunoreacțiile (de ex., corticosteroizi), medicamente care modulează răspunsul inflamator,
- 55 medicamente care acționează asupra sistemului circulator și/sau agenți precum citokinele cunoscute în domeniu. Se are în vedere, de asemenea, ca constructul de anticorp din prezenta invenție să fie aplicat într-o co-terapie, adică în combinație cu un alt medicament anti-cancer.

În anumite exemple de realizare, compoziția farmaceutică optimă va fi determinată de o persoană de specialitate în domeniu, în funcție de, de ex., calea de administrare intenționată, formatul de

livrare și doza dorită. Vezi, de ex., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra. În anumite exemple de realizare, astfel de compoziții pot influența starea fizică, stabilitatea, viteza de eliberare in vivo și viteza de eliminare in vivo a constructului de anticorp conform invenției. În anumite exemple de realizare, vehiculul sau purtătorul primar dintr-o compoziție farmaceutică poate fi fie apos, fie neapos în natură. De exemplu, un vehicul sau purtător adecvat poate fi apa pentru injecție, soluția salină fiziologică sau lichidul cefalorahidian artificial, eventual suplimentat cu alte materiale comune în compozițiile pentru administrare parenterală. Soluție salină tamponată neutră sau soluție salină amestecată cu albumină serică sunt vehicule exemplificative suplimentare. În anumite exemple de realizare, constructul de anticorp al compozițiilor invenției poate fi preparat pentru depozitare prin amestecarea compoziției selectate având gradul dorit de puritate cu agenți de formulare opționali (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra) sub formă de turtă liofilizată sau soluție apoasă. Mai mult, în anumite exemple de realizare, constructul de anticorp conform invenției poate fi formulat ca un liofilizat utilizând excipienți adecvați, cum ar fi, zaharoza.

Când se are în vedere administrarea parenterală, compozițiile terapeutice pentru utilizare în această invenție pot fi furnizate sub formă de soluție apoasă fără pirogen, acceptabilă parenteral, care cuprinde constructul de anticorp dorit conform invenției într-un vehicul acceptabil farmaceutic. Un vehicul adecvat în special pentru injectarea parenterală este apa distilată sterilă în care constructul de anticorp conform invenției este formulat ca o soluție sterilă, izotonică, conservată corespunzător. În anumite exemple de realizare, preparatul poate implica formularea moleculei dorite cu un agent, cum ar fi, microsfele injectabile, particule bioerodabile, compuși polimerici (cum ar fi, acid polilactic sau acid poliglicolic), granule sau lipozomi, care pot furniza eliberarea produsului controlată sau susținută, care se pot livra prin injecție depozit. În anumite exemple de realizare, poate fi utilizat și acidul hialuronic, având ca efect promovarea duratei susținute în circulație. În anumite exemple de realizare, dispozitivele implantabile de eliberare a medicamentelor pot fi utilizate pentru a introduce constructul de anticorp dorit.

Compozițiile farmaceutice suplimentare vor fi evidente pentru persoanele de specialitate în domeniu, incluzând formulări care implică constructul de anticorp conform invenției în formulări cu livrare/eliberare susținută sau controlată. Tehnicile pentru formularea unei varietăți de alte mijloace de eliberare susținută sau controlată, cum ar fi, purtători de lipozomi, microparticule bioerodabile, sau granule poroase și injecții depozit, sunt, de asemenea, cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu. Vezi, de ex., cererea internațională de brevet WO9315722, care descrie eliberarea controlată a microparticulelor polimerice poroase pentru livrarea compozițiilor farmaceutice. Preparatele cu eliberare susținută pot include matrici polimerice semipermeabile sub formă de articole turnate, de ex., filme sau microcapsule. Matricile cu eliberare susținută pot include poliesteri, hidrogeluri, polilactide (așa cum sunt dezvăluite în brevetul U.S. nr. 3.773.919 și Publicarea cererii de brevet european nr. EP 058481), copolimeri de acid L-glutamic și gamma etil-L-glutamat (Sidman ș.a., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli (2-hidroxietyl-metacrilat) (Langer ș.a., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 și Langer, 1982, Chem. Teh. 12:98-105), acetat de etilen vinil (Langer ș.a., 1981, supra), sau acid poli-D(-)-3-hidroxi butiric (publicația cererii de brevet european nr. EP 133.988). Compozițiile cu eliberare susținută pot include, de asemenea, lipozomi care pot fi preparați prin oricare dintre câteva metode cunoscute în domeniu. Vezi, de ex., Eppstein ș.a., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; Publicațiile cererilor de brevet european nr. EP 036.676; EP 088.046 și EP 143.949.

Constructul de anticorp poate fi, de asemenea, prins în microcapsule preparate, de ex., prin tehnici de coacervare sau prin polimerizare interfacială (de exemplu, microcapsule de hidroximetilceluloză sau gelatină și, respectiv, microcapsule de poli (metilmetacilat), în sisteme de administrare a medicamentelor coloidale (de ex., lipozomi, microsfele de albumină, microemulsii, nanoparticule și nanocapsule), sau în macroemulsii. Astfel de tehnici sunt dezvăluite în Remington's Pharmaceutical Sciences, ediția a 16-a, Oslo, A., Ed., (1980)).

Compozițiile farmaceutice utilizate pentru administrarea in vivo sunt furnizate de obicei ca preparate sterile. Sterilizarea poate fi realizată prin filtrare prin membrane de filtrare sterile. Când compoziția este liofilizată, sterilizarea folosind această metodă poate fi efectuată fie înainte, fie după liofilizare și reconstituire. Compozițiile pentru administrare parenterală pot fi păstrate sub formă liofilizată sau într-o soluție. Compozițiile parenterale sunt în general puse într-un recipient care are un orificiu de acces steril, de exemplu, o pungă de soluție intravenoasă sau o fiolă care are un dop care poate fi perforat cu un ac de injectare hipodermic.

Un alt aspect al invenției include constructul de anticorp auto-tampon al formulărilor invenției, care poate fi utilizat ca compoziții farmaceutice, așa cum este descris în cererea internațională de brevet. WO 06138181A2. Sunt disponibile o varietate de expuneri privind stabilizarea proteinelor și materialelor de formulare și metodele utile în acest sens, cum ar fi, Arakawa ș.a., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick ș.a., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" în: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY și PRACTICE, Carpenter și Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), și

Randolph ș.a., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), vezi în special părțile relevante pentru excipienți și procese ale acestora pentru formulări de proteine auto-tamponante în conformitate cu prezenta invenție, în special în ceea ce privește produsele farmaceutice proteice și procedeele pentru utilizări medicale veterinare și/sau umane.

Sărurile pot fi utilizate în conformitate cu anumite exemple de realizare ale invenției pentru, de exemplu, a ajusta puterea ionică și/sau izotonicitatea unei formulări și/sau pentru a îmbunătăți solubilitatea și/sau stabilitatea fizică a unei proteine, sau a altui ingredient al unei compoziții în conformitate cu invenția. După cum este bine cunoscut, ionii pot stabiliza starea nativă a proteinelor prin legarea la resturile încărcate de pe suprafața proteinei și prin protejarea grupurilor încărcate și polare din proteină și prin reducerea puterii interacțiunilor lor electrostatice, a interacțiunilor de atracție și respingere. De asemenea, ionii pot stabiliza starea denaturată a unei proteine prin legarea la, în special, legăturile peptidice denaturate (--CONH) ale proteinei. Mai mult, interacțiunea ionică cu grupările încărcate și polare dintr-o proteină poate reduce, de asemenea, interacțiunile electrostatice intermoleculare și, prin urmare, poate preveni sau reduce agregarea și insolubilitatea proteinelor.

Speciile ionice diferă semnificativ în efectele lor asupra proteinelor. Au fost dezvoltate o serie de clasamente categorice ale ionilor și efectele acestora asupra proteinelor care pot fi utilizate în formularea compozițiilor farmaceutice în conformitate cu invenția. Un exemplu este seria Hofmeister, care clasifică soluțiile ionice și polare neionice după efectul lor asupra stabilității conformaționale a proteinelor în soluție. Soluții stabilizatori sunt denumiți "cosmotropici". Soluții destabilizatori sunt denumite "caotropici". Cosmotropii sunt utilizați în mod obișnuit la concentrații mari (de ex., > 1 molar sulfat de amoniu) pentru a precipita proteinele din soluție ("salting-out"). Caotropii sunt utilizați în mod obișnuit pentru a denatura și/sau pentru a solubiliza proteinele ("salting-in"). Eficacitatea relativă a ionilor pentru "salt-in" și "salt-out" definește poziția lor în seria Hofmeister.

Aminoacizii liberi pot fi utilizați în constructul de anticorp al formulărilor din invenție în conformitate cu diferite exemple de realizare ale invenției ca agenți de încărcare, stabilizatori și antioxidanți, precum și alte utilizări standard. Lizina, prolina, serina și alanina pot fi utilizate pentru stabilizarea proteinelor într-o formulare. Glicina este utilă în liofilizare pentru a asigura structura și proprietățile corecte ale turtei. Arginina poate fi utilă pentru a inhiba agregarea proteinelor, atât în formulări lichide, cât și liofilizate. Metionina este utilă ca antioxidant.

Polioli includ zaharuri, de ex., manitol, zaharoză și sorbitol și alcooli polihidroxicili, cum ar fi, de ex., glicerol și propilen glicol, și, în scopul discutat aici, polietilen glicol (PEG) și substanțe înrudite. Polioli sunt cosmotropici. Sunt agenți de stabilizare utili atât în formulări lichide, cât și liofilizate pentru a proteja proteinele de procesele de degradare fizică și chimică. Polioli sunt, de asemenea, utili pentru ajustarea tonicității formulărilor. Printre polioli utili în formele de realizare selectate ale invenției se numără manitolul, utilizat în mod obișnuit pentru a asigura stabilitatea structurală a turtei în formulările liofilizate. Acesta asigură stabilitatea structurală a turtei. Este utilizat în general cu un lioprotector, de ex., zaharoză. Sorbitolul și zaharoza se numără printre agenții preferați pentru ajustarea tonicității și ca stabilizatori pentru a proteja împotriva solicitărilor de îngheț-dezgheț în timpul transportului, sau pregătirii vracului în timpul procesului de fabricație. Zaharurile reducătoare (care conțin grupări aldehydice sau cetone libere), cum ar fi, glucoza și lactoza, pot glica resturile de lizină și arginină la suprafață. Prin urmare, ei nu sunt în general printre polioli preferați pentru utilizare conform invenției. În plus, zaharurile care formează astfel de specii reactive, cum ar fi, zaharoza, care este hidrolizată la fructoză și glucoză în condiții acide și, în consecință, generează glicare, nu se numără, de asemenea, printre polioli preferați ai invenției în acest sens. PEG este util pentru stabilizarea proteinelor și ca crioprotector și poate fi utilizat în invenție în acest sens.

Exemplele de realizare ale constructului de anticorp ale formulărilor invenției cuprind în plus surfactanți. Moleculele de proteine pot fi susceptibile la adsorbție pe suprafețe și la denaturare și agregare ulterioară la interfețele aer-lichid, solid-lichid și lichid-lichid. Aceste efecte se scalează în general invers cu concentrația de proteine. Aceste interacțiuni dăunătoare cresc în general invers cu concentrația de proteine și sunt de obicei exacerbate de agitația fizică, cum ar fi, cea generată în timpul transportului și manipulării unui produs. Surfactanții sunt utilizați în mod obișnuit pentru a preveni, minimiza sau reduce adsorbția la suprafață. Surfactanții utili din invenție în acest sens includ polisorbitat 20, polisorbitat 80, alți esteri ai acizilor grași ai polietoxilaților de sorbitan și poloxamerul 188. Surfactanții sunt de asemenea utilizați în mod obișnuit pentru a controla stabilitatea conformațională a proteinei. Utilizarea surfactanților în această privință este specifică proteinei, deoarece, în mod obișnuit, orice surfactant va stabiliza unele proteine și le va destabiliza pe altele.

Polisorbitații sunt susceptibili la degradarea oxidativă și adesea, așa cum sunt furnizați, conțin cantități suficiente de peroxizi pentru a provoca oxidarea lanțurilor laterale ale resturilor de proteine, în special metionina. În consecință, polisorbitații trebuie utilizați cu atenție și, atunci când sunt utilizați, trebuie folosiți la cea mai scăzută concentrație eficientă. În acest sens, polisorbitații exemplifică regula generală conform căreia excipienții ar trebui să fie utilizați în cele mai scăzute concentrații efective.

Exemplele de realizare ale constructului de anticorp al formulărilor invenției cuprind, în plus, unul sau mai mulți antioxidanți. Într-o oarecare măsură, oxidarea dăunătoare a proteinelor poate fi prevenită în formulările farmaceutice prin menținerea unor niveluri adecvate de oxigen și temperatură ambientală și prin evitarea expunerii la lumină. Excipienții antioxidanți pot fi folosiți și pentru a preveni degradarea oxidativă a proteinelor. Printre antioxidanții utili în acest sens se numără agenții reducători, captatorii de oxigen/radicali liberi și agenții de chelare. Antioxidanții pentru utilizare în formulări proteice terapeutice în conformitate cu invenția sunt de preferință solubili în apă și își mențin activitatea pe toată durata de valabilitate a unui produs. EDTA este un antioxidant preferat în conformitate cu invenția în acest sens. Antioxidanții pot deteriora proteinele. De exemplu, agenții reducători, cum ar fi, glutatona în special, pot perturba legăturile disulfurice intramoleculare. Astfel, antioxidanții pentru utilizare în invenție sunt selectați pentru, printre altele, a elimina sau a reduce suficient posibilitatea ca ei înșiși să dăuneze proteinelor din formulare.

Formulările în conformitate cu invenția pot include ioni metalici care sunt co-factori proteici și care sunt necesari pentru a forma complecși de coordonare a proteinelor, cum ar fi, zincul necesar pentru a forma anumite suspensii de insulină. De asemenea, ionii metalici pot inhiba unele procese care degradează proteinele. Cu toate acestea, ionii metalici catalizează și procesele fizice și chimice care degradează proteinele. Ionii de magneziu (10-120 mM) pot fi utilizați pentru a inhiba izomerizarea acidului aspartic la acid izoaspartic. Ionii Ca^{+2} (până la 100 mM) pot crește stabilitatea dezoxiribonucleazei umane. Mg^{+2} , Mn^{+2} , și Zn^{+2} cu toate acestea, poate destabiliza rhDNaza. În mod similar, Ca^{+2} și Sr^{+2} poate stabiliza Factorul VIII, acesta poate fi destabilizat de Mg^{+2} , Mn^{+2} și Zn^{+2} , Cu^{+2} și Fe^{+2} , iar agregarea sa poate fi crescută de ionii de Al^{+3} .

Exemplele de realizare ale constructului de anticorp ale formulărilor din invenție cuprind în plus unul sau mai mulți conservanți. Conservanții sunt necesari atunci când se dezvoltă formulări parenterale cu mai multe doze care implică mai mult de o extracție din același recipient. Funcția lor principală este de a inhiba creșterea microbiană și de a asigura sterilitatea produsului pe toată durata de valabilitate, sau pe durata de utilizare a produsului medicamentos. Conservanții folosiți în mod obișnuit includ alcoolul benzilic, fenolul și m-crezolul. Deși conservanții au o istorie lungă de utilizare cu parenterale cu molecule mici, dezvoltarea formulărilor proteice care includ conservanți poate fi o provocare. Conservanții au aproape întotdeauna un efect destabilizator (agregare) asupra proteinelor, iar acesta a devenit un factor major în limitarea utilizării acestora în formulările de proteine cu doze multiple. Până în prezent, majoritatea medicamentelor proteice au fost formulate doar ca doză unică. Cu toate acestea, atunci când sunt posibile formulări cu mai multe doze, acestea au avantajul suplimentar de a permite confortul pacientului și o capacitate de comercializare crescută. Un bun exemplu este cel al hormonului uman de creștere (hGH), în care dezvoltarea formulărilor conservate a condus la comercializarea unor prezentări mai convenabile, cu mai multe utilizări ale stiloului injector. Cel puțin patru astfel de dispozitive stilou care conțin formulări conservate de hGH sunt disponibile în prezent pe piață. Norditropin (lichid, Novo Nordisk), Nutropin AQ (lichid, Genentech) și Genotropin (cartuș liofilizat - dublă cameră, Pharmacia & Upjohn) conțin fenol, în timp ce Somatropo (Eli Lilly) este formulat cu m-crezol. Mai multe aspecte trebuie luate în considerare în timpul formulării și dezvoltării formelor de dozare conservate. Concentrația eficientă a conservanților din produsul medicamentos trebuie să fie optimizată. Acest lucru necesită testarea unui anumit conservant în forma de dozare cu intervale de concentrație care conferă eficacitate antimicrobiană fără a compromite stabilitatea proteinei.

După cum este de așteptat, dezvoltarea formulărilor lichide care conțin conservanți este mai dificilă decât a formulărilor liofilizate. Produsele liofilizate pot fi liofilizate fără conservant și reconstituite cu un conservant care conține diluant în momentul utilizării. Acest lucru scurtează timpul pentru care un conservant este în contact cu proteina, minimizând semnificativ riscurile de stabilitate asociate. În cazul formulărilor lichide, eficacitatea și stabilitatea conservanților trebuie menținute pe toată perioada de valabilitate a produsului (aproximativ 18 până la 24 de luni). Un punct important de remarcat este că eficacitatea conservanților trebuie demonstrată în formula finală care conține medicamentul activ și toate componentele excipienților.

Constructele de anticorpi dezvoltate aici pot fi, de asemenea, formulate ca imuno-lipozomi. Un "lipozom" este o veziculă mică compusă din diferite tipuri de lipide, fosfolipide și/sau surfactant care este utilă pentru livrarea unui medicament la un mamifer. Componentele lipozomului sunt aranjate în mod obișnuit într-o formațiune cu două straturi, similar aranjamentului lipidic al membranelor biologice. Lipozomii care conțin constructul de anticorp sunt preparați prin metode cunoscute în domeniu, cum sunt cele descrise în Epstein ș.a., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 82: 3688 (1985); Hwang ș.a., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 77: 4030 (1980); brevetele US nr. 4.485.045 și 4.544.545; și WO 97/38731. Lipozomii cu timp de circulație îmbunătățit sunt dezvoltati în brevetul US nr. 5.013. 556. Lipozomii deosebit de utili pot fi generați prin metoda de evaporare în fază inversă cu o compoziție lipidică care cuprinde fosfatidilcolină, colesterol și fosfatidiletanolamină derivată din PEG (PEG-PE). Lipozomii sunt extrudați prin filtre cu dimensiunea porilor definită pentru a produce lipozomi cu diametrul dorit. Fragmentele Fab' ale

constructului de anticorp din prezenta invenție pot fi conjugate la lipozomi așa cum este descris în Martin ș.a. J. Biol. Chim. 257: 286-288 (1982) printr-o reacție de schimb de disulfuri. Un agent chimioterapeutic este opțional conținut în lipozom. Vezi Gabizon ș.a. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Odată ce compoziția farmaceutică a fost formulată, aceasta poate fi păstrată în flacoane sterile ca soluție, suspensie, gel, emulsie, solid, cristal, sau sub formă de pulbere deshidratată sau liofilizată. Astfel de formulări pot fi păstrate fie într-o formă gata de utilizare, fie într-o formă (de ex., liofilizată) care este reconstituită înainte de administrare.

Activitatea biologică a compoziției farmaceutice definită aici poate fi determinată, de ex., prin teste de citotoxicitate, așa cum este descris în următoarele exemple, în WO 99/54440 sau de Schlereth ș.a. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Eficacitate" sau "eficacitate in vivo" așa cum este utilizat aici se referă la răspunsul la terapia cu compoziția farmaceutică a invenției, utilizând de ex., criterii standardizate de răspuns NCI. Succesul sau eficacitatea in vivo a terapiei folosind o compoziție farmaceutică a invenției se referă la eficacitatea compoziției pentru scopul ei vizat, adică capacitatea compoziției de a provoca efectul dorit, adică epuizarea celulelor patologice, de ex., celule tumorale. Eficacitatea in vivo poate fi monitorizată prin metode standard stabilite pentru entitățile bolii respective, incluzând, dar fără a se limita la număratoarea de globule albe, diferențiale, sortarea celulelor activate prin fluorescență, aspirația măduvei osoase. În plus, pot fi utilizați diverși parametri de chimie clinică specifici bolii și alte metode standard stabilite. În plus, se pot utiliza tomografie asistată de computer, raze X, tomografie prin rezonanță magnetică nucleară (de ex., pentru evaluarea răspunsului bazată pe criterii ale Institutului Național al Cancerului [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. 1999 Apr;17(4):1244]), scanarea tomografiei cu emisie de pozitroni, numărarea globulelor albe, diferențiale, sortarea celulelor activate prin fluorescență, aspirația măduvei osoase, biopsii/histologii ale ganglionilor limfatici și diverși parametri de chimie clinică specifici limfomului (de ex., lactat dehidrogenază) și alte metode standard stabilite.

