



\* B R 1 2 2 0 2 4 0 0 3 7 8 7 A 2 \*

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 122024003787-4 A2

(22) Data do Depósito: 10/08/2017

(43) Data da Publicação Nacional:  
14/05/2019

(54) **Título:** RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO QUE DIRECIONAM BCMA E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) **Int. Cl.:** C07K 19/00; C12N 5/10; A61K 39/395; A61P 35/00; A61P 35/02.

(30) **Prioridade Unionista:** 10/08/2016 CN PCT/CN2016/09440 8.

(71) **Depositante(es):** LEGEND BIOTECH IRELAND LIMITED.

(72) **Inventor(es):** XIAOHU FAN; QIUCHUAN ZHUANG; PINGYAN WANG; XIAOHU FAN; LEI YANG; JIAYING HAO; DAN ZHAO; XIAN HE.

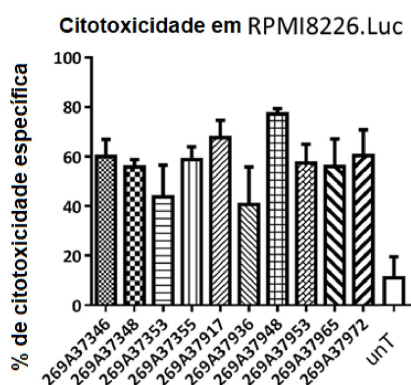
(86) **Pedido PCT:** PCT CN2017096938 de 10/08/2017

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/028647 de 15/02/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 26/02/2024

(62) **Pedido original do dividido:** BR112019002687-8 - 10/08/2017

(57) **Resumo:** RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO QUE DIRECIONAM BCMA E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. O presente pedido fornece anticorpos de domínio único que direcionam BCMA e receptores de antígeno quiméricos (tal como CAR monovalente e CAR multivalente incluindo CAR de biepítopo) compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-BCMA. Adicionalmente são fornecidas células efectoras imunes engenheiradas (tal como células T) que compreendem os receptores de antígenos quiméricos. Também são fornecidas composições farmacêuticas, kits e métodos de tratamento de câncer.



## Relatório Descritivo de Patente de Invenção para **RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO QUE DIRECIONAM BCMA E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS**

Dividido do BR11 2019 002687-8, de 10/08/2017.

[0001] Este pedido reivindica os benefícios prioritários do Pedido de Patente Internacional PCT/CN2016/094408 depositado em 10 de agosto de 2016, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

### APRESENTAÇÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS EM ARQUIVO DE TEXTO ASCII

[0002] O conteúdo da seguinte apresentação em arquivo de texto ASCII é aqui incorporado por referência na sua totalidade: uma forma legível por computador (CRF) da Listagem de Sequências (nome do arquivo:761422000640SEQLISTING. txt, data registrada:10 de agosto de 2017, tamanho:520 KB).

### CAMPO DO PRESENTE PEDIDO

[0003] A presente invenção se refere a anticorpos de domínio único, receptores de antígeno quiméricos e células efectoras imunes engenheiradas que direcionam BCMA e métodos de uso dos mesmos.

### FUNDAMENTO DO PRESENTE PEDIDO

[0004] Com o desenvolvimento de imunoterapia tumoral e tecnologia clínica, a imunoterapia com células T de receptor de antígeno quimérico (CAR-T) é agora uma das abordagens de imunoterapia tumoral mais promissoras. Com o desenvolvimento de imunoterapia e tecnologia médica, uma imunoterapia com células T de receptor de antígeno quimérico (CAR) é agora uma das abordagens de imunoterapia tumoral mais promissoras. O domínio de ligação ao antígeno extracelular pode compreender um fragmento variável de cadeia única (scFv) visando um antígeno tumoral identificado. Os CARs podem ser expressos na superfície das células T usando técnicas de transfecção de genes. Após a ligação ao antígeno do tumor alvo, os CARs podem ativar as células T para iniciar a resposta antitumoral específica de uma maneira dependente do antígeno sem ser limitada pela disponibilidade de complexos principais de histocompatibilidade (MHC) específicos para o antígeno do tumor alvo.

[0005] Anticorpos de domínio único (sdAbs) são diferentes dos anticorpos convencionais de 4 cadeias possuindo um domínio variável de anticorpo monomérico único. Por exemplo, camelídeos e tubarões sdAbs denominados anticorpos de cadeia pesada (HcAbs), que naturalmente carecem de cadeias leves. O fragmento de ligação ao antígeno em cada braço dos anticorpos da cadeia pesada do camelídeo possui um domínio variável de cadeia pesada (V<sub>H</sub>H), que pode ter alta afinidade com um antígeno sem o auxílio de uma cadeia leve. O V<sub>H</sub>H de camelídeo é conhecido como o fragmento de ligação ao menor antígeno funcional com um peso molecular de aproximadamente 15 kD.

[0006] A mieloma múltipla (MM) é uma doença maligna do plasma agressivo incurável, que é categorizada como uma neoplasia de células B e prolifera no método incontrolável na medula óssea, interferindo com a produção metabólica normal de células sanguíneas e causando lesões ósseas dolorosas (Garfall, A. L. *et al.*, *Discovery Med.* 2014, 17, 37). A mieloma múltipla pode apresentar-se clinicamente com hipercalcemia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas, infecções bacterianas, hiperviscosidade e amiloidose (Robert Z. Orlowski, *Cancer Cell.* 2013, 24(3)). De acordo com a investigação e as estatísticas, cerca de 86.000 pacientes serão diagnosticados a cada ano com mieloma, e cerca de 63.000 pacientes morrem todos os anos com complicações relacionadas à doença (Becker, 2011). Por causa do envelhecimento populacional, prevê-se que o número de casos de mieloma aumentará ano a ano. Como muitos tipos de câncer, não existe uma causa conhecida de mieloma múltiplo e nenhuma cura. Alguns tratamentos para mieloma múltiplo são semelhantes aos tratamentos para outros tipos de câncer, como quimioterapia ou radioterapia, transplante de células-tronco ou transplante de medula óssea, terapia direcionada ou terapia biológica (George, 2014). As imunoterapias de células baseadas em anticorpos demonstraram benefícios clínicos substanciais para pacientes com neoplasias hematológicas, particularmente no linfoma não Hodgkin de células B. Embora as terapias atuais para mieloma múltiplo levem a remissões, quase todos os pacientes acabam recaindo. Existe a necessidade de um agente imunoterapêutico eficaz para tratar o mieloma múltiplo.