O altă provocare majoră în dezvoltarea medicamentelor, cum ar fi compoziția farmaceutică a invenției, este modularea predictibilă a proprietăților farmacocinetice. În acest scop, poate fi stabilit un profil farmacocinetic al medicamentului candidat, adică un profil al parametrilor farmacocinetici care afectează capacitatea unui anumit medicament de a trata o afecțiune dată. Parametrii farmacocinetici ai medicamentului care influențează capacitatea unui medicament de a trata o anumită entitate de boală includ, dar nu se limitează la: timpul de înjumătățire, volumul de distribuție, metabolismul hepatic de primă trecere și gradul de legare a serului sanguin. Eficacitatea unui anumit agent medicament poate fi influențată de fiecare dintre parametrii menționați anterior. Este o caracteristică avută în vedere a constructelor de anticorpi din prezenta invenție prevăzute cu modalitatea Fc specifică că acestea implică, de ex., diferențe în comportamentul farmacocinetic. Un construct de anticorp de țintire cu durată de înjumătățire extinsă conform prezentei invenții prezintă, de preferință, un timp de rezidență surprinzător de crescut in vivo în comparație cu versiunile "canonice" non-HLE ale constructului de anticorp menționat.

"Timp de înjumătățire" înseamnă timpul în care 50% dintr-un medicament administrat se elimină prin procese biologice, de ex., metabolism, excreție, etc. Prin "metabolismul hepatic de primă trecere" se înțelege tendința unui medicament de a fi metabolizat la primul contact cu ficatul, adică în timpul primei sale treceri prin ficat. "Volum de distribuție" înseamnă gradul de retenție a unui medicament în diferitele compartimente ale corpului, cum ar fi, de ex., spații intracelulare și extracelulare, țesuturi și organe, etc. și distribuția medicamentului în aceste compartimente. "Grad de legare a serului sanguin" înseamnă tendința unui medicament de a interacționa și de a se lega de proteinele din serul sanguin, cum ar fi, albumina, ceea ce duce la reducerea sau pierderea activității biologice a medicamentului.

Parametrii farmacocinetici includ, de asemenea, biodisponibilitatea, timpul de întârziere (Tlag), Tmax, ratele de absorbție, debut mai mare și/sau Cmax pentru o anumită cantitate de medicament administrată. "Biodisponibilitate" înseamnă cantitatea de medicament din compartimentul sanguin. "Timp de întârziere" înseamnă intervalul de timp dintre administrarea medicamentului și detectarea și măsurabilitatea acestuia în sânge sau plasmă. "Tmax" este timpul după care se atinge concentrația sanguină maximă a medicamentului, și "Cmax" este concentrația sanguină maximă obținută cu un anumit medicament. Timpul pentru a ajunge la o concentrație sanguină sau tisulară a medicamentului necesară pentru efectul său biologic este influențat de toți parametrii. Parametrii farmacocinetici ai constructelor de anticorpi bispecfici care prezintă specificitate între specii, care pot fi determinați în testele preclinice pe animale la primate non-cimpanzei, așa cum s-a subliniat anterior, sunt de asemenea prezentați, de ex., în publicația de Schlereth ș.a. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

Într-un aspect preferat al invenției, compoziția farmaceutică este stabilă timp de cel puțin patru săptămâni la aproximativ -20°C. După cum reiese din exemplele anexate, calitatea unui construct de

anticorp conform invenției în comparație cu calitatea constructelor de anticorpi corespunzătoare din stadiul tehnicii se poate testa utilizând sisteme diferite. Se înțelege că aceste teste sunt în conformitate cu "ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C și Specifications: Test procedures și Acceptance Criteria for Biotech Biotechnological/Biological Products Q6B*" și, prin urmare, sunt alese pentru a oferi un profil care indică stabilitatea, care oferă certitudinea că sunt detectate schimbări în identitatea, puritatea și potența produsului. Este bine acceptat că termenul de puritate este un termen relativ. Datorită efectului glicozilării, deamidării sau altor eterogenități, puritatea absolută a unui produs biotehologic/biologic ar trebui să fie evaluată în mod obișnuit prin mai mult de o metodă, iar valoarea purității derivată este dependentă de metodă. În scopul testării stabilității, testele de puritate ar trebui să se concentreze pe metodele de determinare a produselor de degradare.

Pentru evaluarea calității unei compoziții farmaceutice care cuprinde un construct de anticorp conform invenției se poate analiza, de ex., prin analizarea conținutului de agregate solubile într-o soluție (HMWS pe excludere de dimensiune). Este de preferat ca stabilitatea timp de cel puțin patru săptămâni la aproximativ -20°C să fie caracterizată printr-un conținut de mai puțin de 1,5% HMWS, de preferință cu mai puțin de 1% HMWS.

O formulare preferată pentru constructul de anticorp ca o compoziție farmaceutică poate, de ex., cuprinde componentele unei formulări așa cum este descris mai jos:

- Formularea A:

fosfat de potasiu, clorhidrat de L-arginină, trehaloză dihidrat, polisorbit 80 la pH 6,0.

Alte exemple pentru evaluarea stabilității unui construct de anticorp conform invenției sub formă de compoziție farmaceutică sunt furnizate în exemplele anexate 4-12. În acele exemple, exemplele de realizare ale constructelor de anticorpi ale invenției sunt testate cu privire la diferite condiții de stres în diferite formulări farmaceutice și rezultatele sunt comparate cu alte formate de extindere a timpului de înjumătățire (HLE) ale constructului de anticorp care angajează celulele T bispecifice cunoscute din domeniu. În general, se are în vedere că constructele de anticorpi furnizate cu modalitatea Fc specifică conform prezentei invenții sunt de obicei mai stabile într-o gamă largă de condiții de stres, cum ar fi, temperatura și stresul la lumină, ambele în comparație cu constructele de anticorpi prevăzute cu diferite formate HLE și fără orice format HLE (adică constructe de anticorpi "canonice"). Respectiva stabilitate la temperatură se poate referi atât la scădere (sub temperatura camerei, inclusiv înghețarea), cât și la creștere (peste temperatura camerei, inclusiv temperaturile până la, sau peste temperatura corpului). După cum va recunoaște o persoană de specialitate în domeniu, o astfel de stabilitate îmbunătățită în ceea ce privește stresul, care este greu de evitat în practica clinică, face constructul de anticorp mai sigur deoarece vor apărea mai puține produse de degradare în practica clinică. În consecință, stabilitate crescută menționată înseamnă siguranță sporită.

Un exemplu de realizare furnizează constructul de anticorp conform invenției, sau constructul de anticorp produs conform procedurii invenției pentru utilizare în prevenirea, tratamentul sau ameliorarea unei tulburări a celulelor B corelată cu expresia BCMA, sau supraexpresia BCMA, o tulburare a celulelor plasmactice și o boala autoimuna.

Formulările descrise aici sunt utile ca compoziții farmaceutice în tratamentul, ameliorarea și/sau prevenirea stării medicale patologice descrise aici la un pacient care are nevoie de aceasta. Termenul "tratament" se referă atât la tratament terapeutic, cât și la măsuri profilactice sau preventive. Tratamentul include aplicarea sau administrarea formulării pe corp, un țesut izolat, sau o celulă de la un pacient care are o boală/tulburare, un simptom al unei boli/tulburări, sau o predispoziție către o boală/tulburare, cu scopul de a trata, vindeca, atenua, ameliora, modifica, remedia, ameliora, îmbunătăți sau afecta boala, simptomul bolii sau predispoziția către boală.

Termenul "ameliorare" așa cum este utilizat aici se referă la orice îmbunătățire a stării de boală a unui pacient care are o boală așa cum este specificată aici mai jos, prin administrarea unui construct de anticorp conform invenției unui subiect care are nevoie de aceasta. O astfel de îmbunătățire poate fi văzută și ca o încetinire sau oprire a progresiei bolii pacientului. Termenul "prevenire", așa cum este utilizat aici, înseamnă evitarea apariției sau reapariției la un pacient care are o tumoră sau cancer, sau un cancer metastatic așa cum este specificat aici mai jos, prin administrarea unui construct de anticorp conform invenției la un subiect care are nevoie de acesta.

Termenul "boală" se referă la orice afecțiune care ar beneficia de tratamentul cu constructul de anticorp sau compoziția farmaceutică descrisă aici. Aceasta include tulburări sau boli cronice și acute, inclusiv acele stări patologice care predispun mamiferul la boala în cauză.

Un "neoplasm" este o creștere anormală a țesutului, de obicei, dar nu întotdeauna, formând o masă. Când se formează și o masă, aceasta este denumită în mod obișnuit "tumoră". Neoplasmele sau tumorile sau pot fi benigne, potențial maligne (precanceroase) sau maligne. Neoplasmele maligne sunt denumite în mod obișnuit cancer. De obicei, invadează și distrug țesutul din jur și pot forma metastaze, adică se răspândesc în alte părți, țesuturi sau organe ale corpului. Prin urmare, termenul "cancer

metastatic" cuprinde metastaze la alte țesuturi sau organe decât cel al tumorii inițiale. Limfoamele și leucemiile sunt neoplasme limfoide. Pentru scopurile prezentei invenții, ele sunt de asemenea cuprinse de termenii "tumoare" sau "cancer".

Termenul "boală virală" descrie boli, care sunt rezultatul unei infecții virale a unui subiect.

Termenul "tulburare imunologică" așa cum este utilizat aici descrie în conformitate cu definiția comună a acestui termen tulburări imunologice, cum ar fi, boli autoimune, hipersensibilități, deficiențe imune.

În tulburările celulelor plasmatică, o clonă de celule plasmatică se înmulțește necontrolat. Ca rezultat, această clonă produce cantități mari dintr-un singur anticorp (monoclonal) cunoscut sub numele de proteină M. În unele cazuri, cum ar fi, gamopatiile monoclonale, anticorpul produs este incomplet, constând doar din lanțuri ușoare sau lanțuri grele. Aceste celule plasmatică anormale și anticorpii pe care îi produc sunt de obicei limitate la un singur tip.

De preferință, afecțiunea celulelor plasmatică este selectată din grupul care constă din mielom multiplu, plasmocitom, leucemie cu celule plasmatică, macroglobulinemie, amiloidoză, macroglobulinemie Waldenstrom, plasmacitom osos solitar, plasmacitom extramedular, mielom osteosclerotic, boli ale lanțului greu, gamopatie monoclonală de semnificație nedeterminată, mielom multiplu necrotic. Tulburările celulelor B pot fi, de asemenea, selectate din grupul care constă din limfom non-Hodgkin cu celule B, leucemie limfocitară cronică și limfom Hodgkin.

Boala autoimună este, de ex., lupusul eritematos sistemic (LES), sau artrita reumatoidă (RA).

Termenii "subiect care are nevoie" sau cei "care au nevoie de tratament" îi includ pe cei care suferă deja de tulburare, precum și pe cei la care tulburarea urmează să fie prevenită. Subiectul aflat în nevoie sau "pacientul" include subiecți umani și alte mamifere care primesc fie tratament profilactic, fie tratament terapeutic.

Constructul de anticorpi conform invenției va fi proiectat în general pentru căi și metode specifice de administrare, pentru doze și frecvențe specifice de administrare, pentru tratamente specifice ale bolilor specifice, cu intervale de biodisponibilitate și persistență, printre altele. Materialele compoziției sunt de preferință formulate în concentrații care sunt acceptabile pentru locul de administrare.

Formulările și compozițiile pot fi astfel concepute în conformitate cu invenția pentru eliberare prin orice cale de administrare adecvată. În contextul prezentei invenții, căile de administrare includ, dar nu sunt limitate la

- căi topice (cum ar fi, epicutanat, inhalare, nazal, oftalmic, auricular/aural, vaginal, mucoase);
- căi enterale (cum ar fi, orală, gastrointestinală, sublinguală, sublabială, bucală, rectală); și
- căi parenterale (cum ar fi, intravenoasă, intraarterială, intraosoasă, intramusculară, intracerebrală, intracerebroventriculară, epidurală, intratecală, subcutanată, intraperitoneală, extra-amniotică, intraarticulară, intracardiacă, intradermică, intralezională, intrauterină, intravezicală, intravitreală, transdermică, intravezicală, intravitreală, transdermică, intranasală, transmucozală, intrasinovială, intraluminală).

Compozițiile farmaceutice și constructul de anticorp din această invenție sunt deosebit de utile pentru administrare parenterală, de ex., administrare subcutanată sau intravenoasă, de exemplu, prin injecție, cum ar fi, injecția în bolus sau prin perfuzie, cum ar fi, perfuzia continuă. Compozițiile farmaceutice pot fi administrate folosind un dispozitiv medical. Exemple de dispozitive medicale pentru administrarea compozițiilor farmaceutice sunt descrise în brevetele U.S. nr. 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; și 5.399.163.

În special, prezenta invenție asigură o administrare neîntreruptă a compoziției adecvate. Ca exemplu nelimitat, administrarea neîntreruptă sau substanțial neîntreruptă, adică administrarea continuă poate fi realizată printr-un mic sistem de pompare purtat de pacient pentru măsurarea aflului de agent terapeutic în corpul pacientului. Compoziția farmaceutică care cuprinde constructul de anticorp conform invenției poate fi administrată prin utilizarea sistemelor de pompă menționate. Astfel de sisteme de pompă sunt în general cunoscute în domeniu și se bazează în mod obișnuit pe schimbul periodic de cartușe care conțin agentul terapeutic care urmează să fie perfuzat. Când se schimbă cartușul într-un astfel de sistem de pompare, poate apărea o întrerupere temporară a fluxului, altfel neîntrerupt, de agent terapeutic în corpul pacientului. Într-un astfel de caz, faza de administrare înainte de înlocuirea cartușului și faza de administrare care urmează înlocuirii cartușului ar fi încă considerate în sensul mijloacelor și metodelor farmaceutice ale invenției că alcătuiesc împreună o "administrare neîntreruptă" a unui astfel de agent terapeutic.

Administrarea continuă sau neîntreruptă a constructelor de anticorpi conform invenției poate fi intravenoasă sau subcutanată prin intermediul unui dispozitiv de livrare a fluidului sau a unui sistem mic de pompare, incluzând un mecanism de antrenare a fluidului pentru scoaterea fluidului dintr-un rezervor și un mecanism de acționare pentru acționarea mecanismului de acționare. Sistemele de pompare pentru

administrare subcutanată pot include un ac, sau o canulă pentru pătrunderea în pielea unui pacient și pentru eliberarea compoziției adecvate în corpul pacientului. Sistemele de pompare menționate pot fi fixate direct sau atașate de pielea pacientului, independent de o venă, arteră sau vas de sânge, permițând astfel un contact direct între sistemul de pompare și pielea pacientului. Sistemul de pompare poate fi atașat de pielea pacientului timp de 24 de ore până la câteva zile. Sistemul de pompare poate fi de dimensiuni mici, cu un rezervor pentru volume mici. Ca exemplu nelimitator, volumul rezervorului pentru compoziția farmaceutică adecvată care urmează să fie administrată poate fi între 0,1 și 50 ml.

Administrarea continuă poate fi, de asemenea, transdermică prin intermediul unui plastru purtat pe piele și înlocuit la intervale de timp. Unui specialist în domeniu îi sunt cunoscute sistemele de platuri pentru livrarea medicamentelor adecvate pentru acest scop. Este de remarcat faptul că administrarea transdermică este în mod deosebit susceptibilă de administrare neîntreruptă, deoarece schimbul unui prim plastru epuizat poate fi realizat în mod avantajos simultan cu plasarea unui nou, al doilea plastru, de exemplu, pe suprafața pielii imediat adiacentă primului plastru epuizat și imediat înainte de îndepărtarea primului plastru epuizat. Problemele de întrerupere a fluxului sau defecțiunea celulei de alimentare nu apar.

Dacă compoziția farmaceutică a fost liofilizată, materialul liofilizat este mai întâi reconstituit într-un lichid adecvat înainte de administrare. Materialul liofilizat poate fi reconstituit în, de ex., apă bacteriostatică pentru injecție (BWFI), soluție salină fiziologică, soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau aceeași formulare în care era proteina înainte de liofilizare.

Compozițiile din prezenta invenție pot fi administrate subiectului într-o doză adecvată care poate fi determinată, de ex., prin studii de creștere a dozei prin administrarea de doze crescând din constructul de anticorp conform invenției care prezintă specificitate între speciile descrise aici pentru primatelor non-cimpanzee, de exemplu, macaci. După cum s-a arătat anterior, constructul de anticorp conform invenției care prezintă specificitate între speciile descrise aici poate fi utilizat în mod avantajos în formă identică în testarea preclinică la primat non-cimpanzee și ca medicament la oameni. Regimul de dozare va fi determinat de medicul curant și de factorii clinici. După cum este bine cunoscut în domeniul medical, dozele pentru orice pacient depind de mulți factori, inclusiv dimensiunea pacientului, suprafața corpului, vârsta, compusul particular care trebuie administrat, sexul, timpul și calea de administrare, starea generală de sănătate și alte. medicamente care sunt administrate concomitent.

Termenul "doză eficientă" sau "dozare eficientă" este definit ca o cantitate suficientă pentru a obține sau a obține cel puțin parțial efectul dorit. Termenul "doză eficientă terapeutică" este definit ca o cantitate suficientă pentru a vindeca sau cel puțin a opri parțial boala și complicațiile acesteia la un pacient care suferă deja de boală. Cantitățile sau dozele eficiente pentru această utilizare vor depinde de afecțiunea care trebuie tratată (indicația), constructul de anticorp administrat, contextul și obiectivele terapeutice, severitatea bolii, terapia anterioară, istoricul clinic al pacientului și răspunsul la agentul terapeutic, calea de administrare, dimensiunea (greutatea corporală, suprafața corpului sau dimensiunea organului) și/sau starea (vârsta și starea generală de sănătate) a pacientului și starea generală a propriului sistem imunitar al pacientului. Doza adecvată poate fi ajustată în funcție de hotărârea medicului curant, astfel încât să poată fi administrată pacientului o dată, sau peste o serie de administrări și pentru a obține efectul terapeutic optim.

O doză tipică poate varia de la aproximativ 0,1 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 30 mg/kg sau mai mult, în funcție de factorii menționați anterior. În exemplele de realizare specifice, doza poate varia de la 1,0 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 20 mg/kg , opțional de la 10 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 10 mg/kg sau de la 100 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 5 mg/kg .

O cantitate eficientă terapeutică dintr-un construct de anticorp conform invenției are ca rezultat, de preferință, o scădere a severității simptomelor bolii, o creștere a frecvenței sau a duratei perioadelor fără simptome ale bolii, sau o prevenire a deteriorării sau a dizabilității din cauza afecțiunii bolii. Pentru tratarea bolilor care se corelează cu expresia BCMA așa cum s-a descris aici anterior, o cantitate eficientă terapeutică din constructul de anticorp conform invenției, aici: un construct de anticorp anti-BCMA/anti-CD3, de preferință inhibă creșterea celulelor, sau creșterea tumorii cu cel puțin aproximativ 20%, cel puțin aproximativ 40%, cel puțin aproximativ 50%, cel puțin aproximativ 60%, cel puțin aproximativ 70%, cel puțin aproximativ 80% sau cel puțin aproximativ 90% în raport cu pacienții netratați. Capacitatea unui compus de a inhiba creșterea tumorii poate fi evaluată într-un model predictiv de animal al eficacității.

Compoziția farmaceutică poate fi administrată ca unic terapeutic, sau în combinație cu terapii suplimentare, cum ar fi, terapiile anticancer, după cum este necesar, de ex., alte medicamente proteice și neproteice. Aceste medicamente pot fi administrate simultan cu compoziția care cuprinde constructul de anticorp conform invenției așa cum este definit aici, sau separat, înainte sau după administrarea constructului de anticorp menționat în intervale și doze definite în timp util.

Termenul "doză eficientă și netoxică" așa cum este utilizat aici se referă la o doză tolerabilă dintr-un construct de anticorp inventiv care este suficient de mare pentru a provoca epuizarea celulelor

patologice, eliminarea tumorii, contracția tumorii sau stabilizarea bolii fără, sau în esență fără efecte toxice majore. Astfel de doze eficiente și netoxice pot fi determinate de ex., prin studiile de creștere a dozei descrise în domeniu și ar trebui să fie sub doza care induce evenimente secundare adverse severe (toxicitate care limitează doza, DLT).