[0007] O LCAR-B38M divulgado na presente invenção é um BCMA bivalente que tem como alvo CAR-T e que já demonstrou vantagens clínicas em termos de segurança e eficácia no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo refratário ou recidivado em um ensaio clínico. Em um ensaio clínico inicial, 33 de 35 (94%) pacientes tiveram remissão

clínica de mieloma múltiplo ao receber células T-CAR LCAR-B38M. A maioria dos pacientes teve apenas efeitos colaterais leves. O estudo foi apresentado pelo principal inventor na reunião anual da ASCO 2017 (Resumo LBA3001) e na coletiva de imprensa que recrutou ampla cobertura da mídia. (<http://www.ascopost.com/News/55713>).

**[0008]** No geral, a taxa de resposta objetiva foi de 100% e 33 pacientes (94%) tiveram uma remissão clínica evidente de mieloma (resposta completa, resposta parcial muito boa ou resposta parcial) dentro de 2 meses após o recebimento das células T CAR. Após seguir o grupo por um período de mais de 4 meses, dos 19 pacientes, 14 alcançaram critérios de resposta completa rigorosos, 1 paciente atingiu resposta parcial e 4 pacientes obtiveram critérios de remissão parcial muito bons em eficácia.

**[0009]** Como o excelente perfil de eficácia e segurança obtido do estudo clínico LCAR-B38M é significativamente superior ao de alguns outros estudos de BCMA CAR-T relatados ao mesmo tempo na ASCO, os trabalhos foram amplamente reconhecidos como um “avanço revolucionário” no campo da imunoterapia. É notável que todas estas concepções de BCMA CAR são CAR convencionais em que o domínio de ligação ao antígeno BCMA é composto por um anticorpo ScFv monovalente.

**[0010]** As divulgações de todas as publicações, patentes, pedidos de patente e pedidos de patente publicados aqui referidos são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

#### BREVE SUMÁRIO DO PRESENTE PEDIDO

**[0011]** O presente pedido proporciona anticorpos de domínio único anti-BCMA (sdAb), receptores de antígeno quimérico (CARs) compreendendo um ou mais sdAbs anti-BCMA (tais como fragmentos de V<sub>H</sub>H), células efetoras imunes engenheiradas e métodos de uso das mesmas na imunoterapia do câncer.

**[0012]** Um aspecto do presente pedido proporciona um sdAb anti-BCMA compreendendo as regiões CDR de qualquer uma das SEQ ID NOs:115-152. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende qualquer um dos seguintes:(1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:77; (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:78; (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3; uma



CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:79; (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:80; (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:81; (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:82; (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:83; (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84; (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:85; (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:86; (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:87; (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:88; (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:89; (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:52; e uma CDR3

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:90; (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:91; (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:92; (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:93; (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:94; (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:95; (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:96; (21) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:97; (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:98; (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:99; (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100; (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25; uma CDR2

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:101; (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:102; (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:103; (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:104; (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:105; (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:106; (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:69; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:107; (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:108; (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:109; (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:110; (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:111; (36) uma CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:112; (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113; or (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:114. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:115-152.

**[0013]** Em algumas modalidades, é proporcionado um anticorpo anti-BCMA de cadeia pesada (HCAB) ou uma proteína de ligação ao antígeno compreendendo qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima. São também proporcionados epítomos BCMA que qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima se ligam especificamente a anticorpos anti-BCMA (tais como sdAbs anti-BCMA) que competem com qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima.

**[0014]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima, o sdAb anti-BCMA é um anticorpo de camelídeo. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é um anticorpo quimérico. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é um fragmento de V<sub>H</sub>H.

**[0015]** Um aspecto do presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico BCMA compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um sdAb anti-BCMA (tal como qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima); (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o CAR é monoespecífico. Em algumas modalidades, o CAR é monovalente. Em algumas modalidades, o CAR é multivalente (como bivalente ou trivalente). Em algumas modalidades, o CAR é multiespecífico (como biespecífico). Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno extracelular compreende pelo menos dois sdAbs anti-BCMA (como qualquer um ou mais dos sdAbs anti-BCMA descritos acima).

**[0016]** Um aspecto do presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico multivalente (CAR) compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA e uma segunda fração de ligação ao BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, uma ou mais da primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA é um primeiro sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um segundo sdAb anti-BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é derivada de um anticorpo humano. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um ligando polipeptídico de BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA ligam-se especificamente ao mesmo epítipo no BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA ligam-se especificamente a diferentes epítipos em BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA e/ou a segunda fração de ligação ao BCMA se liga especificamente a um epítipo em BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs:388-394. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA se liga especificamente a um epítipo derivado da SEQ ID NO:389 e/ou 390. Em algumas modalidades, a segunda fração de ligação ao BCMA se liga especificamente a um epítipo derivado da SEQ ID NO:391 e/ou 392.

**[0017]** Um aspecto do presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico multivalente (como bivalente ou trivalente) compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA (tal como qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima) e um segundo sdAb anti-BCMA (tal como qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima); (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA e o segundo sdAb anti-BCMA ligam-se especificamente ao mesmo epítipo no BCMA. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA e o segundo sdAb anti-BCMA ligam-se especificamente a epítipos diferentes em BCMA. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA e/ou o

segundo sdAb anti-BCMA se liga especificamente a um epítopo em BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs:388-394. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA se liga especificamente a um epítopo derivado da SEQ ID NO:389 e/ou 390. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA se liga especificamente a um epítopo derivado da SEQ ID NO:391 e/ou 392.

**[0018]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos CARs multivalentes proporcionados acima, a primeira fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) está localizado no N-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA). Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) está localizado no C-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA). Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) e a segunda fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA) são diretamente fundidos entre si através de uma ligação peptídica. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) e a segunda fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA) são fundidos um ao outro através de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o ligante peptídico não tem mais que cerca de 50 (tal como não mais que qualquer um 35, 25, 20, 15, 10 ou 5) aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs:208-215.

**[0019]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos CARs (incluindo CARs multivalentes) descritos acima, o domínio transmembranar é derivado de uma molécula selecionada do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é derivado de CD8 $\alpha$  ou CD28. Nas modalidades preferenciais, o domínio transmembranar compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:193 ou 194.