Termenul "toxicitate" așa cum este utilizat aici se referă la efectele toxice ale unui medicament manifestate în evenimente adverse sau evenimente adverse severe. Aceste evenimente secundare se pot referi la o lipsă de tolerabilitate a medicamentului în general și/sau o lipsă de toleranță locală după administrare. Toxicitatea poate include, de asemenea, efecte teratogene sau carcinogene cauzate de medicament.

Termenul "siguranță", "siguranță în vivo" sau "tolerabilitate" așa cum este utilizat aici definește administrarea unui medicament fără a induce evenimente adverse severe direct după administrare (toleranță locală) și pe o perioadă mai lungă de aplicare a medicamentului. "Siguranța", "siguranța în vivo" sau "tolerabilitatea" pot fi evaluate, de ex., la intervale regulate în timpul tratamentului și perioadei de urmărire. Măsurătorile includ evaluarea clinică, de ex., manifestări ale organelor și screening-ul anomaliilor de laborator. Evaluarea clinică poate fi efectuată și abaterile de la constatările normale înregistrate/codificate conform standardelor NCI-CTC și/sau MedDRA. Manifestările de organe pot include criterii, cum ar fi, alergii/imunologie, sânge/măduvă osoasă, aritmie cardiacă, coagulare și altele asemenea, așa cum este stabilit de ex., în Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE). Parametrii de laborator care pot fi testați includ, de ex., hematologia, chimia clinică, profilul de coagulare și analiza urinei și examinarea altor fluide corporale, cum ar fi, ser, plasmă, lichid limfoid sau spinal, soluție și altele asemenea. Siguranța poate fi astfel evaluată de ex., prin examen fizic, tehnici imagistice (de ex., ultrasunete, raze X, tomografii, imagistica prin rezonanță magnetică (MSI), alte măsuri cu dispozitive tehnice (de ex. electrocardiogramă), semne vitale, prin măsurarea parametrilor de laborator și înregistrarea evenimentelor adverse. De exemplu, evenimentele adverse la primatelor non-cimpanzee în utilizările și metodele conform invenției pot fi examinate prin metode histopatologice și/sau histochimice.

Termenii de mai sus se referă, de asemenea la, de ex. în evaluarea preclinică a siguranței produselor farmaceutice derivate din biotehnologie S6; Harmonised Tripartite Guideline; ICH Reuniunea Comitetului Director al ICH din 16 iulie 1997.

În cele din urmă, invenția furnizează o trusă care cuprinde un construct de anticorp conform invenției, sau produs conform procedurii invenției, o compoziție farmaceutică conform invenției, o polinucleotidă conform invenției, un vector conform invenției și/sau o celulă gazdă conform invenției.

În contextul prezentei invenții, termenul "trusă" înseamnă două sau mai multe componente - dintre care una corespunzând constructului de anticorp, compoziției farmaceutice, vectorului sau celei gazdă a invenției - ambalate împreună într-un container, recipient sau altceva asemănător. O trusă poate fi astfel descrisă ca un set de produse și/sau ustensile care sunt suficiente pentru a atinge un anumit obiectiv, care poate fi comercializat ca o singură unitate.

Trusa poate cuprinde unul sau mai multe recipiente (cum ar fi, flacoane, fiole, recipiente, seringi, sticle, pungi) de orice formă, dimensiune și material adecvat (de preferință impermeabil, de exemplu, plastic sau sticlă) care conține constructul de anticorp sau compoziția farmaceutică a prezentei invenții într-o doză adecvată pentru administrare (vezi mai sus). Trusa poate conține în plus instrucțiuni de utilizare (de ex., sub forma unui prospect sau manual de instrucțiuni), mijloace pentru administrarea constructului de anticorp conform prezentei invenții, cum ar fi, o seringă, pompă, un perfuzor sau altele asemenea, mijloace pentru reconstituirea constructului de anticorp conform invenției și/sau mijloace pentru diluarea constructului de anticorp conform invenției.

Invenția furnizează, de asemenea, truse pentru o unitate de administrare cu doză unică. Trusa conform invenției poate conține, de asemenea, un prim recipient care cuprinde un construct de anticorp uscat/lioofilizat și un al doilea recipient care cuprinde o formulare apoasă. În anumite exemple de realizare ale acestei invenții, sunt prevăzute truse care conțin seringi preumplute cu o singură cameră și cu mai multe camere (de ex., se asigură seringi lichide și lioseringi).

Trebuie remarcat faptul că, așa cum sunt utilizate aici, formele de singular "o", "un", și "acel" includ referințe la plural, cu excepția cazului în care contextul indică în mod clar altfel. Astfel, de ex., referirea la "un reactiv" include unul sau mai mulți dintre astfel de reactivi diferiți și referirea la "metodă" include referirea la etapele și metodele echivalente cunoscute de persoanele de specialitate în domeniu care ar putea fi modificate sau înlocuite cu metodele descrise aici.

Dacă nu se indică altfel, termenul "cel puțin" care precedă o serie de elemente trebuie înțeles ca se referă la fiecare element din serie. Specialiștii în domeniu vor recunoaște, sau vor fi capabili să stabilească folosind nu mai mult decât experimente de rutină, multe echivalente cu exemplele de realizare specifice ale invenției descrise aici.

Termenul "și/sau" oriunde este utilizat aici include semnificația "și", "sau" și "toate sau orice altă combinație a elementelor legate de termenul menționat".

Termenul "circa" sau "aproximativ" așa cum este utilizat aici înseamnă în intervalul de 20%, de preferință în intervalul de 10%, și mai preferabil în intervalul de 5% dintr-o valoare, sau un interval dat. Acesta include, totuși, și numărul concret, de ex., aproximativ 20 include 20.

Termenul "mai mic decât" sau "mai mare decât" include numărul concret. De ex., mai puțin de 20 înseamnă mai puțin sau egal cu. În mod similar, mai mult decât sau mai mare decât înseamnă mai mult sau egal cu, sau mai mare decât sau, respectiv, egal cu.

Pe parcursul acestei specificații și al revendicărilor care urmează, cu excepția cazului în care contextul cere altfel, cuvântul "cuprind", și variații precum "cuprinde" și "care cuprinde", va fi înțeles ca implicând includerea unui număr întreg declarat, sau a unei etape, sau a unui grup de numere întregi, sau pași, dar nu excluderea oricărui alt întreg, sau etapă, sau grup de întreg, sau pas. Atunci când este utilizat aici, termenul "care cuprinde" poate fi substituit cu termenul "care conține" sau "care include" sau uneori când este utilizat aici cu termenul "având".

Când este utilizat aici, "care constă din" exclude orice element, etapă sau ingredient nespecificat în elementul revendicat. Când este utilizat aici, "care constă în esență din" nu exclude materiale sau etape care nu afectează în mod semnificativ caracteristicile de bază și noi ale revendicării.

În fiecare caz de aici, oricare dintre termenii "care cuprinde", "care constă în esență din" și "care constă din" poate fi înlocuit cu oricare dintre ceilalți doi termeni.

Trebuie înțeles că această invenție nu este limitată la metodologia, protocoalele, materialul, reactivii și substanțele, etc., descrise aici și ca atare poate varia. Terminologia utilizată aici are doar scopul de a descrie exemple de realizare particulare și nu are scopul de a limita domeniul de aplicare al prezentei invenții, care este definită exclusiv prin revendicări.

O mai bună înțelegere a prezentei invenții și a avantajelor acesteia va fi obținută din următoarele exemple, oferite doar în scopuri ilustrative. Exemplele nu sunt destinate să limiteze în niciun fel scopul prezentei invenții. Exemplele descrise mai jos pot fi efectuate în mod similar, adică urmând aceleași protocoale, cu alte constructe de anticorpi bispecifici conform invenției.

Exemplul 1: BiTE® a indus expresia CD69 pe celulele T în absența celulelor țintă

PBMC izolate de la donatori umani sănătoși au fost cultivate cu constructe de anticorpi bispecifici Țintă B/CD3 sau Țintă A/CD3 HLE în creștere timp de 48 h. Expresia markerului de activare CD69 pe celulele T a fost determinată prin imunocolorare și citometrie în flux și conjugate specifice antigenului mAb.

Activarea celulelor T independentă de țintă în ceea ce privește suprareglarea CD69 a fost observată pentru toate constructele anti-CDH 19, dar a fost cea mai pronunțată pentru moleculele heteroFc și corp încrucișat. Supreglarea CD69 de către anti-Țintă B-scFc a avut loc la concentrații mai mari și amplitudinea a fost parțial mai mică în comparație cu celelalte două constructe pe bază de Fc.

Pentru anti-ținta A, aproape nicio activare a celulelor T independentă de țintă nu a fost observată pentru molecula care conține scFc, în timp ce constructul heteroFc a indus o reglare puternică a CD69 pe celulele T de la suprafața celulei în absența celulelor țintă.

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de constructele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, sau fuziune hetero-Fc la capătul C-terminal s-a evaluat pentru următoarele constructe:

constructe BiTE® (diluții în serie: 0,1 pM - 2 μM)

a. Țintă A-I2C scFc; 1,14 mg/ml;

b. Țintă A Hetero Fc; 1,02 mg/

Celule efectoare PBMC umane (3 donatori; #065, #823, #836 (scFc) #401, #415, #433 (heteroFc); #590, #595, 598, #605 (corp X)).

48 h timpul de incubare.

Determinarea exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ cu citometru de flux și conjugate antigen-specifice mAb. Rezultate vezi Figura 2.

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de constructele de anticorpi BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, hetero-Fc sau fuziune de corp încrucișată la capătul C-terminal a fost evaluată pentru următoarele constructe:

constructe BiTE® (diluții în serie: 0,1 pM - 2 μM)

c. Țintă B × I2C-scFc; 245,3 μg/mL (

d. Target B Hetero FC; 1 mg/ml

e. Țintă B corp încrucișat; 6,3 mg/ml

Celule efectoare PBMC umane (3 până la 4 donatori; #386, #392, #401 (scFc) #282, #284, #287 (heteroFc)).

48 h timpul de incubare.

Determinarea exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ cu citometru de flux și conjugate antigen-specifice mAb. Rezultate vezi Figura 3.

Activarea celulelor T independentă de țintă în ceea ce privește suprareglarea CD69 a fost observată pentru mai multe constructe bispecifice testate în aceste teste. Supreglarea CD69 a fost în

general mai pronunțată pentru constructele de anticorpi BiTE® canonic, heteroFc și corp încrucișat în comparație cu constructele scFc respective. Supreglarea CD69 de către constructele scFc a avut loc în general la concentrații puțin mai mari, iar amplitudinea a fost parțial mai mică în comparație cu celelalte două constructe pe bază de Fc.

Pentru constructul scFc anti-Țintă B, nu a fost observată nicio activare a celulelor T independentă de țintă, în timp ce constructele heteroFc și X-Body au indus o reglare puternică a CD69 pe suprafața celulei celulelor T în absența celulelor țintă.

În plus, nu s-a observat nicio suprareglare a CD69 independentă de celula țintă în testele care utilizează constructe anti-Țintă C și anti-Țintă G. Datorită exprimării țintei pe celulele liniei mieloide, aceste celule au fost îndepărtate înainte de stabilirea testului. Aceste date indică faptul că o interacțiune a regiunilor Fc ale constructelor bispecifice cu celulele care exprimă FcγR ar putea fi responsabilă pentru inducerea independentă de țintă a CD69 pe celulele T.

Suprareglarea puternică a CD69 pe celulele T de către constructul anti-Țintă H-scFc în absența celulelor tumorale se datorează exprimării Țintei H pe celulele T.

Materiale si metode

1. Ținta I

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de o moleculă BiTE® care conține un singur lanț-Fc pentru următorul construct:

1. Constructul de anticorp BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)

1. Țintă I-scFc

2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)

3. 48 h timpul de incubare

4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ folosind un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

2. Ținta D

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de moleculele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, hetero-Fc sau fuziune de corp încrucișat la capătul C-terminal a fost evaluată pentru următoarele constructe:

1. constructe de anticorpi BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)

1. Țintă D-hetFc (hetero-Fc)

2. Țintă D-scFc

3. Țintă D-X-Body (Țintă D Corp încrucișat)

2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)

3. 48 h timpul de incubare

4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ folosind un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

3. Ținta C

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de moleculele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, hetero-Fc sau fuziune corp încrucișat la capătul C-terminal a fost evaluată pentru următoarele constructe:

1. constructe de anticorpi BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)

1. Țintă C-canonice

2. Țintă C-scFc

3. Țintă C-hetFc

4. Țintă C-X-Body

2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)

3. 48 h timpul de incubare

4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ folosind un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

4. Ținta B

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de moleculele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, hetero-Fc sau fuziune corp încrucișat la capătul C-terminal a fost evaluată pentru următoarele constructe:

1. constructe de anticorpi BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)

1. Țintă B-scFc

2. Țintă B-hetFc

3. Țintă B-X-Body

2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)

3. 48 h timpul de incubare

4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

5. Ținta A

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de moleculele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, hetero-Fc sau fuziune corp încrucișat la capătul C-terminal a fost evaluată pentru următoarele constructe:

- 5 1. constructe de anticorpi BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)
 1. Țintă A-scFc
 2. Țintă A-hetFc
 3. Țintă A-X-Body
2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)
- 10 3. 48 h timpul de incubare
4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

6. Ținta F

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de moleculele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc sau un hetero-Fc au fost evaluate pentru următoarele constructe:

- 15 1. constructe de anticorpi BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)
 1. Țintă F-canonice
 2. Țintă F-scFc
 3. Țintă F-hetFc
- 20 2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)
3. 48 h timpul de incubare
4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

7. Ținta E

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de moleculele BiTE® care conțin un singur lanț-Fc, sau un hetero-Fc a fost evaluată pentru următoarele constructe:

- 25 1. constructe de anticorpi BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)
 1. Țintă E-canonice
 2. Țintă E-scFc
 - 30 3. Țintă E-hetFc
2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)
3. 48 h timpul de incubare
4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

8. Ținta H

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de o moleculă BiTE® care conține un singur lanț-Fc a fost evaluată pentru următorul construct:

- 35 1. Construct de anticorp BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)
 1. Țintă H-scFc
- 40 2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori)
3. 48 h timpul de incubare
4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

9. Ținta G

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de o moleculă BiTE® care conține un singur lanț-Fc a fost evaluată pentru următorul construct:

- 45 1. Construct de anticorp BiTE® (diluții în serie: 1,3 pM — 20 nM)
 1. Țintă G-scFc
2. Celule efectoare PBMC umane (3 donatori; celule epuizate CD14⁺/CD33⁺)
- 50 3. 48 h timpul de incubare
4. Analiza citometrică în flux a exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ utilizând un mAb conjugat PE-Cy7 specific pentru CD69.

Exemplul 2:

Constructele de anticorpi BiTE® purificate au fost acoperite pe o placă Maxisorb în concentrație descrescătoare (100 nM, diluții 1:4). După spălare de 3 ori cu PBS-T și blocare cu PBS/3% (g/v) BSA (60 min, 37°C), plasma umană reunită a fost incubată timp de 60 min, 80 rpm la temperatura camerei. După spălare de 3 ori, a fost adăugat un anticorp monoclonal de șoarece specific pentru subunitatea A C1q umană (CC1q) (Thermo MA1-83963, 1:500) timp de 60 min, 80 rpm, temperatura camerei, după etapele de spălare descrise, un mAb Fc-POX de capră anti șoarece (1:5.000) a fost incubat timp de 60 min, 80 rpm, temperatura camerei. După spălare suplimentară, substratul TMB a fost incubat și oprit după reacția colorimetrică prin adăugare de H₂SO₄. Absorbția a fost determinată la 450 nm.

Rezultat: După cum se arată în figura 4, la concentrații mari, constructul BiTE® hetero Fc (pătrate) a arătat semnale de legare mai mari pentru CC1q uman în comparație cu un construct BiTE® un singur lanț Fc (triunghi). Ca martor negativ un a fost utilizat BiTE canonic® (cerc), care nu a arătat nicio legare semnificativă a CC1q.

Exemplul 3: Farmacocinetica constructelor de anticorpi BiTE® fuzionate cu modalitățile de extindere a timpului de înjumătățire

Diverse ținte de legare a constructelor de anticorpi BiTE® au fost fuzionate cu patru fragmente diferite de extindere a timpului de înjumătățire. Toate variantele HLE diferite disponibile pe anticorpii BiTE® au fost testate la maimuța cynomolgus în contextul studiilor farmacocinetice (PK). Acestea sunt ulterior denumite BiTE®-scFc, BiTE®-hetFc, BiTE®-HALB, BiTE®-Xbody, conform modalității de extindere a timpului de înjumătățire atașată liantului țintă. Molecula BiTE® non-HLE® este denumită BiTE® "canonic". Nomenclatura corespunzătoare a acestor molecule este rezumată pe scurt în Tabelul 4 de mai jos.

Tabelul 4 Nomenclatura compusă a moleculelor BiTE® dozate unic

Compus sinonim	Denumire compus test
Compus 1a	Țintă C -scFc
Compus 1b	Țintă C -hetFc
Compus 1c	Țintă C-HALB
Compus 2a	Țintă A -scFc
Compus 2b	Țintă A -hetFc
Compus 2c	Țintă A-HALB
Compus 2d	Țintă A-Xbody
Compus 3a	Țintă B-scFc
Compus 3b	Țintă B -hetFc
Compus 3c	Țintă B-HALB
Compus 3d	Țintă B-H6
Compus 4a	Țintă D-scFc
Compus 4b	Țintă D-hetFc
Compus 5a	Țintă E -scFc
Compus 5b	Țintă E -hetFc
Compus 5c	Țintă E-HALB
Compus 6a	Țintă F-scFc
Compus 6b	Țintă F-HALB
Compus 7	Țintă G-scFc
Compus 8	Țintă H-scFc
Compus 9	Țintă I cc-scFc
Compus 10a	BCMA (cc)-scFc
Compus 10b	BCMA (BiTE® canonic)

Moleculele BiTE® au fost administrate sub formă de bolus intravenos (compușii 1b, 2a-d, 3a/b, 4a/b, 5a-5c, 7-9) și perfuzie intravenoasă (compușii 1a, 1c, 3c/d, 6a/b, fiecare ca perfuzie de 30 min). Moleculele BiTE® au fost administrate într-un interval de dozare liniar, relevant din punct de vedere farmacocinetic, de la 3 μg/kg până la 6 μg/kg, 12 μg/kg și, respectiv, 15 μg/kg. Compusul 10a a fost administrat ca injecție intravenoasă scurtă, în bolus, constructul canonic (compusul 10b) ca o perfuzie intravenoasă continuă. Pentru a compara parametrii farmacocinetici pentru ambii compuși 10a și 10b, numai faza terminală care începe direct după terminarea perfuziei este prezentată în Figura 5 pentru BCMA-BiTE® canonic. Moleculele BCMA BiTE® au fost administrate într-un interval de dozare liniar, relevant farmacocinetic, de 15 pg/kg. Din motive de comparabilitate, concentrațiile serice prezentate în

Figura 5 sunt normalizate în funcție de doză și de greutate moleculară (descrise în nmol). Pentru fiecare dintre compușii numiți mai sus a fost utilizat un grup de cel puțin două până la trei animale. S-au recoltat probe de sânge și s-a preparat ser pentru determinarea concentrațiilor serice. Nivelurile de anticorpi Ser BiTE® au fost măsurate utilizând un imunotest. Nivelurile Ser BCMA BiTE® au fost măsurate folosind un imunotest care utilizează o pereche de anticorpi anti-CD3 idiotip pentru acoperirea și detectarea moleculelor BiTE®. Profilurile concentrației serice-timp au fost utilizate pentru a determina parametrii PK. Configurația adecvată a studiului a fost ajustată la caracteristicile moleculei BiTE®: fie o durată de 1 săptămână, fie o durată de 2 săptămâni. Momentele pentru prelevarea probelor de sânge pot varia ușor și sunt enumerate pentru ambele configurații în Tabelul 5 de mai jos.