**[0020]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos CARs (incluindo CARs multivalentes) descritos acima, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (como um Célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é



derivado de CD3 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:197 ou 198.

**[0021]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos CARs (incluindo CARs multivalentes) descritos acima, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador compreende um domínio citoplasmático de CD28 e/ou um domínio citoplasmático de CD137. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:195 e/ou SEQ ID NO:196.

**[0022]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos CARs (incluindo CARs multivalentes) descritos acima, o CAR também compreende um domínio de dobradiça localizado entre o C-termina do domínio de ligação do antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é derivado do CD8 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio da dobradiça compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:192.

**[0023]** Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos CARs (incluindo CARs multivalentes) descritos acima, o CAR compreende ainda um peptídeo de sinal localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é derivado de uma molécula selecionada do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , receptor GM-CSF $\alpha$  e cadeia pesada IgG1. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é derivado de CD8 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:191.

**[0024]** Um aspecto do presente pedido proporciona um CAR conforme listado nas Tabelas 4 e 5. Em algumas modalidades, o CAR é uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:216-256 e 298-335.

**[0025]** Um aspecto do presente pedido proporciona um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:115-152, 216-256 e 298-335.



**[0026]** Um aspecto do presente pedido proporciona um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer um dos sdAbs anti-BCMA ou CARs (incluindo CARs multivalentes) descritos acima. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico é selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:153-190, 257-297 e 336-373. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende ainda uma primeira sequência de ácido nucleico que codifica um primeiro CAR, em que a segunda sequência de ácido nucleico que codifica o segundo CAR é operacionalmente ligada à primeira sequência de ácido nucleico através de uma terceira sequência de ácido nucleico que codifica um peptídeo de clivagem automática, tal como um peptídeo T2A, P2A ou F2A. Em que a terceira sequência de ácido nucleico é SEQ ID NO:385. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é um molécula de DNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é uma molécula de RNA.

**[0027]** Um aspecto do presente pedido proporciona um vetor compreendendo qualquer um dos ácidos nucleicos isolados descritos acima. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de expressão. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor viral. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor lentiviral. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor não viral.

**[0028]** Um aspecto do presente pedido proporciona uma célula efetora imune engenheirada, compreendendo qualquer um dos CARs (incluindo CARs multivalentes) proporcionados acima ou qualquer um dos ácidos nucleicos isolados descritos acima, ou qualquer um dos vetores descritos acima. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é uma célula T, uma célula NK, uma célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma célula-tronco hematopoiética, uma célula-tronco pluripotente ou uma célula-tronco embrionária. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é uma célula T.

**[0029]** Um aspeto do presente pedido proporciona uma composição farmacêutica compreendendo qualquer uma das células efetoras imunes engenheiradas descritas acima e um transportador farmacêuticamente aceitável. É também proporcionado um método para tratar o câncer num indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de qualquer uma das composições farmacêuticas descritas acima. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é autóloga. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é alogênica. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer líquido. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo, leucemia

linfoblástica aguda ou leucemia linfocítica crônica. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer sólido, tal como glioblastoma. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado.

**[0030]** Um aspecto do presente pedido proporciona uma composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima e um transportador farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de tratamento de uma doença (tal como câncer) num indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica.

**[0031]** Também são proporcionados métodos de uso, kits e artigos de fabricação que compreendem qualquer um dos sdAbs anti-BCMA, CARs (incluindo CARs multivalentes), células efectoras imunes engenheiradas, ácidos nucleicos isolados ou vetores descritos acima.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

**[0032]** As FIGs. 1A-1B mostram os resultados de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* de células T que expressam CARs monoespecíficos exemplificativos compreendendo vários sdAbs anti-BCMA contra células RPMI8226.Luc (FIG. 1A), ou células U87MG.Luc (FIG. 1B).

**[0033]** As FIGs. 2A-2C mostram os resultados de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* de células T que expressam CARs monoespecíficos exemplificativos compreendendo vários sdAbs anti-BCMA contra células RPMI8226.Luc (FIG. 2A), células K562.BCMA.Luc (FIG. 2B), ou células K562.CD19.Luc (FIG. 2C).

**[0034]** A FIG. 3 mostra resultados de um ensaio de liberação de IFN $\gamma$  *in vitro* de células T que expressam CARs monoespecíficos exemplificativos compreendendo vários sdAbs anti-BCMA contra células K562.BCMA.Luc.

**[0035]** As FIGs. 4A-4C mostram os resultados de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* de células T que expressam CARs BCMA multivalentes exemplificativas contra células RPMI8226.Luc (FIGs. 4A-4B) ou células U87MG.Luc (FIG. 4C).

**[0036]** As FIGs. 5A-5E mostram os resultados de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* de células T que expressam CARs BCMA bivalentes exemplificativos contra células RPMI8226.Luc (FIG. 5A), células K562.CD19.Luc (FIG. 5B), células A549.Luc (FIG. 5C), células U87MG.Luc (FIG. 5D) ou células Raji.Luc (FIG. 5E).

[0037] A FIG. 5F mostra resultados de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* de células T que expressam CAR BCMA bivalentes exemplificativos contra células K562.BCMA.Luc e células K562. CD38. Luc.

[0038] A FIG. 6A mostra resultados de um ensaio de liberação de IFN $\gamma$  *in vitro* de células T que expressam CARs BCMA bivalentes exemplificativas contra células K562.BCMA.Luc em duas razões de células efectoras diferentes para as células alvo.

[0039] A FIG. 6B mostra os resultados de um ensaio de liberação de IFN $\gamma$  *in vitro* de células T que expressam CARs BCMA bivalentes exemplificativos contra células RPMI8226.Luc, A549.Luc, K562. CD38. Luc e Raji.Luc.

[0040] As Figuras 7A-7C mostram a ligação de três fragmentos VHH exemplificativos a células K562.BCMA.Luc e células K562. CD38. Luc (controle negativo).

[0041] A FIG. 8A mostra uma estrutura cristalina do domínio extracelular de BCMA. A FIG. 8B mostra peptídeos de epítomos de BCMA.

[0042] As FIGs 9A-9B mostram resultados de ensaios de mapeamento de epítomo de VHH1 e VHH2.

[0043] A FIG. 10 mostra resultados de um ensaio de ligação competitiva utilizando células CHO-BCMA.