Tabelul 5 Momentele pentru prelevarea probelor de sânge în timpul studiului PK. Momentele pot varia între studiile individuale. Momentele marcate cu un asterisc au fost obligatorii și comune pentru toate studiile

	momente de prelevare a probelor de sânge pentru durata studiului de 1 săptămână [h]	momente de prelevare a probelor de sânge pentru durata studiului de 2 săptămâni [h]	momente pentru prelevarea probelor de sânge pentru compusul 10a; [h] după începerea perfuziei	momente pentru prelevarea probelor de sânge pentru compusul 10b; [h] după începerea perfuziei
	0,05/0,085*	0,05/0,085*	0,085	
	0,25	0,25	0,25	
	0,5	0,5	0,5	
	1	1	1	
	2	2		
	4*	4*	4	
	8	8	8	
	24 16	16		
	24*	24*	24	
	48*	48*	48	
	72*	72*	72	
	96	96		
	120	120		
	144	144		
	168*	168*	168	168,00
		216		169,01
		240	240	172,01
		264		175,99
		336*	336	180,00

Farmacocinetica moleculelor BiTE®-HLE este prezentată exemplificativ în Tabelul 6. Fiecare grup de compuși reprezintă aceeași proteină BiTE® fuzionată cu un format scFc-, un hetFc-, un HSA- (albumină serică umană, HALB), sau un format Corp încrucișat-Fc, sau lăsat ca moleculă BiTE® canonică. Pentru toate proteinele, nivelurile serice au fost cuantificabile pentru toate momentele de timp la toate animalele după administrarea moleculei BiTE®. Profilurile PK descriu o scădere bifazică, exponențială după fiecare dintre administrările de un singur element de testare.

Parametrii farmacocinetici au fost determinați folosind metode standard de analiză necompartimentală (NCA). Utilizând analiza necompartimentală, s-au estimat următorii parametri PK: AUC_{inf} (Aria de sub curba concentrație seric-timp), Vss (volum de distribuție la starea de echilibru), CL (eliminare sistemică) și t_{1/2} terminal (timp de înjumătățire terminal). Parametrii PK pentru fiecare compus testat sunt rezumați ca medie a n=2 și respectiv n=3, în Tabelul 6 de mai jos.

Tabelul 6 Parametrii farmacocinetici ai diferitelor variante de HLE din diferiți lianți țintă BiTE® la maimuțele cynomolgus.

obiect de testat	t _{1/2} terminal [h]	AUC _{inf} Normalizat la 15 µg/kg [h*ng/mL]	Cl [mL/h/kg]	Vss [mL/kg]
Compus 1a	167	9981	1,4	256
Compus 1b	95	6159	2,4	235
Compus 1c	47	4498	3,3	161
Compus 2a	213	41173	0,4	89
Compus 2b	116	18745	0,8	78
Compus 2c	77	28928	1,0	65
Compus 2d	77	9825	1,5	112
Compus 3a	61	4109	3,7	129
Compus 3b	59	4561	3,3	78
Compus 3c	51	2769	6,8	299
Compus 3d	3	510	30,0	653
Compus 4a	97	7816	1,9	181
Compus 4b	62	3606	4,2	292
Compus 5a	234	30954	0,5	144
Compus 5b	173	18299	0,8	166
Compus 5c	142	26418	0,6	103
Compus 6a	97	15854	1,0	103
Compus 6b	48	77271	1,0	64
Compus 7	64	1971	7,6	395
Compus 8	122	17093	0,9	119
Compus 9	210	6729	2,2	540
Compus 10a	112	18772	0,8	110
Compus 10b	3	1677	62,6	5268

De obicei, profilul PK pentru moleculele BCMA-BiTE canonic® descrie un profil de concentrație serică în scădere foarte abruptă legat de mecanismul de eliminare a acestor proteine canionice. Timpul de înjumătățire a BiTE extins care țintește BCMA®-scFc prezintă un declin bifazic, exponențial după administrarea unui singur articol de testat la maimuțele cynomolgus.

În general, molecula BCMA-BiTE® fuzionată la o modalitate scFc HLE (Compusul 10a) arată o AUC_{inf} medie de 18772 h*ng/mL, o valoare a eliminării sistemice de 0,8 mL/h/kg, precum și un volum de distribuție corespunzător de 110 mL/kg. Compusul 10b, BCMA canonic, fără timp de înjumătățire extins, care vizează BiTE® prezintă o eliminare ridicată de 62,6 mL/h/kg conducând la o expunere serică scăzută de 1677 h*ng/mL.

Diferențele în comportamentul farmacocinetic al celor două modalități testate BCMA BiTE® diferite descriu cuprinzător avantajul perioadei de înjumătățire extinsă a BCMA care vizează BiTE®-scFc peste versiunea canonică corespunzătoare, mai ales în ceea ce privește timpul de rezidență al substanței în organism.

În general, AUC_{inf} pentru diferiți lianți țintă BiTE® fuzionați fie cu o modalitate —scFc, o —hetFc, o HAS sau, respectiv, Corp încrucișat HLE, au variat între 1971 h*ng/mL și 77271 h*ng/mL, în funcție de contextul BiTE® țintă. Toate fuziunile HLE analizate au atins valori ale eliminării sistemice de 0,4 până la 7,6 mL/h/kg. Volumele corespunzătoare de distribuție au variat între 68 și 540 mL/kg. Compusul 3d, compusul liant țintă BiTE® canonic, fără timp de înjumătățire extins este inclus ca referință. Moleculele BiTE® fără timp de înjumătățire extins prezintă eliminări mari, expunere serică

scăzută și, în consecință, un timp de înjumătățire terminal scurt. O comparație a timpilor de înjumătățire terminali după modalități este rezumată în Tabelul 7.

Tabelul 7 Comparația timpilor de înjumătățire terminali după modalitatea investigate la maimuțele cynomolgus.

modalitatea HLE	t _{1/2} terminal [h]
BiTE® Canonic	3
BiTE®-scFc	61-234
BiTE®-hetFc	48-173
BiTE®-HALB	47-142
BiTE®-Corp încrucișat	77

După investigarea a până la patru fragmente diferite de extindere a timpului de înjumătățire (HLE) pentru fiecare BiTE® de țintire devine clar că fragmentul -scFc prezintă o creștere a t_{1/2} comparativ cu alte fragmente corespunzătoare de extindere a timpului de înjumătățire după administrarea unei doze mici unice de 6, 10, 12 și 15 μg/kg (vezi Figura 6).

Exemplul 4:

Substanțele medicamentoase preformulate care conțin Țintă A-hALB, Țintă A-hFc și, respectiv, Țintă A-scFc au fost schimbate tampon prin ultrafiltrare/diafiltrare folosind membrane cu o limită de greutate moleculară (MWCO) de 10 kDa. Formularea finală a fost realizată prin adăugarea de soluții stoc concentrate. Formulările rezultate pentru fiecare construct sunt listate în Tabelul 8. Concentrația de proteină țintă a fost de 1,0 mg/mL. Constructele Țintă A formulate au fost umplute până la 1 mL în fiole de sticlă de tip I care au fost astupate cu dopuri din cauciuc butilic și sertizate cu garnituri de aluminiu. Fiolele umplute au fost incubate la -20, 5, 25 și 37°C. O fiolă din fiecare versiune a fost supusă la cinci cicluri de înghețare și deghețare (F/T). Temperatura țintă de îngheț a fost de -29°C. Temperatura țintă de deghețare a fost de 2°C. Viteza de rampă a fost de aproximativ 0,3 K/min.

Particulele vizibile au fost evaluate în conformitate cu metoda descrisă de Ph Eur 2.9.20 de către operatori instruiți. Numărările vizuale de particule per fiolă sunt prezentate în Tabelul 8. Numărul de particule proteice vizuale (mai mare de 125 μm) a fost mai mare pentru Ținta A-hFc în comparație cu Ținta A-hALB și Ținta A-scFc țintă.

Tabelul 8: Numărul de particule proteice vizibile per fiolă pentru probele solicitate și nesolicitate (T0) care conțin diferite constructe anti-Țintă A BiTE® cu timpi de înjumătățire extinși.

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Numărul de particule proteice vizibile (> 125 μm) per fiolă					
T0	0	0	1	0	0
5 cicluri F/T	0	2	2	0	1
2w 5°C	0	2	2	0	0
2w 25°C	0	2	1	0	0
2w 37°C	0	2	2	0	0
4w -20°C	0	2	1	0	0
4w 5°C	0	1	2	0	0
4w 25°C	0	2	2	0	0
4w 37°C	0	2	2	0	0

Probele descrise mai sus au fost, de asemenea, analizate prin cromatografie de performanță ultra-înaltă cu excludere dimensională (SE-UPLC) pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). SE-UPLC s-a efectuat pe un sistem UPLC AcquityH-Class (Waters) folosind o coloană Acquity UPLC BEH200 SEC de 150 mm (Waters). Temperatura coloanei a fost setată la 25°C. Separarea variantelor de mărime a fost realizată prin aplicarea unei metode izocratice cu un debit de 0,4 mL/min. Faza mobilă a fost compusă din fosfat de sodiu 100 mM, NaCl 250 mM la pH 6,8. Durata totală de rulare este de 6,0 minute. Probele au fost ținute la 8°C în autosampler până la analiză. S-a

injectat o cantitate totală de 3 µg proteină. Pentru a evita transferul, a fost efectuată o injecție intermediară cu 40% acetonitril după fiecare probă. Detectarea s-a bazat pe emisia de fluorescență (excitație la 280 nm, emisie la 325 nm). Integrarea pic-ului a fost realizată folosind Empower® software. A fost raportată aria relativă sub curba HMWS (Tabelul 9).

Construcțiile pe bază de Fc au prezentat conținuturi mai mici de HMWS în varianta de formulare G40MSuT decât în K60RTrT, independent de starea de solcitare. A devenit evident că Ținta A-scFc a conținut mai puțin HMWS decât Ținta A-hFc atât în preparatele G40MSuT, cât și în K60RTrT. Ținta A-scFc în formularea sa preferată (G40MSuT) a fost mai puțin predispusă la formarea HMWS decât Ținta A-hALB formulată în K60RTrT. În experimentele anterioare, acest tampon a arătat un potențial de stabilizare îmbunătățit pentru construcțiile pe bază de hALB.

Tabelul 9: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele Țintă A-hALB, -hFc și -scFc sub solcitare și nesolicitate (T0) determinat prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc			scFc
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
cicluri 5 F/T	2,0	7,2	4,1	3,0	1,5
2w 5°C	n.t.	n.t.	n.t.	2,9	1,1
2w 25°C	n.t.	6,6	2,7	2,4	0,5
2w 37°C	2,6	6,3	2,1	2,7	0,3
4w -20°C	5,9	8,7	1,6	6,6	0,3
4w 5°C	2,0	8,2	2,8	3,6	0,6
4w 25°C	2,2	6,8	2,6	2,7	0,4
4w 37°C	3,5	7,6	1,9	4,3	0,3
n.t. = netestat					

Abundența modificărilor chimice la solcitarea termică (incubare la 37°C) a fost monitorizată prin cartografierea peptidelor. Probele de proteine au fost digerate enzimatic și peptidele rezultate au fost separate utilizând cromatografia în fază inversă. Eluatul coloanei a fost injectat direct în sursa de ioni a unui spectrometru de masă pentru identificarea și cuantificarea peptidelor.

Pentru a obține o acoperire maximă, au fost efectuate două digestii enzimatice separate: o dată cu tripsină și o dată cu chimotripsină. În fiecare caz, proteinele au fost denaturate cu clorură de guanidină și apoi reduse cu ditiotritol (DTT). După incubare în DTT, resturile de cisteină liberă au fost alchilate prin adăugarea de acid iodoacetic. Probele au fost apoi schimbate cu tampon în Tris 50 mM pH 7,8 pentru digestie. Tripsina și chimotripsina au fost adăugate în tuburi de reacție separate într-un raport de 1:10 (probă:enzimă) fiecare. Probele au fost digerate timp de 30 de min la 37°C și reacția a fost stinsă prin adăugarea de acid trifluoracetic.

O încărcătură de 5 µg din fiecare digerat a fost injectată separat pe o coloană cu fază inversă Zorbax SB-C18 (Agilent #859700-902) echilibrată în acid formic (FA) 0,1% (V/V). Un gradient de 156 de minute de până la 90% acetonitril care conține 0,1% FA a fost utilizat pentru a elua peptidele direct în sursa de ioni de electropulverizare a unui spectrometru de masă Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Datele au fost colectate în modul dependent de date utilizând o metodă de top 12 în care o scanare completă (rezoluție 70 000; interval de scanare 200-2000 m/z) a fost urmată de disociere prin coliziune de mare energie (HCD) a celor 12 ioni cei mai abundenți (rezoluția 17 500).

Peptidele au fost identificate pe baza spectrului de masă precis și în tandem folosind software-ul intern. Identificările au fost verificate manual. Cantitățile relative de peptide modificate și nemodificate au fost calculate pe baza abundenței de ioni folosind software-ul Pinpoint (Thermo Scientific).

Procentele modificărilor chimice ale regiunilor de determinare a complementului (CDRs) și ale porțiunii de extindere a timpului de înjumătățire (fie hALB, fie Fc) detectate în preparatele Țintă A-hALB, -hFc și -scFc sunt date în Tabelul 10. Când se compară similare condiții formulare, a devenit evident că, în general, modificările chimice au fost cel mai puțin abundente în construcțiile scFc.

Tabelul 10: Prezentare generală asupra modificărilor chimice în preparatele Țintă A-hALB, -hFc și -scFc sub solcitare și nesolicitate (T0), determinate prin maparea peptidelor

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%N101 deamidare (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
2w 37°C	0,7	0,8	3,0	0,7	3,2
4w 37°C	1,3	n.t.	8,5	n.t.	6,4
deamidare %N162 (CDR)					
Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
2w 37°C	15,9	11,6	2,7	15,0	3,3
4w 37°C	26,8	n.t.	3,7	n.t.	4,1

oxidare %M279 (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
2w 37°C	1,2	0,8	0,8	0,6	1,0
4w 37°C	0,9	n.t.	0,8	n.t.	0,6
deamidare %N348 (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
2w 37°C	20,5	21,6	1,9	9,4	1,3
4w 37°C	22,8	n.t.	2,0	n.t.	2,9

deamidare %N351 (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
2w 37°C	6,6	12,7	0,9	3,8	0,4
4w 37°C	8,7	n.t.	0,8	n.t.	0,8
oxidare %M530 (Fc)					
T0	n.a.	3,9	4,1	2,6	3,2
2w 37°C	n.a.	9,0	3,1	4,0	4,3
4w 37°C	n.a.	n.t.	3,4	n.t.	3,5

deamidare % N603 (Fc)					
T0	n.a.	1,3	1,9	1,3	1,4
2w 37°C	n.a.	7,9	4,6	7,0	5,6
4w 37°C	n.a.	n.t.	6,9	n.t.	8,1
oxidare %M706 (Fc)					
T0	n.a.	3,2	3,6	1,5	2,1
2w 37°C	n.a.	6,0	2,8	2,1	2,5
4w 37°C	n.a.	n.t.	2,6	n.t.	2,0

oxidare %M587 (hALB)					
----------------------	--	--	--	--	--

oxidare %M587 (hALB)					
T0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	2,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	2,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oxidare %M623 (hALB)					
T0	1,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	2,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	3,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

oxidare %M798 (hALB)					
T0	1,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	3,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	3,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oxidare %M829 (hALB)					
T0	8,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	42,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	44,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = nu se aplică; n.t. = netestat

Exemplul 5:

- 5 Țintele A-hALB, -hFc, -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 4 au fost supuse unui experiment de salt de pH. Concentrația materiilor prime a fost de 1,0 mg/mL. Un volum de 0,38 mL din fiecare materie primă a fost umplut într-un flacon de sticlă. După preconditionare la 37°C, soluțiile au fost adăugate cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) de 20 de ori care a fost compusă din fosfat de potasiu 0,090 M, fosfat de sodiu 0,480 M (ambii dibazici), clorură de potasiu 0,052 M și NaCl 2,76 M.
- 10 Probele cu vârf au fost incubate la 37°C timp de două săptămâni. După incubare, acestea au fost analizate prin SE-UPLC utilizând metoda descrisă în Exemplul 4 și a fost raportat conținutul procentual de HMWS (Tabelul 11). Când se compară toate structurile formulate în K60RTrT, conținutul de HMWS a crescut în următoarea ordine: hALB < scFc < hFc. Ținta A-scFc a arătat, de asemenea, un conținut de HMWS mai scăzut decât Ținta A-hFc atunci când a fost formulată în G40MSuT.
- 15 **Tabelul 11: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele solicitate (salt de pH + 2w 37°C) Țintele A-hALB, -hFc și -scFc determinate prin SE-UPLC**

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
2w 37°C	1,5	8,3	7,1	5,4	5,1

Exemplul 6:

- 20 Țintele A-hALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 4 au fost supuse la solicitare de agitare. Concentrația materiilor prime a fost de 1,0 mg/mL. Un volum de 0,5 mL din fiecare soluție a fost filtrat printr-un filtru adecvat de 0,22 μm și umplut în fiole de sticlă de 3cc. Fiolele au fost plasate într-o cutie de plastic, asigurându-se că fiolele nu au fost deplasate în cutie în timpul agitării. Cutia a fost plasată pe un agitator orbital. Probele au fost agitate la 500 rpm timp de 65 de ore. Particulele vizibile au fost evaluate în conformitate cu metoda descrisă de Ph Eur 2.9.20. Metoda a fost realizată de operatori instruiți. Numărările vizuale de particule per fiolă sunt prezentate în Tabelul 12. Particulele proteice vizibile au fost observate numai în preparatele Target A-hFc.

Tabelul 12: Numărul de particule proteice vizibile per fiolă în probele agitate

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Numărul de particule proteice vizibile (>125 µm) per flacon					
65h, 500 rpm	0	1	1	0	0

Probele de mai sus au fost, de asemenea, analizate prin cromatografie de performanță ultra-înaltă cu excludere de d (SE-UPLC) pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). S-a aplicat aceeași metodă ca cea descrisă în Exemplul 4. Conținutul HMWS al probelor agitate este subliniat în Tabelul 13. Formarea HMWS a fost cea mai pronunțată în Ținta A-hFc când se compară preparatele K60RTrT. HMWS au fost mai abundente în Ținta A-hFc decât în Ținta A-scFc.

Tabelul 13: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele solicitate (salt de pH + 2w 37°C) Ținte A-hALB, -hFc și -scFc determinate prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
65h, 500 rpm	1,8	5,8	2,4	1,8	0,3

Exemplul 7:

Țintele A-hALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 4 au fost expuse la lumină vizibilă și UVA (solicitare foto). Concentrația de proteine a totalizat 1 mg/mL în toate preparatele. Soluțiile de proteine au fost filtrate printr-un filtru cu dimensiunea porilor de 0,22 µm și umplute la 0,5 mL în fiole de sticlă de tip I. Țintele A-hALB și -scFc au fost supuse la două teste diferite, inclusiv 0,2 MLux lumină vizibilă/25 W*h/m² lumină UVA și lumină vizibilă de 1,2MLux/173 W*h/m² respectiv. Ținta A-hFc a fost supusă la două teste diferite, inclusiv 0,2 MLux lumină vizibilă fără lumină UVA și 1,2 MLux lumină vizibilă/30 W*h/m² lumină UVA respectiv. Temperaturile camerei au fost ajustate la 25°C. După expunerea la lumină, probele au fost analizate prin inspecție vizibilă (Tabelul 14), SE-UPLC (Tabelul 15) și harta peptidelor (Tabelul 16). Metodele menționate mai sus au fost efectuate conform procedurilor descrise în Exemplul 4. Deși Țintele A-hALB și -scFc au fost expuse la doze mai mari de lumină UVA, nu s-au observat particule proteice vizibile, în timp ce probele Țintă A-hFc au prezentat o particulă proteică vizibilă per fiolă. pentru ambele teste, indiferent de formulare.

Tabel 14: Prezentare generală a numărului de particule proteice vizibile per fiolă în preparatele Ținte A-hALB, -hFc și -scFc determinate după expunerea la lumină

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Numărul de particule proteice vizibile (>125 µm) per fiolă					
T0	0	0	1	0	0
Testul 1	0 ¹⁾	1 ²⁾	1 ²⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾
Testul 2	0 ³⁾	1 ⁴⁾	1 ⁴⁾	0 ³⁾	0 ³⁾

¹⁾ 0,2 MLux lumină vizibilă/25 W*h/m² lumina UVA, ²⁾ 0,2 MLux lumină vizibilă fără lumină UVA, ³⁾ 1,2 MLux lumină vizibilă/173 W*h/m², ⁴⁾ 1,2 MLux lumină vizibilă/30 W*h/m²

HMWS a crescut în următoarea ordine Țintă A-hALB < -scFc < -hFc atunci când proteina a fost formulată în K60RTrT. HMWS ar putea fi redus pentru constructele pe bază de Fc atunci când este formulat în G40MSuT. Cu toate acestea, HMWS au fost din nou mai puțin pronunțate pentru Ținta A-scFc. Ținta A-hFc s-a dovedit a fi deosebit de sensibilă la expunerea la lumina UVA.

Tabel 15: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele Țintă A-hALB, -hFc și -scFc determinate după expunerea la lumină prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
Testul 1	1,8 ¹⁾	6,3 ²⁾	2,5 ²⁾	2,1 ¹⁾	0,4 ¹⁾
Testul 2	2,0 ³⁾	11,0 ⁴⁾	2,1 ⁴⁾	2,4 ³⁾	0,3 ³⁾
1) 0,2 MLux lumină vizibilă/25 W*h/m ² lumina UVA, 2) 0,2 MLux lumină vizibilă fără lumină UVA, 3) 1,2 MLux lumină vizibilă/173 W*h/m ² , 4) 1,2 MLux lumină vizibilă/30 W*h/m ²					

Procentele modificărilor chimice ale regiunilor de determinare a complementului (CDRs) și ale porțiunii de extindere a timpului de înjumătățire (fie hALB, fie Fc) detectate în preparatele Țintă A-hALB, -hFc și -scFc sunt date în Tabelul 16. Când se compară condiții similare de formulare, a devenit evident că, în general, modificările chimice au fost cel mai puțin abundente în construclele scFc.

Tabelul 16: Prezentare generală asupra modificărilor chimice în preparatele Țintă A-hALB, -hFc și -scFc determinate după expunerea la lumină prin maparea peptidelor

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
deamidare %N101 (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Testul 1	0,2 ¹⁾	n.t.	0,3 ²⁾	n.t.	0,5 ¹⁾
Testul 2	0,2 ³⁾	n.t.	0,6 ⁴⁾	n.t.	0,7 ³⁾
deamidare %N162 (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
Testul 1	3,0 ¹⁾	n.t.	2,1 ²⁾	n.t.	2,7 ¹⁾
Testul 2	3,6 ³⁾	n.t.	3,1 ⁴⁾	n.t.	2,8 ³⁾
oxidare %M279 (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
Testul 1	0,8 ¹⁾	n.t.	2,6 ²⁾	n.t.	0,6 ¹⁾
Testul 2	1,0 ³⁾	n.t.	6,3 ⁴⁾	n.t.	0,7 ³⁾
deamidare %N348 (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
Testul 1	0,4 ¹⁾	n.t.	2,7 ²⁾	n.t.	0,2 ¹⁾
Testul 2	0,9 ³⁾	n.t.	3,9 ⁴⁾	n.t.	0,2 ³⁾
deamidare %N351 (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
Testul 1	0,4 ¹⁾	n.t.	2,0 ²⁾	n.t.	0,3 ¹⁾
Testul 2	0,5 ³⁾	n.t.	2,6 ⁴⁾	n.t.	0,3 ³⁾
oxidare %M530 (Fc)					
T0	n.a.	3,9	4,1	2,6	3,2
Testul 1	n.a.	n.t.	7,6 ²⁾	n.t.	3,1 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.t.	21,8 ⁴⁾	n.t.	4,1 ³⁾
oxidare %M706 (Fc)					

deamidare %N351 (CDR)					
T0	n.a.	3,2	3,6	1,5	2,1
Testul 1	n.a.	n.t.	6,5 ²⁾	n.t.	1,8 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.t.	17,8 ⁴⁾	n.t.	2,7 ³⁾
oxidare %M587 (hALB)					
T0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	1,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	2,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oxidare %M623 (hALB)					
T0	1,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	4,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	4,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oxidare %M798 (hALB)					
T0	1,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	2,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	3,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oxidare %M829 (hALB)					
T0	8,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	31,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	25,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a. = nu se aplică; n.t. = netestat					

Exemplul 8:

- 5 Ținta A-hALB a fost formulată în K60RTrT și Ținta A-scFc a fost formulată în G40MSuT conform procedurii descrise în Exemplul 4. Concentrațiile de proteine au totalizat 0,05 mg/mL. Recipientele de testare din sticlă (borosilicat, tip I, fiolă 13 mm 3cc de la West, nr. art. 68000375) și din polipropilenă (2 mL cu inel O, de ex., de la Sarstedt, art. nr. 72.694.005) sunt umplute cu 500 μL de soluție de testare. Soluția de testare a fost lăsată timp de cinci minute în primul recipient de testare. Apoi a
- 10 fost prelevat o probă alicotă de 150 μL pentru analiză. Soluția de testare rămasă (350 μL) a fost transferată secvențial dintr-un recipient de testare în altul (cinci recipiente în total). În fiecare fiolă, soluția a fost lăsată timp de cinci minute înainte de următorul transfer. A fost folosit același vârf de pipetă pentru fiecare pas de transfer. Același test a fost efectuat folosind sticle de polycarbonat de 30 mL (Nalgene, PCS-000295 cu închidere, PP/20-415/ZTPE). Pentru acest tip de recipient, primul recipient a fost umplut
- 15 cu 5 mL. După ce s-a prelevat o probă alicotă de 150 μL, volumul rezidual a fost transferat dintr-un recipient de testare în altul (conform procedurii descrise mai sus). Probele extrase din containerul #1 și #5 au fost analizate prin SE-UPLC (metoda așa cum este descrisă în Exemplul 4). În plus, detectarea proteinei a fost efectuată cu un detector PDA (280 nm) pentru a determina concentrațiile de proteine. Recuperarea procentuală a proteinei din fiecare recipient de testare este dată de Tabelul 17. S-a arătat că
- 20 recuperarea proteinei a fost mai pronunțată pentru Ținta A-scFc decât pentru Ținta A-hALB, indiferent de tipul de recipient.

Tabelul 17: Recuperarea proteinelor din diferite tipuri de containere pentru Țintele A-hALB și -scFc determinate prin SE-UPLC

Construi	hALB	scFc
Formulare	K60RTrT	G40MSuT
% Recuperare proteine (de la nominal)		

Construi	hALB	scFc
Formulare	K60RTrT	G40MSuT
% Recuperare proteine (de la nominal)		
Sticla tip I	80,0	92,0
Polipropilenă	87,0	97,3
Policarbonat	87,0	96,0

Exemplul 9:

Ținta A-hALB a fost formulată în K60RTrT și Ținta A-scFc a fost formulată în K60RTrT și G40MSuT conform procedurii descrise în Exemplul 4. Concentrația de proteină a totalizat 1,0 mg/mL 1950 μ L din fiecare soluție de testare au fost adăugate cu 50 μ L dintr-o soluție standard de siliciu de 1000 ppm (Specpure de la AlfaAesar, Art. Nr. 38717) rezultând un pic de 25 ppm. O soluție de testare fără pic a servit ca probă martor. Soluția de testare cu pic precum și proba martor au fost umplute în flacoane de sticlă de tip I de 3cc și au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore. Toate probele au fost analizate prin SE-UPLC conform metodei descrise în Exemplul 4 pentru a cuantifica cantitatea de HMWS (Tabelul 18). Când au fost formulate în K60RTrT, Țintele A-hALB și -scFc au prezentat creșteri similare ale HMWS după aplicarea cu siliciu.

Tabelul 18: Prezentare generală asupra conținutului HMWS din preparatele Țintă A-hALB și -scFc determinate prin SE-UPLC după aplicarea cu 25 ppm de siliciu

Construct	hALB	scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT
Δ %HMWS (comparativ cu martorul fără pic)			
pic 25 ppm	1,0	1,0	0,2

Exemplul 10:

Substanțele medicamentoase preformulate care conțin Țintă C (cc)-hALB, Țintă C (cc)-hFc, respectiv, Țintă C (cc)-scFc au fost schimbate cu tampon prin ultrafiltrare/diafiltrare folosind membrane cu o limită de greutate moleculară (MWCO) de 10 kDa. Formularea finală a fost realizată prin adăugarea de soluții stoc concentrate. Formulările rezultate pentru fiecare construct sunt listate în Tabelul 19. Concentrația de proteină țintă a fost de 1,0 mg/mL. Constructele formulate Țintă C (cc) au fost umplute până la 1 mL în fiole de sticlă de tip I care au fost astupate cu dopuri din cauciuc butilic și sertizate cu garnituri de aluminiu. Fiolele umplute au fost incubate la -20, 5, 25 și 37°C. O fiolă din fiecare versiune a fost supus la cinci cicluri de înghețare și dezghețare (F/T). Temperatura țintă de îngheț a fost de -29°C. Temperatura țintă de dezghețare a fost de 2°C. Viteza de rampă a fost de aproximativ 0,3 K/min. Probele descrise mai sus au fost, de asemenea, analizate prin cromatografie de performanță ultra-înaltă cu excludere dimensională (SE-UPLC) pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). SE-UPLC a fost realizată conform metodei descrise în Exemplul 4. Când s-a formulat în K60RTrT, HMWS a crescut în următoarea ordine în probele nesolicitate: scFc < hALB < hFc. Cea mai puțin pronunțată creștere a HMWS la solicitarea la îngheț-dezgheț a fost observată pentru constructul scFc. Constructul hFc s-a dovedit a fi cel mai predispus la formarea HMWS la -20°C. Conținutul de HMWS a crescut după patru săptămâni de depozitare la 5°C. Formarea HMWS în aceste condiții a fost mai pronunțată pentru constructele pe bază de Fc decât pentru constructele pe bază de albumină. În K60RTrT nu s-au observat creșteri semnificative ale HMWS la temperaturi ridicate de depozitare (25 și 37°C). Când au fost formulate în G40MSuT, toate constructele au dezvoltat conținuturi similare de HMWS în probe nesolicitate. Creșterea în timpul ciclului îngheț-dezgheț a fost mai distinctă pentru constructele pe bază de Fc în comparație cu constructul pe bază de albumină. În G40MSuT, structura hFc a fost cel mai puțin stabilă în timpul depozitării la -20°C. Creșteri considerabile ale HMWS în timpul depozitării lichidelor au fost observate numai pentru constructul hALB.

Tabelul 19: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele solicitate și solicitate (T0) Tintă C (cc)-hALB, -hFc și -scFc s-a determinat prin SE-UPLC

Construct	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
% HMWS						

Construct	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
% HMWS						
T0	1,5	0,3	2,7	0,3	1,3	0,3
5 cicluri F/T	2,0	0,5	3,1	0,7	1,6	0,7
2w -20°C	n.t	n.t	n.t	n.t	1,5	0,5
2w 5°C	n.t	n.t	n.t	n.t	1,8	0,2
2w 25°C	1,7	0,6	2,3	0,2	1,3	0,2
2w 37°C	1,9	0,7	1,8	0,2	1,2	0,2
4w -20°C	1,6	0,4	4,2	1,5	1,7	0,9
4w 5°C	1,9	0,3	3,3	0,3	2,1	0,4
4w 25°C	1,4	0,6	2,2	0,2	1,4	0,4
4w 37°C	1,3	0,7	2,0	0,1	1,4	0,3
n.t. = netestat						

Abundența modificărilor chimice la solicitarea termică (incubarea la 37°C) a fost monitorizată prin maparea peptidei conform metodei descrise în Exemplul 4. Procente de modificări chimice ale regiunilor de determinare a complementului (CDRs) detectate în preparatele Țintă C (cc)-hALB, -hFc și -scFc sunt date în Tabelul 20. În general, Ținta C (cc)-scFc a prezentat cea mai mică cantitate de modificări chimice în CDRs. A devenit evident că în special deamidările CDRs au fost cel mai puțin pronunțate pentru constructul scFc.

Tabelul 20: Prezentare generală asupra modificărilor chimice în preparatele Țintă C (cc)-hALB, -hFc și -scFc sub solicitare și nesolicitate (T0) determinate prin maparea peptidelor

Construct	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
oxidare %M34 (CDR)						
T0	1,0	1,8	1,0	1,4	1,7	1,9
2w 37°C	0,9	1,3	0,9	1,1	1,0	1,7
4w 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	1,6	n.t.	1,8
izomerizare %D103 (CDR)						
T0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
2w 37°C	4,0	4,6	4,5	4,4	5,8	7,3
4w 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	8,0	n.t.	12,4

oxidare %M290 (CDR)						
T0	0,7	1,4	0,8	1	1,3	1,4
2w 37°C	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	1,3
4w 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	1,2	n.t.	1,6
deamidare %N359 (CDR)						
T0	5,8	11,4	5,3	6,3	0,4	0,5
2w 37°C	19,3	5,8	11,2	2,8	7,0	0,9
4w 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	2,9	n.t.	2,2

deamidare%N362 d (CDR)						
T0	5,4	8,7	3,9	4,0	0,2	0,3
2w 37°C	13,5	3,6	6,7	1,2	3,1	0,3
4w 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	1,4	n.t.	0,7
n.a. = nu se aplică; n.t. = netestat						

Exemplul 11:

Țintele C (cc)-hALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 4 au fost supuse unui experiment de salt de pH. Concentrația materiilor prime a fost de 1,0 mg/mL. Un volum de 0,38 mL din fiecare materie primă a fost umplut într-un flacon de sticlă. După condiționare la 37°C, soluțiile au fost adăugate cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) de 20 de ori care a fost compusă din fosfat de potasiu 0,090 M, fosfat de sodiu 0,480 M (ambii dibazici), clorură de potasiu 0,052 M și NaCl 2,76 M. Probele cu pic au fost incubate la 37°C timp de două săptămâni. După incubare, acestea au fost analizate prin SE-UPLC utilizând metoda descrisă în Exemplul 4 și a fost raportat conținutul procentual de HMWS (Tabelul 21). Constructele țintă C (cc)-scFc au prezentat cel mai scăzut conținut de HMWS după saltul de pH în comparație cu Ținta C (cc)-hALB și -hFc, indiferent de formulare.

Tabel 21: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele solicitate (salt de pH + 2w 37°C) preparatele Țintă C (cc)-hALB, -hFc și -scFc determinate prin SE-UPLC

Construct	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS						
2w 37°C	1,7	4,8	1,6	1,8	1,1	1,5

Exemplul 12:

Țintele C (cc)-hALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 4 au fost supuse la solicitarea de agitare. Concentrația materiilor prime a fost de 1,0 mg/mL. Un volum de 0,5 mL din fiecare soluție a fost filtrat printr-un filtru adecvat de 0,22 μm și umplut în fiole de sticlă de tip I de 3cc. Fiolele au fost plasate într-o cutie de plastic, asigurându-se că fiolele nu au fost deplasate în interiorul cutiei în timpul agitării. Cutia a fost plasată pe un agitator orbital. Probele au fost agitate la 500 rpm timp de 65 de ore. Probele au fost analizate prin SE-UPLC pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). S-a aplicat aceeași metodă ca cea descrisă în Exemplul 4. Conținutul de HMWS al probelor agitate este subliniat în Tabelul 22. Formarea de HMWS a fost cel mai puțin pronunțată pentru Ținta C (cc)-scFc în oricare dintre formulări.

Tabel 22: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele solicitate (săritură de pH + 2w 37°C) Ținte C (cc)-hALB, -hFc și -scFc determinate prin SE-UPLC

Construct	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS						
65h, 500 rpm	2,1	0,8	2,3	0,4	1,3	0,2

Exemplul 13:

Țintele C (cc)-hALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 4 au fost expuse la lumină vizibilă și UVA (solicitare foto). Concentrația de proteine a totalizat 1 mg/mL în toate preparatele. Soluțiile de proteine au fost filtrate printr-un filtru cu dimensiunea porilor de 0,22 μm și umplute la 0,5 mL în fiole de sticlă de tip I. Țintele C (cc)-hALB și -scFc au fost supuse la două teste diferite, inclusiv 0,2 MLux lumină vizibilă/25 W*h/m² lumină UVA și lumină vizibilă de 1,2MLux/173 W*h/m² respectiv. Ținta C (cc)-hFc a fost supusă la două teste diferite, inclusiv 0,2 MLux lumină vizibilă fără lumină UVA și 1,2 MLux lumină vizibilă/30 W*h/m² lumina UVA respectiv. Temperaturile camerei au fost ajustate la 25°C. După expunerea la lumină, probele au fost analizate prin SE-UPLC (Tabelul 23) și harta peptidelor (Tabelul 24). Metodele menționate mai sus au fost efectuate conform procedurilor din Exemplul 4. În ciuda intensității mai mari a luminii UVA aplicată la Ținta C (cc)-scFc, acest construct a fost stabil împotriva formării HMWS. În contrast, ținta C (cc)-hFc și ținta C (cc)-hALB au arătat o creștere a HMWS în condițiile testului 2.

Tabel 23: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele Țintă C (cc)-hALB, -hFc și -scFc determinate după expunerea la lumină prin SE-UPLC

Construc	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS						
T0	1,5	0,3	2,7	0,3	1,3	0,3
Testul 1	1,8 ¹	0,3 ¹	2,5 ²	0,3 ²	1,4 ¹	0,3 ¹
Testul 2	4,6 ³	1,1 ³	6,0 ⁴	0,7 ⁴	1,5 ³	0,3 ³
¹) Lumină vizibilă 0,2 MLux/25 W*h/m ² lumina UVA, ²) Lumină vizibilă 0,2 MLux fără lumină UVA, ³) Lumină vizibilă 1,2 MLux/173 W*h/m ² , ⁴) Lumină vizibilă 1,2 MLux/30 W*h/m ²						

5 Modificările chimice generale la expunerea la lumină au fost cel mai puțin pronunțate pentru Ținta C (cc)-scFc. În special, deamidările CDRs s-au format într-o măsură mai mare în Ținta C (cc)-hALB și Ținta C (cc)-hFc. Când se compară constructele pe bază Fc, s-a arătat că Ținta C (cc)-scFc a fost mai puțin predispusă la modificări chimice ale porțiunii Fc, deși constructul scFc a fost expus la doze mai mari de lumină UVA decât constructul hFc. Tabelul 24 listează, de asemenea, cele mai abundente modificări chimice ale porțiunii de albumină din Ținta C (cc)-hALB, demonstrând că porțiunea de

10 extindere a timpului de înjumătățire a acestui construct a fost mai degradată chimic decât porțiunile Fc ale Țintelor C (cc)-hFc și - scFc.