[0044] A FIG. 11 mostra a citotoxicidade *in vitro* de células T derivadas de doadores que expressam LCAR-B38M contra células RPMI8226.Luc

[0045] A FIG. 12A mostra a citotoxicidade *in vitro* de células T-CAR de LCAR-B38M preparadas a partir de um doador selecionado contra células RPMI8226.LucAs FIGs. 12B-12E mostra a atividade antitumoral *in vivo* de células T-CAR LCAR-B38M em modelo de camundongos xenoenxertados tumorais. A FIG. 12B mostra dados de imageamento de bioluminescência em camundongos tratados com CAR-T LCAR-B38M e camundongos tratados com células T não transduzidas (UnT). A FIG. 12C mostra a concepção do estudo e imagens de bioluminescência de camundongos no grupo CAR-T e no grupo UnT. A FIG. 12D mostra imagens de fígados de camundongos tratados com UnT. A FIG. 12E mostra um ensaio de luciferase *ex vivo* validando tumores nos fígados de camundongos tratados com UnT.

[0046] As FIGs. 13A-13F mostram parâmetros clínicos de dois macacos tratados com células T-CAR LCAR-B38M. Os parâmetros clínicos monitorizados no estudo incluem a temperatura corporal (FIG. 13A), peso corporal (FIG. 13B), Contagem de Sangue

Completa (CBC, FIGs. 13C e 13D), bem como os níveis de química e citocinas no soro (FIGs. 13E e 13F).

**[0047]** As FIGs. 14A-C mostram os ensaios de citotoxicidade in vitro sobre células T-CAR LCAR-B38M e células T-CAR LCAR-B27S preparadas a partir dos mesmos três pacientes com mieloma múltiplo, respectivamente. A FIG. 14A mostra os resultados de citotoxicidade in vitro de células T-CAR LCAR-B38M e células T-CAR LCAR-B27S preparadas a partir de paciente com mieloma múltiplo A. A FIG. 14B mostra os resultados de citotoxicidade in vitro de células T-CAR LCAR-B38M e células T-CAR LCAR-B27S preparadas a partir de paciente com mieloma múltiplo B. A FIG. 14C mostra os resultados de citotoxicidade in vitro de células T-CAR LCAR-B38M e células T-CAR LCAR-B27S preparadas a partir de pacientes com mieloma múltiplo C.

**[0048]** A FIG. 15A compara as estruturas de um CAR baseado em  $V_{HH}$  e um CAR convencional baseado em scFv. A estrutura esquemática à esquerda mostra um CAR monovalente monoespecífico exemplificativo que possui um domínio de ligação de antígeno extracelular compreendendo um domínio VHH. A estrutura esquemática à direita mostra um CAR monovalente monoespecífico exemplificativo que possui um domínio de ligação de antígeno extracelular compreendendo um domínio scFv.

**[0049]** A FIG. 15B compara as estruturas de um CAR baseado em  $V_{HH}$  tendo dois sítios de ligação ao antígeno e um CAR baseado em scFv convencional tendo dois sítios de ligação ao antígeno. A estrutura esquemática à esquerda é um CAR exemplificativo que possui um domínio de ligação do antígeno extracelular compreendendo dois domínios  $V_{HH}$ . Os dois domínios  $V_{HH}$  podem ser os mesmos ou diferentes. A estrutura esquemática à direita mostra um CAR exemplificativo possuindo um domínio de ligação de antígeno extracelular compreendendo dois domínios scFv. Os dois domínios scFv podem ser iguais ou diferentes.

**[0050]** A FIG. 15C mostra estruturas esquemáticas exemplificativas de CARs bivalentes e biespecíficos baseados em  $V_{HH}$ . A estrutura esquemática no painel superior esquerdo mostra um CAR exemplificativo de monoepítipo, bivalente possuindo um domínio de ligação do antígeno extracelular compreendendo dois domínios idênticos  $V_{HH}$ , cada um dos quais se liga especificamente ao epítipo 1 do antígeno A. A estrutura esquemática no painel superior direito mostra um CAR exemplificativo bivalente de monoepítipo que possui um domínio de ligação de antígeno extracelular compreendendo um primeiro

domínio V<sub>H</sub>H especificamente ligando ao epítopo 1 do antígeno A, e um segundo domínio V<sub>H</sub>H especificamente ligando ao epítopo 2 do antígeno A. O epítopo 1 e o epítopo 2 do antígeno A podem ser diferentes nas suas estruturas e/ou sequências. A estrutura esquemática no painel inferior esquerdo mostra um CAR bispecífico exemplificativo possuindo um domínio de ligação de antígeno extracelular compreendendo um primeiro domínio V<sub>H</sub>H especificamente ligando ao antígeno A, e um segundo domínio V<sub>H</sub>H especificamente ligando o antígeno B. O antígeno A e o antígeno B são antígenos diferentes.

**[0051]** A FIG. 15D mostra estruturas esquemáticas de CARs exemplificativos baseados em V<sub>H</sub>H com três ou mais domínios V<sub>H</sub>H. Os CARs podem ter uma pluralidade de domínios V<sub>H</sub>H fundidos um ao outro diretamente ou através de ligantes peptídicos. Os domínios V<sub>H</sub>H podem ser iguais ou diferentes. Domínios diferentes V<sub>H</sub>H podem se ligar especificamente a epítomos diferentes no mesmo antígeno ou antígenos diferentes.

**[0052]** A FIG. 15E mostra células efetoras imunes modificadas exemplificativas que coexpressam dois CARs diferentes baseados em V<sub>H</sub>H. A célula efetora imune modificada exemplificativa no painel esquerdo coexpressa dois CARs monospecíficos e monovalentes diferentes. A célula efetora imune engenheirada no painel central coexpressa um CAR monospecífico, monovalente e um CAR biespecífico ou bivalente. A célula efetora imune engenheirada exemplificativa no painel direito coexpressa dois CARs diferentes biespecíficos ou bivalentes. Os CARs podem reconhecer diferentes antígenos.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DO PRESENTE PEDIDO

**[0053]** O presente pedido proporciona anticorpos anti-BCMA de domínio único (sdAb) e receptores de antígeno quimérico (CARs) compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma ou mais frações de ligação ao BCMA (tais como sdAbs anti-BCMA). CARs multivalentes compreendendo pelo menos duas frações de ligação (tais como sdAbs) que se ligam especificamente a um único antígeno também são proporcionados. Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona CARs multivalentes (tais como bivalentes ou trivalentes) compreendendo pelo menos dois sdAbs anti-BCMA. Em algumas modalidades, os pelo menos dois sdAbs anti-BCMA são sdAbs anti-BCMA diferentes que se ligam especificamente a epítomos diferentes em BCMA. Os sdAbs anti-BCMA, CARs e células imunes engenheirados expressando CARs descritos no presente pedido são agentes úteis para o tratamento do câncer.

[0054] Notavelmente, o presente pedido demonstrou eficácia superior de CARs biepítopo bivalentes compreendendo dois sdAbs anti-BCMA tendo como alvo diferentes epítomos BCMA (*por exemplo*, LCAR-B38M), no tratamento do mieloma múltiplo em pacientes humanos. Em uma análise interina de um ensaio clínico de Fase I/II, 100% dos pacientes com mieloma múltiplo recidivado ou refratário responderam ao tratamento LCAR-B38M CAR-T. 94% dos pacientes tiveram remissão clínica evidente de mieloma dentro de dois meses após receberem o tratamento com CAR-T. Os pacientes que atingiram os critérios de resposta completa rigorosa (RCS) permaneceram livres de doença residual mínima após mais de um ano de tratamento com CAR-T. Além disso, o tratamento com LCAR-B38M CAR-T foi bem tolerado pelos pacientes, pois a maioria dos pacientes apresentou apenas síndrome de liberação de citocinas leve e gerenciável, um efeito colateral comum da terapia baseada em células T-CAR. Nenhum paciente apresentou efeitos colaterais neurológicos. Em comparação, um estudo clínico piloto de um CAR monovalente contendo um único sdAb anti-BCMA mostrou menor taxa de resposta objetiva e taxa de remissão completa, e maior taxa de recidiva entre os pacientes tratados. Antes deste pedido, todos os CARs BCMA em estudos clínicos tinham apenas uma fração de ligação ao BCMA no domínio de ligação ao antígeno extracelular. A eficácia clínica e segurança melhoradas dos CARs BCMA multivalentes da presente invenção são inesperadas.

[0055] Consequentemente, um aspecto do presente pedido proporciona um CAR multivalente compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma pluralidade de um anticorpo de domínio único (sdAb) que se liga especificamente ao BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular.

[0056] Noutro aspecto, é proporcionado um CAR multivalente compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítopo de BCMA, e uma segunda fração de ligação ao BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítopo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítopo é diferente do segundo epítopo.

[0057] Proporcionam-se ainda os novos sdAbs e CARs anti-BCMA compreendendo qualquer um ou mais dos sdAbs anti-BCMA aqui descritos.

[0058] As células efectoras imunes engenheiradas (tais como células T) que compreendem os CARs, composições farmacêuticas, kits, artigos de fabricação e métodos de tratamento de câncer usando as células efectoras imunes engenheiradas ou os sdAbs também são aqui descritas.

## I. Definições

[0059] O termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos de 4 cadeias de comprimento total ou anticorpos de cadeia pesada de comprimento total que possuem uma região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpos com especificidade poliepitópica, anticorpos multiespecíficos (*por exemplo*, anticorpos biespecíficos, diacorpos e moléculas de cadeia única), bem como fragmentos de anticorpos (*por exemplo*, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, e Fv). O termo "imunoglobulina" (Ig) é usado permutavelmente com "anticorpo" neste documento. Os anticorpos aqui contemplados incluem anticorpos de domínio único, tais como anticorpos de cadeia pesada apenas.

[0060] A unidade básica de anticorpo de 4 cadeias é uma glicoproteína heterotetramérica composta por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Um anticorpo IgM consiste em 5 das unidades heterotetraméricas básicas juntamente com um polipeptídeo adicional chamado cadeia J e contém 10 sítios de ligação ao antígeno, enquanto os anticorpos IgA compreendem de 2-5 das unidades básicas de 4 cadeias que podem polimerizar para formar conjuntos polivalentes em combinação com a cadeia J. No caso de IgGs, a unidade de 4 cadeias geralmente é de cerca de 150.000 Daltons. Cada cadeia L está ligada a uma cadeia H por uma ligação de dissulfeto covalente, enquanto as duas cadeias H estão ligadas entre si por uma ou mais ligações de dissulfeto, dependendo do isotipo de cadeia H. Cada cadeia H e L também tem pontes de dissulfeto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia H tem no N-terminal, um domínio variável (V<sub>H</sub>) seguido por três domínios constantes (C<sub>H</sub>) para cada uma das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  e quatro domínios C<sub>H</sub> para isotipos  $\mu$  e  $\epsilon$ . Cada cadeia L tem no N-terminal, um domínio variável (V<sub>L</sub>) seguido de um domínio constante na sua outra extremidade. O V<sub>L</sub> está alinhado com o V<sub>H</sub> e o C<sub>L</sub> está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada (C<sub>H1</sub>). Acredita-se que os resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os



domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada. O pareamento de  $V_H$  e  $V_L$  juntos formam um único sítio de ligação ao antígeno. Para a estrutura e propriedades das diferentes classes de anticorpos, ver *por exemplo*, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6. A cadeia L a partir de quaisquer espécies de vertebrados pode ser atribuída a um dos dois tipos claramente distintos, chamado kappa e lambda, com base nas sequências de aminoácido de seus domínios constantes. Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas ( $C_H$ ), as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes ou isotipos. Há cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, tendo cadeias pesadas designadas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respectivamente. As classes  $\gamma$  e  $\alpha$  são ainda divididas em subclasses com base em diferenças relativamente menores na sequência e na função  $C_H$ , *por exemplo*, os seres humanos expressam as seguintes subclasses: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

**[0061]** O termo “anticorpo de cadeia pesada” ou “HCAb” refere-se a um anticorpo funcional, que compreende cadeias pesadas, mas carece das cadeias leves geralmente encontradas em anticorpos de 4 cadeias. Animais camelídeos (como camelos, lhamas ou alpacas) são conhecidos por produzir HCABs.