Tabelul 24: Prezentare generală asupra modificărilor chimice în preparatele Țintă C (cc)-hALB, -hFc și -scFc determinate după expunerea la lumină prin cartografierea peptidelor

Construct	hALB		hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
oxidare %M34 (CDR)						
T0	1,0	1,8	1,0	1,4	1,7	1,9
Testul 1	1,5 ¹	n.t.	0,7 ²	4,2 ²	1,4 ¹	1,2 ¹
Testul 2	1,7 ³	n.t.	1,1 ⁴	4,2 ⁴	1,3 ³	1,7 ³
izomerizare %D103 (CDR)						
T0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
Testul 1	0,8 ¹	n.t.	0,9 ²	0,9 ²	0,8 ¹	1,0 ¹
Testul 2	1,1 ³	n.t.	1,2 ⁴	1,4 ⁴	1,0 ³	1,3 ³

oxidare %M290 (CDR)						
T0	0,7	1,4	0,8	1	1,3	1,4
Testul 1	1,1 ¹	n.t.	0,5 ²	3,3 ²	1,0 ¹	0,9 ¹
Testul 2	1,4 ³	n.t.	1,1 ⁴	4,2 ⁴	1,0 ³	1,4 ³

deamidare %N359 (CDR)						
T0	5,8	11,4	5,3	6,3	0,4	0,5
Testul 1	10,8 ¹	n.t.	4,5 ²	5,6 ²	0,4 ¹	0,2 ¹
Testul 2	12,4 ³	n.t.	10,3 ⁴	3,6 ⁴	0,6 ³	0,2 ³

deamidare %N362 (CDR)						
T0	5,4	8,7	3,9	4,0	0,2	0,3
Testul 1	8,8 ¹	n.t.	3,4 ²	3,5 ²	0,3 ¹	0,3 ¹
Testul 2	9,8 ³	n.t.	6,4 ⁴	2,3 ⁴	0,5 ³	0,3 ³

izomerizare %D510 (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	0,4	0,4	0,5	0,4
Testul 1	n.a.	n.a.	0,4 ²⁾	0,6 ²⁾	0,6 ¹⁾	0,5 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.a.	0,7 ⁴⁾	0,7 ⁴⁾	0,7 ³⁾	0,7 ³⁾

oxidare %M541 (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	2,8	3	3,7	4,1
Testul 1	n.a.	n.a.	5,0 ²⁾	0,7 ²⁾	3,8 ¹⁾	3,8 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.a.	17,5 ⁴⁾	18,4 ⁴⁾	4,8 ³⁾	5,5 ³⁾

deamidare %N614 (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	1,2	1,2	1,6	1,5
Testul 1	n.a.	n.a.	1,3 ²⁾	1,7 ²⁾	2,8 ¹⁾	2,2 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.a.	6,1 ⁴⁾	1,9 ⁴⁾	1,9 ³⁾	2,3 ³⁾

deamidare %N673 (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	0,3	0,3	0,0	0,0
Testul 1	n.a.	n.a.	0,5 ²⁾	0,6 ²⁾	0,5 ¹⁾	0,6 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.a.	0,5 ⁴⁾	0,6 ⁴⁾	0,5 ³⁾	1,5 ³⁾

oxidare %M717 (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	2,1	2,4	2,5	2,8
Testul 1	n.a.	n.a.	4,1 ²⁾	7,3 ²⁾	2,2 ¹⁾	2,3 ¹⁾
Testul 2	n.a.	n.a.	13,7 ⁴⁾	13,5 ⁴⁾	2,8 ³⁾	3,8 ³⁾

oxidare %M598 (hALB)						
T0	1,0	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	2,3 ¹⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	6,4 ³⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

oxidare %M809 (hALB)						
T0	1,8	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	3,5 ¹⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	8,3 ³⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

oxidare %M840 (hALB)						
T0	12,8	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	32,0 ¹⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	61,7	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

glicare %K1036 (hALB)						
T0	10,1	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 1	10,2 ¹⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Testul 2	9,9 ³⁾	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

¹⁾ Lumină vizibilă 0,2 MLux/25 W*h/m² lumina UVA, ²⁾ Lumină vizibilă 0,2 MLux fără lumină UVA, ³⁾ Lumină vizibilă 1,2 MLux/173 W*h/m², ⁴⁾ Lumină vizibilă 1,2 MLux/30 W*h/m²

Exemplul 14

S-au examinat diferite constructe de anticorpi BiTE[®] concepute pentru țintirea Țintei F, inclusiv Ținta F-fără timp de înjumătățire extins (non HLE, canonic), Ținta F-hALB și Ținta F-scFc. Concentrația de proteină țintă a fost de 1,0 mg/mL pentru hALB și scFc și 0,4 mg/mL pentru versiunea non HLE. Constructele de anticorpi BiTE[®] formulate au fost umplute până la 1 mL în fiole de sticlă de tip I care au fost astupate cu dopuri din cauciuc butilic și sertizate cu garnituri de aluminiu. Fiolele umplute au fost incubate la -20°C și 37°C (w/o și cu 25 ppm siliciu care este cunoscut pentru potențialul său de a induce agregarea proteinelor) timp de 4 săptămâni. Constructele de mai sus au fost, de asemenea, expuse la lumină (1,2 MLux lumină vizibilă/173 W*h/m² lumină UVA). Pentru solicitare ușoară, temperatura camerei a fost setată la 25°C. Probele depozitate la -70°C au servit drept martori (T0).

Probele descrise mai sus au fost analizate în duplicat prin cromatografie de performanță ultra-înaltă cu excludere de dimensiune (SE-UPLC) pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). SE-UPLC a fost efectuată pe un sistem UPLC Aquity H-Class (Waters) utilizând o coloană Acquity UPLC BEH200 SEC de 150 mm (Waters). Temperatura coloanei a fost setată la 25°C. Separarea variantelor de dimensiune a fost realizată prin aplicarea unei metode izocratice cu un debit de 0,4 mL/min. Faza mobilă a fost compusă din fosfat de sodiu 100 mM, NaCl 250 mM pH 6,8. Durata totală de rulare este de 6,0 minute. Probele au fost ținute la 8°C în autosampler până la analiză. S-a injectat o cantitate totală de 3 μg proteină. Pentru a evita transferul, a fost efectuată o injecție intermediară cu 40% ACN după fiecare probă. Detectarea s-a bazat pe fluorescență (excitație la 280 nm, emisie la 325 nm). Integrarea maximă a fost realizată folosind software Empower[®]. A fost raportată aria relativă sub curba HMWS (Tabelul 25).

În cadrul probelor nesolicitate, HMWS au fost cel mai puțin pronunțate pentru constructul scFc. Formarea HMWS a fost observată exclusiv pe parcursul a 4 săptămâni de depozitare la -20°C. Conținutul HMWS în aceste condiții crește în următoarea ordine scFc < hALB < non HLE.

Tabelul 25: Prezentare generală asupra conținutului de HMWS în preparatele solicitate și nesolicitate (T0) preparate Țintă F-non HLE, -hALB și -scFc determinate prin SE-UPLC.

Construct	Non HLE (canonic)	hALB	scFc
T0	1,3%	1,3%	1,0%
4w -20°C	4,6%	1,8%	1,6%
4w 37°C	0,9%	0,6%	0,5%
4w 37°C (25 ppm siliciu)	1,1%	0,8%	0,8%
Expunerea la lumină	1,0%	0,9%	0,5%

În plus, probele derivate de la solicitarea termică în absența și prezența siliciului au fost evaluate pentru abundența particulelor subvizibile prin Microfluid Imaging (MFI) folosind o Flowcam de la Fluid Imaging Technologies, Inc. Instrumentul a fost echipat cu o celulă de flux FC80FV. S-a aplicat o mărire optică de zece ori. Adecvarea sistemului a fost verificată cu apă fără particule. A fost aplicată o rată de imagine automată de 20 de cadre pe secundă. Pragurile de întuneric și de lumină au fost setate la 25 și, respectiv, 20 de pixeli. Volumul probei pentru o singură măsurare totalizează 0,25 mL. Probele au fost măsurate în triplicat. Înainte de fiecare triplicat, sistemul a fost spălat cu 0,5 mL din soluțiile de probă respective. La început și între fiecare triplicat a fost efectuată o spălare cu 1,0 mL apă fără particule. Evaluarea datelor a fost efectuată cu software-ul Visual Spreadsheet. Probele au fost măsurate în triplicat. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 26.

Solicitarea termică a dus la formarea de particule subvizibile în preparatele care conțin constructe non HLE și hALB. În schimb, constructul scFc a rămas stabil. Formarea de particule subvizibile nu a fost promovată prin adăugarea de siliciu independent de natura constructul de anticorp BiTE[®].

Tabelul 26: Evaluarea particulelor subvizibile prin MFI în preparatele Țintă F-non HLE (canonic), - hALB și —scFc după solicitare termică în absența și prezența siliciului.

Construct	Non HLE (canonic)				hALB				scFc			
Dimensiunea particulelor [μm]	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
T0	146	35	12	0	281	71	35	0	298	150	33	0

Construct	Non HLE (canonic)				hALB				scFc			
4w 37°C	410	163	23	0	742	225	11	0	110	44	0	0
4w 37°C (25 ppm siliciu)	69	35	11	0	272	91	34	0	146	55	11	0

Probele solicitate termic au fost analizate și prin cromatografie Weak Cation Exchange (WCX) pentru a cuantifica conținutul procentual al variantelor de sarcină folosind o clasă UPLC Aquity H de la Waters. A fost aplicată o coloană Protein-Pak Hi Res CM 7im 4,6 x 100 mm (Waters, cat nr. 186004929). Temperatura coloanei a fost ajustată la 30°C. Debitul a fost stabilit la 0,65 ml/min. Gradientul aplicat a fost proiectat după cum urmează (Tabelul 27). Temperatura autosamplerului a fost menținută la 2-8°C.

Tabelul 27: Gradient aplicat pentru cromatografia WCX

Timp [min:sec]	% A	% B
	Fosfat de sodiu 20 mM, pH 6,5	fosfat de sodiu 20 mM, clorură de sodiu 250 mM, pH 6,5
00:00	100	0
04:00	100	0
25:00	50	50
25:01	0	100
29:00	0	100
29:01	100	0
33:00	100	0

S-a injectat o cantitate totală de 3 μg de proteină. Detectarea s-a bazat pe fluorescență (excitație la 280 nm, emisie la 325 nm). Integrarea maximă a fost realizată folosind software Empower®. Au fost raportate zone relative de sub curba pic-ului principal, precum și ale variantelor de sarcină acidă și bazică (Tabelul 28).

Solicitarea termică a dus la un procentaj de pic principal redus, care a trebuit să fie atribuit unei forme predominante de variante de încărcare acide. Pierderea în procentul de pic principal a fost cel mai puțin pronunțată pentru constructul scFc (7,5%). Variante de încărcare bazice au fost formate în ambele constructe cu timp de înjumătățire extins la expunerea la lumină. Creșterea variantelor de încărcare bazice a variat între 5 și 6% în constructele hALB și scFc.

Tabelul 28: Evaluarea variantelor de sarcină prin cromatografie WCX în preparatele Țintă F-non HLE (canonic), -hALB și —scFc după stres indus de căldură și lumină.

Construct	Non HLE (canonic)			hALB			scFc		
	% principal	% acid	% bazic	% principal	% acid	% bazic	% principal	% acid	% bazic
T0	89,9	3,6	6,5	83,3	0,7	16,0	74,5	3,4	22,1
4w 37°C	79,3	11,1	9,5	75,6	9,8	14,6	67,0	11,2	21,8

În plus, puritatea probei a fost cuantificată în probe solicitate termic și la lumină folosind un test cu dodecilsulfat de sodiu de electroforeză capilară microfluidică (CE-SDS) bazat pe sistemul LabChip GXII (Perkin Elmer). Soluția de denaturare a probei a fost compusă din tampon de probă HT Protein Express (furnizat de Perkin Elmer) suplimentat cu 34 mM ditiotritol. Fiecare probă a fost diluată 1:8 cu soluția de denaturare și încălzită până la 70°C timp de 10 minute împreună cu scara de exprimare a proteinei. S-au adăugat 35 μL de apă pentru injecție (WFI) la 40 μL de probă denaturată. S-au adăugat 120 μL WFI la 12 μL de scară. Probele, scara, tampon de spălare expres proteine, colorant gel și soluția de decolorare sunt transferate în rezervoarele respective. Probele sunt încărcate electrocinetic de pe o placă de microtitrare pe cip care integrează separarea, colorarea, decolorarea și detectarea proteinei și a variantelor de dimensiune a acesteia. Electroferogramele rezultate au fost evaluate și au fost raportate modificări ale purității. O privire de ansamblu asupra purității procentuale detectate după stres este dată de Tabelul 29 și comparată cu probele nesolicitate (T0).

Au fost observate purități mai mari pentru constructele hALB și scFc în comparație cu constructul non HLE în toate condițiile. Scăderi ușoare ale purității în comparație cu T0 au fost detectate

pentru constructele hALB și scFc la solicitare termică și la lumină. Pierderea de puritate după 4 săptămâni de depozitare la 37°C totalizează 8,4% pentru constructul hALB și 6,6% pentru constructele scFc. Pierderile la expunerea la lumină au fost comparabile între hALB și scFc.

Tabelul 29: Prezentare generală asupra purității procentuale în preparatele Țintă F-non HLE, -hALB și -scFc sub solicitare și nesolicitate (T0), determinate prin LabChip GXII (Caliper).

Construct	Non HLE (canonic)	hALB	scFc
T0	57,4	96,0	92,2
4w 37°C	60,6	87,6	85,6
Expunerea la lumină	61,5	90,1	86,4

Exemplul 15

Constructe diferite de anticorpi BiTE® au fost concepute pentru ținerea Țintei E, inclusiv Țintei E-hALB și, respectiv, Țintei E-scFc. Concentrația de proteină țință a fost de 1,0 mg/mL pentru ambele constructe. Constructele de anticorpi BiTE® formulate au fost umplute până la 1 mL în fiole de sticlă de tip I care au fost astupate cu dopuri din cauciuc butilic și sertizate cu garnituri de aluminiu. Fiolele umplute au fost incubate la 37°C (Țintă E-hALB) și 40°C (Țintă E-scFc) timp de 4 săptămâni. Probele depozitate la -70°C au servit drept martori (T0). Probele au fost analizate prin SE-UPLC conform metodei descrise în Exemplul 13. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 30.

Constructul scFc a prezentat o pierdere redusă de monomer (2,3%) la solicitarea termică în comparație cu constructul hALB (4,0%), deși temperatura de incubare a fost puțin mai mare.

Tabelul 30: Prezentare generală asupra procentului de vârf de monomer în preparatele țință E-hALB și —scFc solicitate și nesolicitate (T0) determinate prin SE-UPLC.

Construct	hALB	scFc
T0	97,6%	99,8%
4w	93,6%	97,5%

Exemplul 16

S-au examinat diferite constructe de anticorpi BiTE® concepute pentru ținerea Țintei I, incluzând Ținta I-Xbody și Ținta I-scFc. Concentrația țință a proteinei a fost de 1,0 mg/mL. Constructele de anticorpi BiTE® formulate au fost umplute până la 1 mL în fiole de sticlă de tip I care au fost astupate cu dopuri din cauciuc butilic și sertizate cu garnituri de aluminiu. Flacoanele umplute au fost incubate la -20°C și 37°C timp de 4 săptămâni. În plus, toate probele au fost expuse la 1,2 MLux lumină vizibilă și 173 W*h/m² lumină UVA. Temperatura camerei a fost ajustată la 25°C. Probele depozitate la -70°C au servit drept martori (T0). Probele stocate la -20 și -37°C au fost analizate prin SE-UPLC conform metodei descrise în Exemplul 13. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 31.

Constructul scFc a păstrat un conținut mai mare de monomer atunci când a fost păstrat timp de patru săptămâni la -20 și, respectiv, 37°C în comparație cu Xbody.

Tabelul 31: Prezentare generală asupra conținutului de monomeri în preparatele Țintă I-Xbody și -scFc sub solicitare și nesolicitate (T0), determinate prin SE-UPLC.

Construct	Xbody	scFc
T0	100,0	98,8
4w -20°C	97,1	97,9
4w 37°C	94,5	95,7

În plus, probele nesolicitate au fost evaluate pentru abundența particulelor subvizibile prin Microfluid Imaging (MFI) folosind metoda descrisă în Exemplul 13. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 32. Preparatul Țintă I-scFc a prezentat cantități semnificativ mai mici de particule subvizibile în comparație cu preparatul Țintei I-Xbody. Acest lucru se aplică tuturor fracțiilor de dimensiune incluse.

Tabelul 32: Evaluarea particulelor subvizibile de către IMF în Ținta I-Xbody și -scFc nesolicitate

Construct	Xbody				scFc			
Dimensiunea particulelor [μm]	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
T0	2648	688	192	32	160	64	43	11

Probele supuse solicitării la lumină au fost analizate și prin cromatografie Weak Cation Exchange (WCX) pentru a cuantifica conținutul procentual al variantelor de sarcină folosind o clasă UPLC Aquity H de la Waters conform metodei descrise în Exemplul 13. Ariile relative sub curba principalelor pic-uri, precum și a variantelor de încărcare acide și bazice (Tabelul 33).

Constructul scFc a arătat o stabilitate îmbunătățită împotriva expunerii la lumină în comparație cu Xbody, indicată de o pierdere mai puțin pronunțată a pic-ului principal, care a totalizat 1,4% comparativ cu 5,5% pentru constructul Xbody.

Tabelul 33: Evaluarea variantelor de sarcină prin cromatografie WCX în preparatele Țintă I-Xbody și -scFc după solicitare indus de căldură și lumină.

Construct	Xbody			scFc		
Fracțiune	% principal	% acid	% bazic	% principal	% acid	% bazic
T0	51,4	30,3	18,3	83,5	1,3	15,2
Expunerea la lumină	45,9	33,2	20,9	82,1	1,2	16,7

Exemplul 17: Cromatografia de excludere dimensională a variantelor scFc bispecifice

Constructele D9F, T2G, D3L, T7I și K6C (vezi Figura 7) au fost fiecare testate pentru comportamentul lor de rulare prin cromatografie de excludere a dimensiunii conform procedurilor standard. În detaliu, s-a rulat o cantitate definită de 25 μg din fiecare construct (la 750 μl/min) în tampon Citrat Lysin (10 mM și 75 mM, pH7) pe o coloană Superdex 200 de creștere 10/300GL la temperatura camerei și a fost înregistrat OD 280 nm. Ulterior, constructele au fost comparate după timpii lor de retenție. Ca rezultat, constructul D9F prezintă o eluție semnificativ întârziată (Tabelul 34) în comparație cu T2G, D3L, T7I și K6C, ceea ce indică o diferență în structura/aranjamentul domeniilor Fc. Această diferență în timpul de retenție a fost cea mai semnificativă cu constructul T7I care are cisteine nepereche în regiunea balama și legătura dintre CH2 și CH2CH3 la CH3 (18,98 min vs. 18,62 min, diferență de 0,36 min). Cu toate acestea, de asemenea, diferența de timp de retenție de 0,16 min între D9F și T2G este semnificativă luând în considerare timpul de retenție respectiv al matorului BSA. Matorul BSA a arătat un timp de retenție de 19,07 min pentru monomer și 16,82 min pentru dimer afișând o diferență de 2,25 min în timpul de retenție pentru o greutate moleculară dublată. Prin urmare, deoarece constructele au doar diferențe structurale în partea Fc, diferența de 0,16 min în timpul de retenție este semnificativă. În rezumat, constructul D9F a arătat cel mai lung timp de retenție indicând cea mai puternică legare. Această concluzie duce la așteptarea ca D9F să aibă, de asemenea, cea mai lungă jumătate de viață *in vivo*.

Tabelul 34

Construct	Timp de retenție în min
D9F	18,98
T2G	18,82
D3L	18,78
K6C	18,77
T7I	18,62
Monomer BSA	19,07
dimer BSA	16,82

Exemplul 18: Determinarea prin rezonanță plasmatică de suprafață a legării la FcRn uman (FCGRT/B2M)

Constructele D9F, T2G, D3L, T7I și K6C (Figura 7) au fost fiecare testate pentru capacitatea lor de a se lega de FcRn uman în experimentele SPR (Biacore) conform procedurilor standard. În detaliu, cipurile senzorilor CM5 (GE Healthcare) au fost imobilizate cu 450-500 RU de FCGRT/B2M (ACRO Biosystems) utilizând tampon acetat de Na pH 4,5 și un tampon de rulare care constă din 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 6,0. Constructele au fost apoi injectate în cicluri ulterioare în două concentrații de 250 nM și 125 nM diluate în 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH 6,0 și 36°C. Asocierea a fost făcută timp de 90 de secunde cu un debit de 30 μl/min urmat de faza de disociere timp de 90 de secunde la un debit de 30 μl/min în HEPES 200 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 6,0 la 36°C. Regenerarea ulterioară a fost făcută timp de 10 secunde cu 30 μl/min cu 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 7,4.

Legarea maximă în timpul fazei de injecție a fost măsurată pentru toate constructele ca unități de răspuns respective (RU), echivalentă cu creșterea masei moleculare pe cipul CM5 acoperit cu FcRn datorită constructului legat. Toate constructele au fost măsurate în duplicat. Valorile medii ale determinărilor duplicate sunt prezentate în Figura 8A și, respectiv, 8B.

Ca rezultat, constructul D9F arată o creștere semnificativ mai mare a masei pe cipul CM5 acoperit cu FcRn, în comparație cu T2G, D3L, T7I și K6C, ceea ce indică o afinitate mai puternică de legare a D9F la FcRn uman. Această observație a fost observată pentru ambele concentrații ale constructelor respective.

Legarea împotriva FcRn este mediată prin porțiunea Fc din constructe. Legarea mai puternică față de FcRn uman, așa cum este descris în literatură, este un indicator al timpului de înjumătățire mai lung in vivo datorită unei salvări intracelulare mai mari a proteinei respective și, prin urmare, unei rate de degradare reduse. Din acest motiv, legarea mai puternică a D9F la FcRn uman în comparație cu celelalte constructe face ca această moleculă să fie net superioară ca bază pentru moleculele terapeutice pentru a permite o expunere mai lungă a potențialului medicament în pacient și o frecvență mai scăzută a administrării medicamentului.

Exemplul 19: Determinarea prin rezonanță plasmonică de suprafață a legării la FcRn uman (FCGRT/B2M)

Constructele D9F, T2G, D3L, T7I și K6C și un anticorp uman IgG1-kappa MT201 au fost testate fiecare pentru capacitatea lor de a se lega de FcRn uman în experimente SPR (Biacore) conform procedurilor standard. În detaliu, cipurile senzorilor CM5 (GE Healthcare) au fost imobilizate cu aproximativ 350 RU de FCGRT/B2M (ACRO Biosystems) utilizând tampon acetat de Na pH 4,5 și un tampon de rulare care constă din 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 6,0. Constructele și martorul IgG1-kappa uman (MT201) au fost apoi injectate la o concentrație de 125 nM diluată în 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH 6,0 și 36°C. Asocierea a fost făcută timp de 90 de secunde cu un debit de 30 μ l/min urmat de faza de disociere timp de 60 de secunde la un debit de 30 μ l/min în HEPES 200 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 6,0 la 36°C. Regenerarea ulterioară a fost făcută timp de 10 secunde cu 30 μ l/min cu 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 7,4.