**[0062]** O termo "anticorpo de domínio único" ou "sdAb" refere-se a um único polipeptídeo de ligação ao antígeno possuindo três regiões determinantes complementares (CDRs). O sdAb sozinho é capaz de se ligar ao antígeno sem pareamento com um polipeptídeo contendo CDR correspondente. Em alguns casos, os anticorpos de domínio único são projetados a partir de HCABs de camelídeo, e seus domínios variáveis de cadeia pesada são aqui referidos “ $V_{HH}$ s”. Alguns  $V_{HH}$ s também podem ser conhecidos como nanocorpos. O sdAb camelídeo é um dos menores fragmentos de anticorpos conhecidos que se ligam ao antígeno (ver, *por exemplo*, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-8 (1993); Greenberg *et al.*, Nature 374:168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)). Um  $V_{HH}$  básico tem a seguinte estrutura do N- terminal para o C-terminal:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, na qual FR1 a FR4 refere-se às regiões estruturais 1 a 4, respectivamente, e em que CDR1 a CDR3 se referem às regiões 1 a 3 de determinação de complementaridade.

**[0063]** Um anticorpo “isolado” é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural (*por exemplo*, natural ou recombinante). De preferência, o polipeptídeo isolado está livre de associação com todos os outros componentes de seu ambiente de produção. Componentes contaminantes de seu ambiente de produção, como aqueles que resultam de células transfectadas recombinantes, são materiais que tipicamente interfeririam na pesquisa, no diagnóstico ou nos usos terapêuticos para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteínicos ou não proteínicos. Em modalidades preferidas, o polipeptídeo será purificado:(1) a mais de 95% em peso de anticorpo como determinado por, por exemplo, o método de Lowry, e em algumas modalidades, a mais de 99% em peso; (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna por utilização de um sequenciador de copo giratório, ou (3) a homogeneidade por SDS-PAGE em condições não redutoras ou redutoras usando azul de Coomassie ou, de preferência, coloração de prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, visto que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Normalmente, entretanto, o polipeptídeo isolado ou anticorpo será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

**[0064]** A “região variável” ou o “domínio variável” se refere aos domínios amino-terminais da cadeia pesada ou leve do anticorpo. Os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve podem ser referidos como “V<sub>H</sub>” e “V<sub>L</sub>”, respectivamente. Esses domínios são geralmente as partes mais variáveis do anticorpo (em relação a outros anticorpos da mesma classe) e contêm os sítios de ligação ao antígeno. Somente os anticorpos de cadeia pesada da espécie Camelídeo possuem uma única região variável de cadeia pesada, que é referida como “V<sub>H</sub>H”. V<sub>H</sub>H é assim um tipo especial de V<sub>H</sub>.

**[0065]** O termo “variável” se refere ao fato de que determinados segmentos dos domínios variáveis diferem extensivamente na sequência entre os anticorpos. O domínio V medeia a ligação de antígeno e define a especificidade de um anticorpo particular para seu antígeno particular. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente em toda a extensão dos domínios variáveis. Em vez disso, ela está concentrada em três segmentos chamados regiões hipervariáveis (HVRs) tanto nos domínios variáveis da cadeia leve quanto da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves

nativas compreendem cada uma quatro regiões FR, adotando em grande parte uma configuração de folha beta, conectada por três HVRs, que formam alças de conexão e, em alguns casos, parte da estrutura da folha beta. As HVRs em cada cadeia são mantidas unidas em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as HVRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de anticorpos contra anticorpos (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas apresentam várias funções efetoras, tal como a participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

[0066] O termo “anticorpo monoclonal” conforme usado no presente documento se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto por mutações de ocorrência possivelmente natural e/ou modificações pós- traducionais (*por exemplo*, isomerizações, amidações) que podem estar presentes em menores quantidades. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigênico. Ao contrário de preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos visto que os mesmos são sintetizados pela cultura de hibridoma, ou recombinantemente, não contaminadas por outras imunoglobulinas. O modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por nenhum método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados em conformidade com o presente pedido podem ser feitos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (*por exemplo*, Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3):253-

260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies:A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. 1988); Hammerling *et al.*, em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de DNA recombinante (ver, *por exemplo*, Patente US 4.816.567), tecnologias de exibição de fagos (ver, *por exemplo*, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597

(1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); e Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), e tecnologias para produzir anticorpos humanos ou semelhantes a humanos em animais que possuem partes ou todos os loci de imunoglobulina humana ou genes que codificam sequências de imunoglobulina humana (ver, *por exemplo*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patente US 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); e Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

**[0067]** O termo “anticorpo nu” se refere a um anticorpo que não é conjugado a uma porção citotóxica ou marcador radioativo.

**[0068]** Os termos "anticorpo de comprimento total", "anticorpo intacto", e "anticorpo inteiro" são usados neste documento permutavelmente para se referir a um anticorpo na sua forma substancialmente intacta, em oposição a um fragmento de anticorpo. Especificamente, os anticorpos de 4 cadeias completas incluem aqueles com cadeias pesadas e leves incluindo uma região Fc. Os anticorpos de cadeia pesada de comprimento total incluem a cadeia pesada (como V<sub>H</sub>H) e uma região Fc. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (*por exemplo*, domínios constantes de sequência nativa humanos) ou variantes de sequência de aminoácidos dos mesmos. Em alguns casos, o anticorpo intacto pode ter uma ou mais funções efectoras.

**[0069]** Um "fragmento de anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo intacto, de preferência a ligação do antígeno e/ou a região variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (ver Patente US 5.641.870, Exemplo 2; Zapata *et al. Protein Eng.* 8 (10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticorpo de cadeia simples; anticorpos de domínio único (como V<sub>H</sub>H), e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos. A digestão com papaína de anticorpos produziu dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, chamados fragmentos "Fab" e um fragmento "Fc" residual, uma

designação que reflete a capacidade de cristalizar prontamente. O fragmento Fab consiste em uma cadeia L inteira, juntamente com o domínio da região variável da cadeia H ( $V_H$ ), e o primeiro domínio constante de uma cadeia pesada ( $C_{H1}$ ). Cada fragmento Fab é monovalente em relação à ligação ao antígeno, isto é, possui um único sítio de ligação ao antígeno. O tratamento com pepsina de um anticorpo produz um único fragmento grande  $F(ab')_2$  que corresponde grosso modo a dois fragmentos Fab ligados por dissulfeto com atividade diferente de ligação ao antígeno e ainda é capaz de reticular o antígeno. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab por terem alguns resíduos adicionais no terminal carboxi do domínio  $C_{H1}$  incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo  $F(ab')_2$  originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de dobradiça entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo também são conhecidos.

**[0070]** O fragmento Fc compreende as porções carboxi-terminal das duas correntes H mantidas juntas por dissulfetos. As funções efetoras dos anticorpos são determinadas por sequências na região Fc, a região que também é reconhecida pelos receptores Fc (FcR) encontrados em certos tipos de células.

**[0071]** "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo o qual contém um sítio de ligação e reconhecimento de antígeno completo. Este fragmento consiste em um dímero de um domínio de região variável de cadeia leve e cadeia pesada em associação estreita, não covalente. A partir do dobramento destes dois domínios emanam seis alças hipervariáveis (3 alças cada da cadeia H e L) que contribuem com os resíduos de aminoácido para ligação de antígeno e conferem especificidade de ligação de antígeno para o anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv que compreende somente três HVRs específicos para um antígeno) tem a habilidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em uma afinidade inferior do que o sítio de ligação inteiro.

**[0072]** "Fv de cadeia simples" também abreviado como "sFv" ou "scFv" são fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios  $V_H$  and  $V_L$  de anticorpo ligados a uma única cadeia polipeptídica. De preferência, o polipeptídeo sFv compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios  $V_H$  e  $V_L$  o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para a ligação do antígeno. Para uma revisão do sFv, ver Pluckthun em *The*

*Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0073] Os "fragmentos funcionais" dos anticorpos aqui descritos compreendem uma porção de um anticorpo intacto, incluindo geralmente a ligação de antígeno ou a região variável do anticorpo intacto ou a região Fc de um anticorpo que retém ou tem capacidade de ligação de FcR modificada. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem anticorpos lineares, moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

[0074] O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo preparados por construção de fragmentos de sFv (ver parágrafo anterior) com ligantes curtos (cerca de 5-10 resíduos) entre os domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de modo que o pareamento inter-cadeia, mas não intra-cadeia dos domínios V é obtido, resultando assim em um fragmento bivalente, *i. e.*, um fragmento com dois sítios de ligação ao antígeno. Os diacorpos bispecíficos são heterodímeros de dois fragmentos sFv de "cruzamento" em que os domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> dos dois anticorpos estão presentes em diferentes cadeias polipeptídicas. Diacorpos são descritos em mais detalhes em, por exemplo, EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

[0075] Os anticorpos monoclonais no presente documento especificamente incluem anticorpos "quiméricos" (imunoglobinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da cadeia(s) é(são) idêntico(s) a ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados uma outra espécie ou pertencendo a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem anticorpos PRIMATTZFD® em que a região de ligação ao antígeno do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por, *por exemplo*, imunização de macacos com um antígeno de interesse. Tal como aqui utilizado, "anticorpo humanizado" é utilizado um subconjunto de "anticorpos quiméricos".

[0076] Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (*por exemplo*, camelídeos) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não



humana. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado é uma imunoglobulina humana (anticorpo receptor) em que os resíduos de um HVR (a seguir definido) do receptor são substituídos por resíduos de uma HVR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano com a especificidade, afinidade e/ou capacidade desejada. Em alguns casos, os resíduos da estrutura ("FR") da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Ademais, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo de recipiendário ou no anticorpo de doador. Essas modificações podem ser feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo, como a afinidade de ligação. Em geral, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos os, pelo menos, um, e tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem aos de uma sequência de imunoglobulina não humana, e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana, embora as regiões FR possam incluir uma ou mais substituições de resíduo de FR individuais que melhorem o desempenho do anticorpo, tais como a afinidade de ligação, isomerização, imunogenicidade, etc. O número destas substituições de aminoácidos na FR é tipicamente não superior a 6 na cadeia H e na cadeia L não é superior a 3. O anticorpo humanizado opcionalmente também irá compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver, *por exemplo*, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Ver, *por exemplo*, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); e Patente US 6. 982. 321 e 7. 087. 409.

**[0077]** Um “anticorpo humano” é um que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou feito usando qualquer das técnicas para produzir anticorpos humanos como aqui divulgado. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação ao antígeno não humanos. Os anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica, incluindo bibliotecas de exibição de fago. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Também estão disponíveis para a preparação de anticorpos



monoclonais humanos os métodos descritos Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Ver, também van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001). Os anticorpos humanos podem ser preparados pela administração do antígeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta ao desafio antigênico, mas cujos loci endógenos foram desativados, *por exemplo*, xenocamundongos imunizados (ver, *por exemplo*, Patente US 6.075.181 e 6.150.584 em relação à tecnologia XENOMOUSE™). Ver também, *por exemplo*, Li *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006) sobre anticorpos humanos gerados através de uma tecnologia de hibridoma de células B humanas.

**[0078]** O termo "região hipervariável", "HVR" ou "HV", quando usado aqui, refere-se às regiões de um domínio variável de anticorpos que são hipervariáveis em sequência e/ou formam alças estruturalmente definidas. Geralmente, os sdAbs compreendem três HVRs (ou CDRs):HVR1 (ou CDR1), HVR2 (ou CDR2), e HVR3 (ou CDR3). HVR3 exibe a maior diversidade das três HVRs, e acredita-se que desempenhe um papel único na conferência de especificidade fina aos anticorpos. Ver, *por exemplo*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

**[0079]** O termo "Região de Determinação de Complementaridade" ou "CDR" é usado para se referir a regiões hipervariáveis conforme definido pelo sistema Kabat. Ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)

**[0080]** Uma série de delimitações de HVR estão em uso e são abrangidas aqui. As Regiões Determinantes da Complementaridade de Kabat (CDRs) baseiam-se na variabilidade da sequência e são as mais comumente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia refere-se, em vez disso, à localização das alças estruturais (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). As HVRs AbM representam um compromisso entre as HVRs de Kabat e as alças estruturais de Chothia e são usadas pelo software de modelagem de anticorpos AbM da Oxford Molecular. As HVRs de "contato" são baseadas em uma análise das estruturas de cristal complexas disponíveis. Os resultados de cada uma destas HVRs estão anotados na Tabela 1.

Tabela 1. Delimitações de HVR

Alça	Kabat	AbM	Chothia	Contato
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeração Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeração Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

**[0081]** HVRs podem incluir "HVRs estendidas" da seguinte maneira: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 ou 89-96 (L3) no  $V_L$  e 26-35 (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102, ou 95-102 (H3) no  $V_H$ . Os resíduos do domínio variável são numerados de acordo com Kabat *et al.*, *supra*, para cada uma dessas definições.