Legarea maximă în timpul fazei de injecție a fost măsurată pentru toate constructele ca unități de răspuns respective (RU), echivalentă cu creșterea masei moleculare pe cipul CM5 acoperit cu FcRn datorită constructului legat. Toate constructele au fost măsurate în duplicat. Valorile medii ale determinărilor duplicate sunt prezentate în Figura 9, inclusiv barele de eroare ale abaterii standard.

Ca rezultat, constructul D9F arată o creștere semnificativ mai mare a masei pe cipul CM5 acoperit cu FcRn, în comparație cu T2G, D3L, T7I și K6C, ceea ce indică o afinitate mai puternică de legare a D9F la FcRn uman. Creșterea de masă pe cipul CM5 acoperit cu FcRn pentru D9F este bine comparabilă cu creșterea de masă a anticorpului martor IgG1-kappa MT201 uman, indicând o legare comparabilă a constructului D9F la FcRn uman.

Legarea împotriva FcRn este mediată prin porțiunea Fc IgG1 umană din constructe. Legarea mai puternică față de FcRn uman așa cum este descrisă în domeniu este un indicator pentru un timp de înjumătățire mai lung in vivo datorită unei salvări intracelulare mai mari a proteinei respective și, prin urmare, a unei rate de degradare reduse. Din acest motiv, legarea mai puternică a D9F la FcRn uman în intervalul unui anticorp IgG1-kappa uman (MT201), în comparație cu celelalte constructe, face ca această moleculă să fie net superioară ca bază pentru moleculele terapeutice pentru a permite o expunere mai lungă a potențialului medicament în pacient, probabil în intervalul unui anticorp IgG1 uman complet și o frecvență mai mică de administrare a medicamentului.

Următorul tabel descrie peptidele și proteinele care au SECV ID NR: 1-109, precum și cele care au SECV ID NR: 110-129, corespunzătoare secvențelor de WO 2008/119567.

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

68

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
1.	linker G ₄ S	GGGGS
2.	linker (G ₄ S) ₂	GGGGSGGGGS
3.	linker (G ₄ S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS
4.	linker (G ₄ S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
5.	linker (G ₄ S) ₅	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
6.	linker (G ₄ S) ₆	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
7.	linker (G ₄ S) ₇	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
8.	linker (G ₄ S) ₈	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
9.	Linker peptidic	PGGGGS
10.	Linker peptidic	PGGDGS
11.	Linker peptidic	SGGGGS
12.	Linker peptidic	GGGG
13.	liant CD3ε VL	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
14.	liant CD3ε VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSS
15.	liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG NYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
16.	etichetă hexa-histidină	HHHHHH
17.	Fc monomer-1 +c/-g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18.	Fc monomer-2 +c/-g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
19.	Fc monomer-3 -c/+g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

69

[illegible]

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

70

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
29.	scFc-5	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
30.	scFc-6	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
31.	scFc-7	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
32.	scFc-8	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
33.	Țintă A-HLE Hetero Fc lanț 1	QVQLVESGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSYIMTWIRQAPGKGLWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNSHFEDYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVITITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVSRFSGSGSGTDFTLTISLQLPEDFATYYCQQAQKSFPRTFGQGTKEI KSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKATEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGQTVVTPQPSLTVSPGGTVLITCGSSTGAVTSNGYFNWVQKPKGQA PRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDAEYYCVLWYSNRWVFGGGLKTLVLGGGDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
34.	Țintă A-HLE Hetero Fc lanț 2	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
35.	Țintă A-HLE fuziune hALB	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDIYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDEATYYCQAKSFPTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLFGGGSDAIHKSEVAIRFKDLGEENFKALVLLAFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLEFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFIQEKDDNPNTLRPRPEVDVMCTAFHDNEFTFLKKYLYETARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTRCQQAADKAACILPKIDFLRDEGKASSAKQRLKCSASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLCTKVHTECCGGDLLECADDADLAKYICENQDSISSKLKECCCKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHEDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNQALLVRYTKKVEQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCXHPPEAKRMPKAEEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKFKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKKADDKETCPAEESGKKLVAAASQAAALGLHHHHH
36.	Țintă B-HLEa X-body lanț 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGKITYSWYQQRPQQSPILLVYQDTRKPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESSTVVFSGGSKLTVLASTKGFSPFLAFSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37.	Țintă B-HLEb X-body lanț 2	QVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWEYEGSNKYAESVKDRFTISRDNKNTLYLQMNNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYGYGMDVWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGKITYSWYQQRPQQSPILLVYQDTRKPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESSTVVFSGGSKLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGCPKAAPSVTLFPPSSFEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSITPRQWKSFERSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSDKTHCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38.	Țintă B-HLE Hetero Fc lanț 1	QVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWEYEGSNKYAESVKDRFTISRDNKNTLYLQMNNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYGYGMDVWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGKITYSWYQQRPQQSPILLVYQDTRKPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESSTVVFSGGSKLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39.	Țintă B-HLE Hetero Fc lanț 2	DKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

72

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
40.	Țintă C-HLE Hetero Fc lanț 1	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCASGYFTFTNYGMNWKQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYADKFGQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFYWGGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGSGSDIVMTQSPDSTLVSLGERTTINCKSSQSVLSSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQSAHFFITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPCCPAPRTLGGPSVFTFPPKPKDTIMTSRTPPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEFVHNAKTKPCRRQYGSYRCVSVITVITLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
41.	BCMA uman	MLQMAQCSCQNEYFDSLHACIPQCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRGTGDEIILPRGLETVVEECTCEDCIKSKPKVDSHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
42.	BCMA uman ECD	MLQMAQCSCQNEYFDSLHACIPQCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA
43.	BCMA de Macaque	MLQMARQCSQNEYFDSLHDCCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNAILWTCLGLSLIISLAVFVITFLLRKMSSEPTKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKGRGTGDEIVLPRGLETVVEECTCEDCIKSKPKVDSHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCNLSAALSATEIEKSISAR
44.	BCMA ECD de Macaque	MLQMARQCSQNEYFDSLHDCCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNA
45.	VH CDR1 BCMA-08	NHIIH
46.	VH CDR2 BCMA-08	YINPYPGYHAYNEKFQG
47.	VH CDR3 BCMA-08	DGYRDTDVLDY
48.	VL CDR1 BCMA-08	QASQDISNYLN
49.	VL CDR2 BCMA-08	YTSRLHT
50.	VL CDR3 BCMA-08	QQGNTLPWT
51.	VH BCMA-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSS
52.	VL BCMA-08	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK
53.	scFv BCMA-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSCGGGSGGGSGGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK
54.	Moleculă bispecifică BCMA-08 xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSCGGGSGGGSGGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

73

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
55.	Moleculă scFc bispecifică BCMA-08 xI2C - scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHNIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSL RSEDVAVYYCARDGYRDTVDLDYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLLEPEDIATYYCQGGNTLPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQTAVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYENWVQOK PGQAPRGLIGGTKFLAPGTFARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLKTLVLGGGGGDKHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY YSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56.	Moleculă scFc bispecifică BCMA-08 xI2C - scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHNIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSL RSEDVAVYYCARDGYRDTVDLDYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLLEPEDIATYYCQGGNTLPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQTAVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYENWVQOK PGQAPRGLIGGTKFLAPGTFARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLKTLVLGGGGGDKHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY YSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57.	VH (CC) BCMA-08_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHNIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSL RSEDVAVYYCARDGYRDTVDLDYWGQGTILTVSS
58.	VL (CC) BCMA-08_CC	DIQTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLLEPEDIATY YCQGGNTLPWTFGCGTKLEIK
59.	scFv (CC) BCMA-08_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHNIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSL RSEDVAVYYCARDGYRDTVDLDYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLLEPEDIATYYCQGGNTLPWTFGCGTKLEIK
60.	Moleculă bispecifică (CC) BCMA-08_CCxI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHNIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSL RSEDVAVYYCARDGYRDTVDLDYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLLEPEDIATYYCQGGNTLPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQTAVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYENWVQOK PGQAPRGLIGGTKFLAPGTFARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLKTLVL

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

74

[illegible]

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

75

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
72.	Moleculă bispecifică BCMA-06 xI2C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLPQEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTAVVTQEPSTLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYFNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAAATLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
73.	Moleculă scFc bispecifică BCMA-06 xI2C — scFc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLPQEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIKSGCGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTAVVTQEPSTLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYFNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAAATLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74.	Moleculă scFc bispecifică BCMA-06 xI2C — scFc_delGK	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLPQEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTAVVTQEPSTLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYFNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAAATLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
75.	VH (CC) BCMA-06_CC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLLTVSS
76.	VL (CC) BCMA-06_CC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLPQEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIK
77.	scFv (CC) BCMA-06_CC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLPQEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIK
78.	Moleculă bispecifică (CC) BCMA-06_CCxI2C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLLTVSSCGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLPQEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTAVVTQEPSTLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYFNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAAATLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

76

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
79.	Moleculă scFc bispecifică (CC) BCMA-06_CC xI2C —scFc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSL RSEDYAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRANQGISNNLNWY QQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFGGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGKSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSLTVSPGGTVLTCGSSTGAVTSGNYFNWVQQK PGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGCKLTVLGGGGDKTHTCPCPAPEL LGGPSVFLFPPPKPKDTLMTISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHAEALHNHYTQKSLSLSLSPGK
		GGPSVFLFPPPKPKDTLMTISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHAEALHNHYTQKSLSLSLSPGK
80.	Moleculă scFc bispecifică (CC) BCMA-06_CC xI2C — scFc_delGK	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTEGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSL RSEDYAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRANQGISNNLNWY QQKPGKAPKPLIYYTSLNLSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFGGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLFWVARIISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGKSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSLTVSPGGTVLTCGSSTGAVTSGNYFNWVQQK PGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGCKLTVLGGGGDKTHTCPCPAPEL LGGPSVFLFPPPKPKDTLMTISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHAEALHNHYTQKSLSLSLSPGK
81.	VH CDR1 BCMA-14	DYYIN
82.	VH CDR2 BCMA-14	WIYFASGNSEYNQKFTG
83.	VH CDR3 BCMA-14	LYDWDYFV
84.	VL CDR1 BCMA-14	KSSQSLVHSNGNTYLH
85.	VL CDR2 BCMA-14	KVSNRFS
86.	VL CDR3 BCMA-14	SQSSIYPWT
87.	VH BCMA-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGQGLFWMGWTFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSEDYAVYFCAASLYDWDYFVWGQGTMTVTVSS
88.	VL BCMA-14	DIVMTQTPLSLSVTFGGPASPISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLGKPGQSPQLLIYKVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAE DVGIYYCSQSSIYPWTFGGQTKLEIK

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

77

SEC ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
89.	scFv BCMA-14	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGGGLEWMGWIFYASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSED TAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNSNGNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSITYPWTFGGQTKLEIK
90.	Moleculă bispecifică BCMA-14 xI2C	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGGGLEWMGWIFYASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSED TAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNSNGNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSITYPWTFGGQTKLEIKSGGGSGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMMNLKTED TAVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTPLTVTSVSGGGSGGGSGGGGSGTAVTQRPSTVSPGGTAVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGSTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYICVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGCGGDKTHTCPPCPA PELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTRKPEEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSGF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
91.	Moleculă scFc bispecifică BCMA-14 xI2C — scFc	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGGGLEWMGWIFYASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSED TAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNSNGNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSITYPWTFGGQTKLEIKSGGGSGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMMNLKTED TAVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTPLTVTSVSGGGSGGGSGGGGSGTAVTQRPSTVSPGGTAVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGSTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYICVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGCGGDKTHTCPPCPA PELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTRKPEEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSGF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
92.	Moleculă scFc bispecifică BCMA-14 xI2C — scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGGGLEWMGWIFYASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSED TAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNSNGNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSITYPWTFGGQTKLEIKSGGGSGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARISKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMMNLKTED TAVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTPLTVTSVSGGGSGGGSGGGGSGTAVTQRPSTVSPGGTAVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGSTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYICVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGCGGDKTHTCPPCPA PELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTRKPEEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSGF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
93.	VH (CC) BCMA-14_CC	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGGGLEWMGWIFYASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSED TAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSS
94.	VL (CC) BCMA-14_CC	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAE DVGIYYCSQSSITYPWTFGGQTKLEIK
95.	scFv (CC) BCMA-14_CC	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSCKASGYSFPDYINWVRQAPGGGLEWMGWIFYASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSL TSED TAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNSNGNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSITYPWTFGGQTKLEIK

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

78

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
96.	Moleculă bispecifică (CC) BCMA-14_CC xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGGQFASISCKSSQSLVHSNGNTYLNHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNNRFSGVNDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVEGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYFNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGVQPDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
97.	Moleculă scFc bispecifică (CC) BCMA-14_CC xI2C —scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGGQFASISCKSSQSLVHSNGNTYLNHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNNRFSGVNDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVEGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYFNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGVQPDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK
98.	Moleculă scFc bispecifică (CC) BCMA-14_CC xI2C — scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGGQFASISCKSSQSLVHSNGNTYLNHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNNRFSGVNDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVEGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYFNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGVQPDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK
99.	balama IgG1	DKTHTCPPCP
100.	balama IgG2	ERKCCVECP
101.	balama IgG3	ELKTPDLTHTCPRCP
102.	balama IgG4	ESKYGPPCPSCP
103.	balama IgG3	ELKTPGLDTHTCPRCP
104.	balama IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

79

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
105.	Țintă F (cc) x I2C -Balama-CH2-CH3-linker-balama-CH2-CH3 moleculă HLE bispecifică (DF9)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSDKYAASVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGYDILTG NPRDFDYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDT VMTQTPLSSHVT LGQPASISCRSSQSLVHSD GNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVG VYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGT VVTQEP SLTVSPGGTVLTLCSSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGT PARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLT VLVHSD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLT DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
106.	Țintă F (cc) x I2C -Balama-CH2-CH3-linker-CH2-CH3 moleculă HLE bispecifică (T2G)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSDKYAASVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
		RAEDTAVYYCARDGYDILTG NPRDFDYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDT VMTQTPLSSHVT LGQPASISCRSSQSLVHSD GNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVG VYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGT VVTQEP SLTVSPGGTVLTLCSSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGT PARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLT VLVHSD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLT DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
107.	Țintă F (cc) x I2C -Balama-CH2-linker-Balama-CH2-CH3-linker-CH3 moleculă HLE bispecifică (D3L)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSDKYAASVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGYDILTG NPRDFDYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDT VMTQTPLSSHVT LGQPASISCRSSQSLVHSD GNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVG VYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGT VVTQEP SLTVSPGGTVLTLCSSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGT PARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLT VLVHSD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGSGGGGSGGGGSGGGGSGDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLT VLVHSDWLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVME ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
108.	Țintă F (cc) x I2C -Balama-CH2-linker-CH2-CH3-linker-CH3 moleculă HLE bispecifică (T7I)	QVQLVESGGGVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGCTKLTVLCCGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKCEEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109.	Țintă F (cc) x I2C -CH2-linker-CH2-CH3-linker-CH3 moleculă HLE bispecifică (K6C)	QVQLVESGGGVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGCTKLTVLGCGGAPPELLG
		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKCEEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKCGGSGCGGSGCGGSGCGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKCEEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110.	SECV ID NR: 23 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGCTKLTVL
111.	SECV ID NR: 25 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGCTKLTVL
112.	SECV ID NR: 41 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGCTKLTVL
113.	SECV ID NR: 43 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGCTKLTVL
114.	SECV ID NR: 59 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLTSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGCTKLTVL

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

81

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
115.	SECV ID NR: 61 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
116.	SECV ID NR: 77 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
117.	SECV ID NR: 79 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
118.	SECV ID NR: 95 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGATDMRFSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
119.	SECV ID NR: 97 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGATDMRFSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
120.	SECV ID NR: 113 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
121.	SECV ID NR: 115 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
122.	SECV ID NR: 131 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLSWYAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGATDMRFSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
123.	SECV ID NR: 133 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNKYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLSWYAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVVTQEPsLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGATDMRFSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL

MD/EP 3411402 T2 2022.05.31

82

SECV ID NR:	Descriere	SECVENȚĂ
124.	SECV ID NR: 149 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSXYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISWYAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
125.	SECV ID NR: 151 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSXYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISWYAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSELVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG YYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL
126.	SECV ID NR: 167 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSXYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWYAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG NYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL
127.	SECV ID NR: 169 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSXYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWYAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSELVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG NYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL
128.	SECV ID NR: 185 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSXYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG NYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL
129.	SECV ID NR: 187 din WO 2008/119567 liant CD3ε scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSXYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSELVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSG NYPNWVQCKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- S HIPP ET AL: "A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo", LEUKEMIA., 13 January 2017 (2017-01-13), XP055338781, US ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2016.388
- WO-A1-2013/072406
- WO-A1-2014/122143
- WO-A1-2014/138449
- WO-A2-2012/088461

(57) Revendicări:

1. Construct de anticorp cu un singur lanț care cuprinde:

- un prim domeniu care se leagă de BCMA,
- un al doilea domeniu care se leagă de un epitop extracelular al lanțului CD3ε uman și/sau de *Macaca*; și
- un al treilea domeniu care cuprinde doi monomeri polipeptidici, fiecare cuprinzând o balama, un domeniu CH2 și un domeniu CH3, în care respectivii doi monomeri polipeptidici sunt fuzionați unul cu altul printr-un linker peptidic.

2. Construct de anticorp conform revendicării 1, în care al treilea domeniu menționat cuprinde într-o ordine amino până la carboxil:

balama-CH2-CH3-linker-balama-CH2-CH3.

3. Construct de anticorp conform revendicării 1 sau 2, în care fiecare dintre monomerii polipeptidici menționați are o secvență de aminoacizi care este cel puțin 90% identică cu o secvență selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17-24.

4. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care fiecare dintre monomerii polipeptidici menționați are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17-24.

5. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care domeniul CH2 cuprinde o punte disulfură de cisteină intra-domeniu.

6. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care

(i) primul domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorpi și al doilea domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorpi;

(ii) primul domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorp și al doilea domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorp;

(iii) primul domeniu cuprinde două domenii variabile de anticorpi și al doilea domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorpi; sau

(iv) primul domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorp și al doilea domeniu cuprinde un domeniu variabil de anticorp.

7. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care primul și al doilea domeniu sunt fuzionate cu al treilea domeniu prin intermediul unui linker peptidic.

8. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, care cuprinde, într-o ordine amino până la carboxil:

(a) primul domeniu;

(b) un linker peptidic care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1-3;

(c) al doilea domeniu;

(d) un linker peptidic care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1, 2, 3, 9, 10, 11 și 12;

(e) primul monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu;

(f) un linker peptidic care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 5, 6, 7 și 8; și

(g) al doilea monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu.

9. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, care cuprinde, într-o ordine amino până la carboxil:

(a) primul domeniu care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 53, 59, 71, 77, 89 sau 95;

(b) un linker peptidic care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1-3;

(c) al doilea domeniu care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 sau 129, sau SECV ID NR: 15;

(d) un linker peptidic care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1, 2, 3, 9, 10, 11 și 12;

(e) primul monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17-24;

(f) un linker peptidic care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 5, 6, 7 și 8; și

(g) al doilea monomer polipeptidic al celui de-al treilea domeniu care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 17-24.

10. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările precedente, care are o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 55, 56, 61, 62, 73, 74, 79, 80, 91, 92, 97 și 98.

11. Polinucleotidă care codifică un construct de anticorp așa cum este definit în oricare dintre revendicările precedente.

12. Vector care cuprinde o polinucleotidă așa cum este definită în revendicarea 11.

13. Celulă gazdă transformată sau transfectată cu polinucleotida definită în revendicarea 11, sau cu vectorul definit în revendicarea 12.

14. Procedeu pentru producerea unui construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 10, procedeul menționat cuprinzând cultivarea unei celule gazdă așa cum este definită în revendicarea 13 în condiții care să permită exprimarea constructului de anticorp definit în oricare dintre revendicările de la 1 la 10 și recuperarea constructului de anticorp produs din cultură.

15. Compoziție farmaceutică care cuprinde un construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 10, sau produs conform procedurii din revendicarea 14.

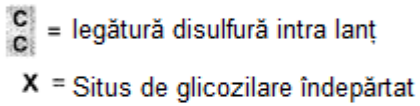
16. Compoziția farmaceutică conform revendicării 15, care este stabilă timp de cel puțin patru săptămâni la aproximativ -20°C.

17. Construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 10 pentru utilizare în prevenirea sau tratamentul unei tumori sau unei boli autoimune.

18. Construct de anticorp pentru utilizare conform revendicării 17, în care tumora este selectată din grupul care constă din mielom multiplu, plasmacitom, leucemie cu celule plasmactice, macroglobulinemie Waldenstrom, plasmacitom osos solitar, plasmacitom extramedular, mielom osteosclerotic, mielom multiplu mocnit, Limfom Hodgkin non-celule B, leucemi limfocitară cronică și limfom Hodgkin.

19. Trusă care cuprinde un construct de anticorp conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 10, sau produs conform procedurii din revendicarea 14, o polinucleotidă definită în revendicarea 11, un vector definit în revendicarea 12 și/sau o celulă gazdă definită în revendicarea 13.

a) Construct de anticorp Fc bispecific cu un singur lanț



The diagram illustrates a genetic cross between two heterozygous parents, labeled CH and CL. Each parent is represented by an oval containing two alleles: VH1 and VH2 for the CH parent, and VL1 and VL2 for the CL parent. The F2 generation is shown below, with a 16:3 phenotypic ratio of black to white mice. The black mice are represented by large black ovals, and the white mice are represented by small white ovals with black dots indicating the presence of the recessive alleles.

Figura 2

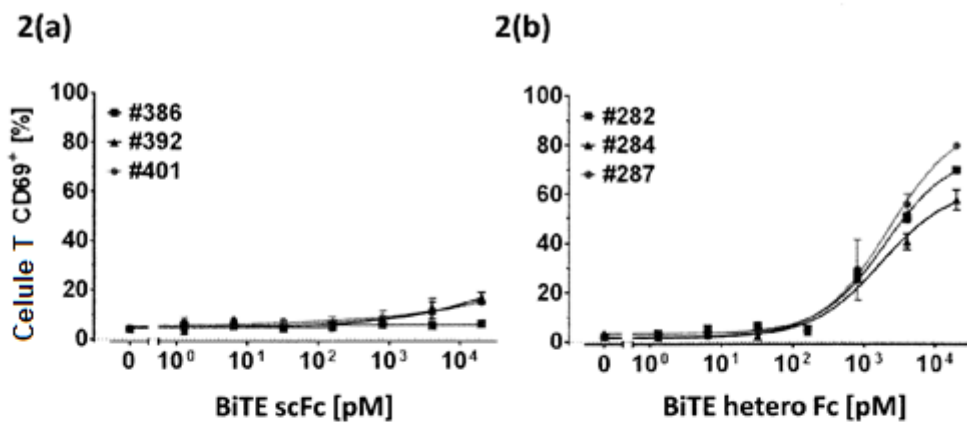
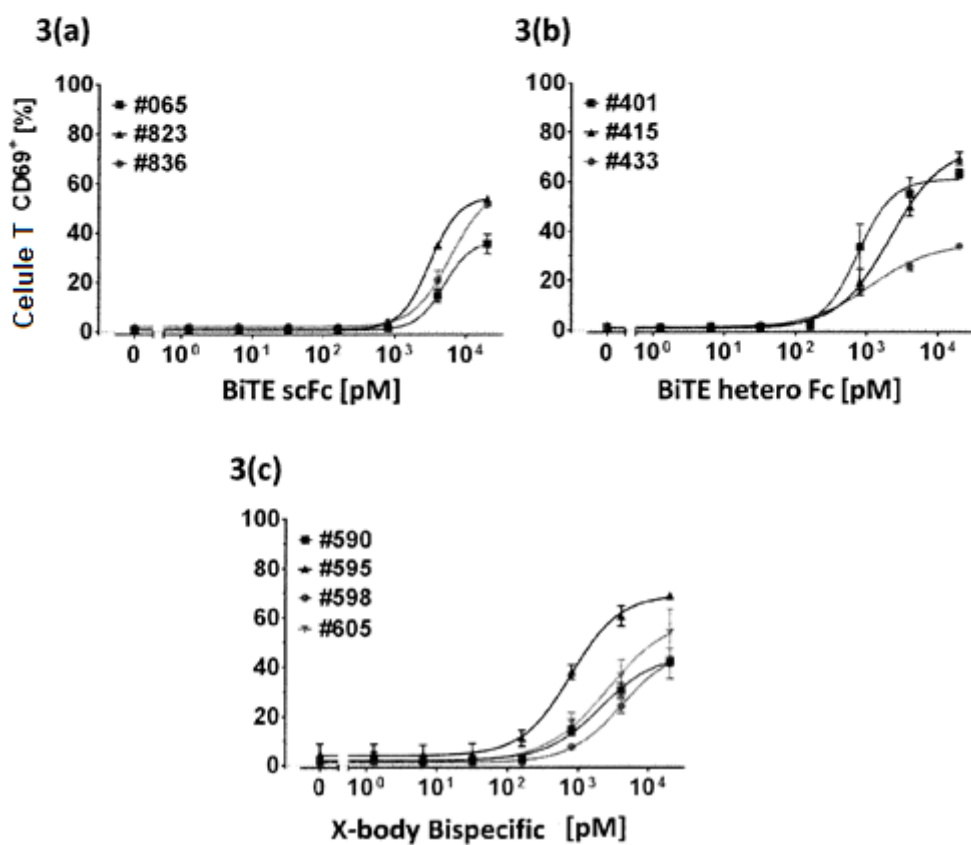


Figura 3



3(c)

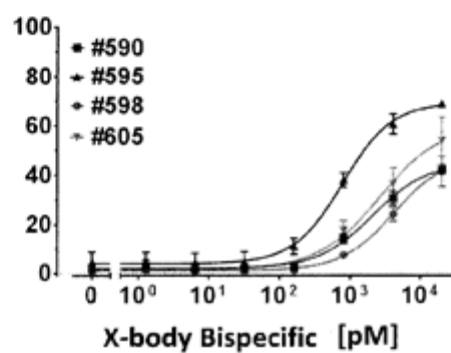


Figura 3 continuare

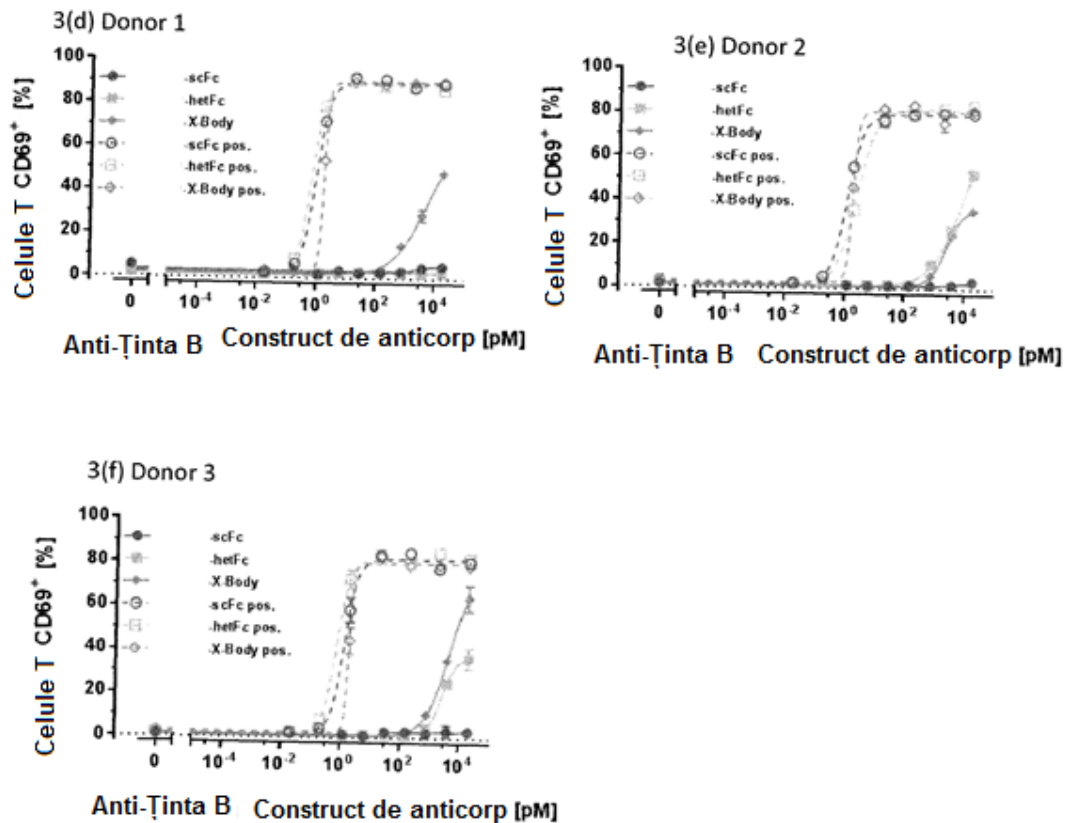


Figura 4

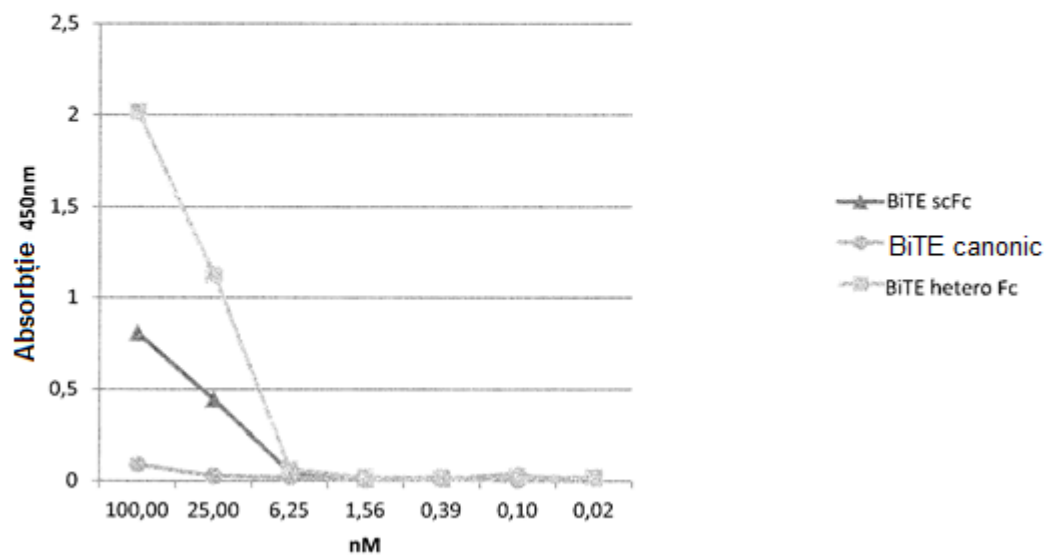


Figura 5

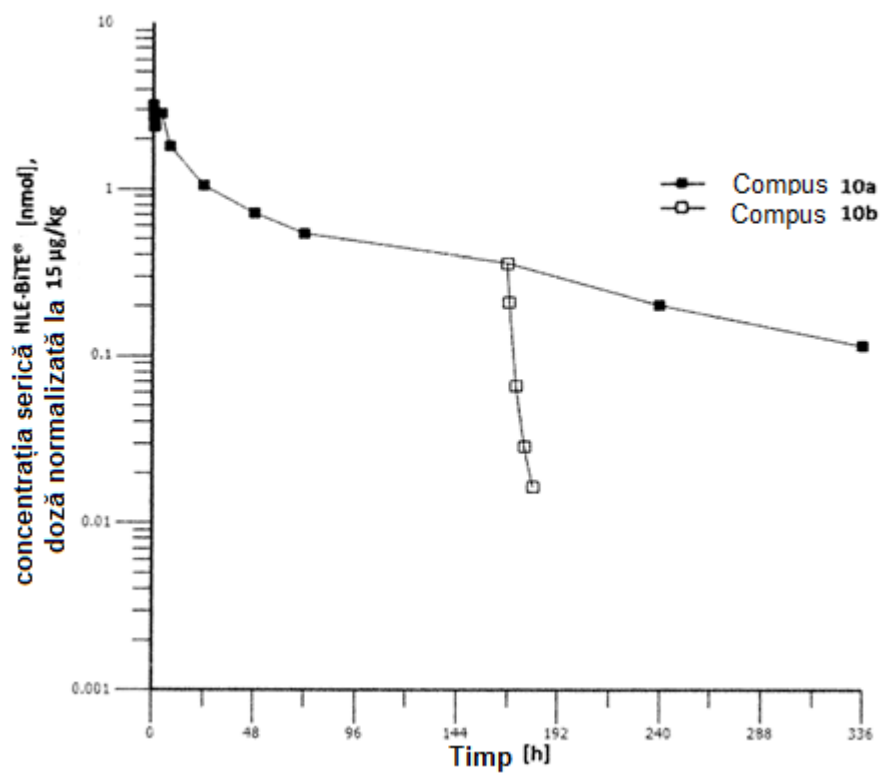


Figura 6

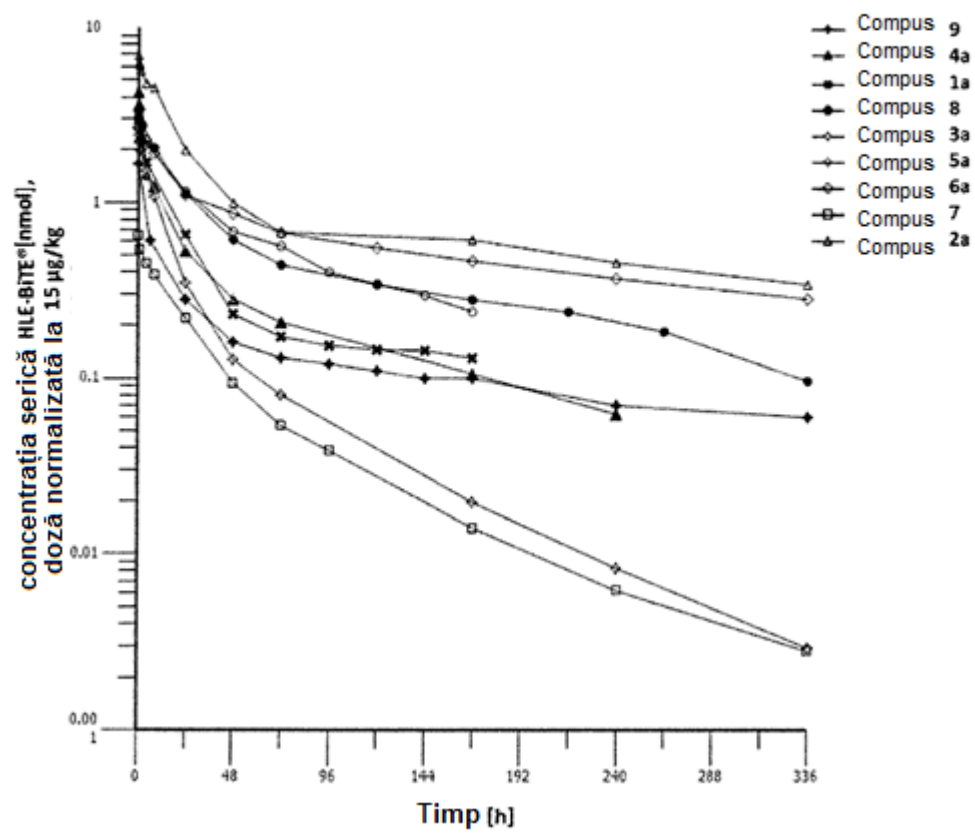


Figura 7

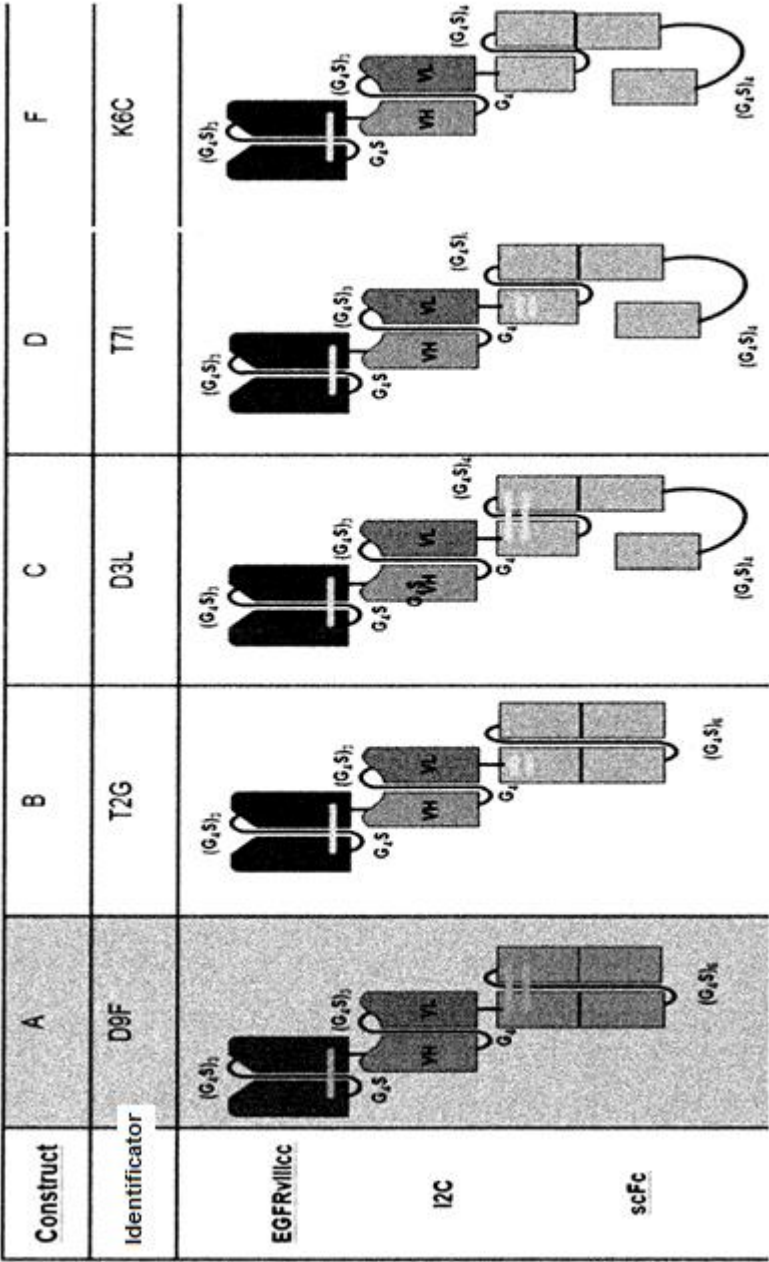


Figura 8A

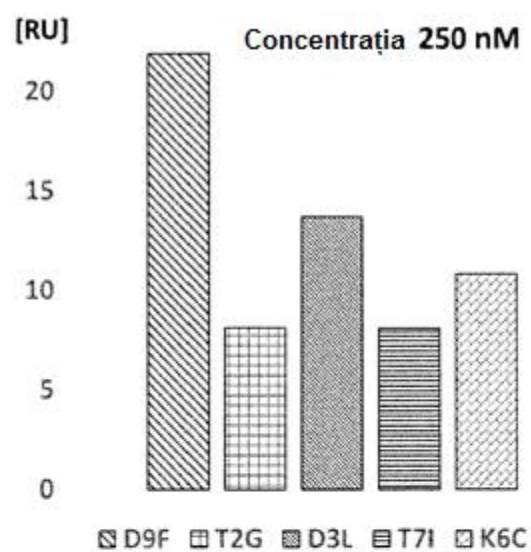


Figura 8B

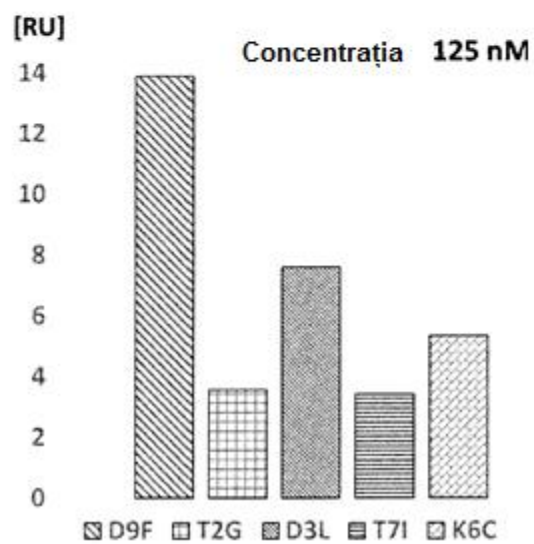


Figura 9