**[0082]** Os resíduos de aminoácidos de um sdAb (como  $V_HH$ ) são numerados de acordo com a numeração geral para domínios  $V_H$  proporcionados por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., Publication No. 91), como aplicado para os domínios  $V_HH$  de Camelids in the article of Riechmann and Muyldermans, *J. Immunol. Methods* 2000 Jun. 23; 240 (1-2):185-195. De acordo com esta numeração, FR1 de um  $V_HH$  compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 1-30, CDR1 de um  $V_HH$  compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 31-35, FR2 de um  $V_HH$  compreende os aminoácidos nas posições 36-49, CDR2 de um  $V_HH$  compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 50-65, FR3 de um  $V_HH$  compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 66-94, CDR3 de um  $V_HH$  compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 95-102 e FR4 de um  $V_HH$  compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 103-113. A este respeito, deve notar-se que - como é bem conhecido na técnica para domínios  $V_H$  e para domínios  $V_HH$  —o número total de resíduos de aminoácidos em cada uma das CDRs pode variar e pode não corresponder ao número total de resíduos de aminoácidos indicados pela numeração de Kabat (ou seja, uma ou mais posições de acordo com a numeração de Kabat podem não

estar ocupadas na sequência real, ou a sequência real pode conter mais resíduos de aminoácidos do que o número permitido pela numeração de Kabat).

**[0083]** A expressão "numeração de resíduos de domínio variável como em Kabat" ou "numeração de posição de aminoácido como em Kabat", e suas variações, refere-se ao sistema de numeração usado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat *et al.*, supra. Usando este sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter mais ou menos aminoácidos correspondentes a um encurtamento ou inserção em uma FR ou HVR de domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir um único inserto de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e os resíduos inseridos (*por exemplo*, resíduos 82a, 82b e 82c, etc. de acordo com Kabat) após resíduo RF de cadeia pesada 82. A numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para um determinado anticorpo por alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat "padrão".

**[0084]** Salvo indicação em contrário, a numeração dos resíduos em uma cadeia pesada de imunoglobulina é a do índice da UE como em Kabat *et al.*, supra. O "índice da UE como em Kabat" refere-se à numeração dos resíduos do anticorpo UE IgG1 humano.

**[0085]** Os resíduos de "Estrutura" ou "FR" são os resíduos de domínio variável que não os resíduos de HVR como aqui definidos.

**[0086]** Uma "estrutura de consenso humana" ou "estrutura humana de aceitador" é uma estrutura que representa os resíduos de aminoácidos mais comuns em uma seleção de sequências de estrutura de imunoglobulina humana V<sub>L</sub> ou V<sub>H</sub>. Geralmente, a seleção de sequências de imunoglobulina humana V<sub>L</sub> ou V<sub>H</sub> é de um subgrupo de sequências de domínio variável. Geralmente, o subgrupo de sequências é um subgrupo como em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Exemplos incluem para o V<sub>L</sub>, o subgrupo pode ser o subgrupo kappa I, kappa II, kappa III ou kappa IV como em Kabat *et al.*, supra. Adicionalmente, para o V<sub>H</sub>, o subgrupo pode ser o subgrupo I, subgrupo II ou subgrupo III Kabat *et al.* Alternativamente, uma estrutura de consenso humano pode ser derivada do acima em que resíduos particulares, tais como quando um resíduo de estrutura humana é selecionado com base em sua homologia com a estrutura doadora, alinhando a sequência de estrutura doadora com uma coleção de várias sequências estruturais humanas.

Uma estrutura humana aceitadora “derivada de” uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humana pode compreender a mesma sequência de aminoácidos, ou pode conter alterações da sequência de aminoácidos pré-existentes. Em algumas modalidades, o número de alterações de aminoácidos pré-existentes é de 10 ou menos, 9 ou menos, 8 ou menos, 7 ou menos, 6 ou menos, 5 ou menos, 4 ou menos, 3 ou menos ou 2 ou menos.

**[0087]** Uma "modificação de aminoácidos" em uma posição especificada, *por exemplo*, da região Fc, refere-se à substituição ou deleção do resíduo especificado, ou à inserção de pelo menos um resíduo de aminoácido adjacente ao resíduo especificado. A inserção "adjacente" a um resíduo especificado significa inserção dentro de um a dois seus resíduos. A inserção pode ser N-terminal ou C-terminal para o resíduo especificado. A modificação de aminoácido preferida aqui é uma substituição.

**[0088]** Um anticorpo "amadurecido por afinidade" é um com uma ou mais alterações em uma ou mais HVRs que resultam em uma melhora na afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação com um anticorpo progenitor que não possui a(s) alteração(ões). Em algumas modalidades, os anticorpos amadurecidos por afinidade têm afinidades nanomolares ou mesmo picomolares para um antígeno alvo. Anticorpos maturados por afinidade são produzidos por procedimentos conhecidos na técnica. Por exemplo, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) descreve maturação de afinidade por embaralhamento de domínio V<sub>H</sub>- e V<sub>L</sub>. A mutagênese aleatória de resíduos de HVR e/ou de resíduos de estrutura é descrita por, por exemplo: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

**[0089]** Tal como aqui utilizado, o termo "se liga especificamente", "reconhece especificamente", ou é "específico para", refere-se a interações mensuráveis e reproduzíveis, tais como a ligação entre um alvo e uma proteína de ligação ao antígeno (como um CAR ou um sdAb), o que é determinante da presença do alvo na presença de uma população heterogênea de moléculas incluindo moléculas biológicas. Por exemplo, uma proteína de ligação ao antígeno (como um CAR ou um sdAb) que se liga especificamente a um alvo (que pode ser um epítipo) é uma proteína de ligação ao antígeno (como um CAR ou um sdAb) que liga esse alvo com maior afinidade, avidez,

mais prontamente e/ou com maior duração do que liga outros alvos. Em algumas modalidades, a extensão da ligação de uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) a um alvo não relacionado é inferior a cerca de 10% da ligação da proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) ao alvo como medido, *por exemplo*, por um radioimunoensaio (RIA). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) que se liga especificamente a um alvo tem uma constante de dissociação (Kd) de ! 1 µM, ! 100 nM, ! 10 nM, ! 1 nM ou ! 0,1 nM. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) se liga especificamente a um epítipo numa proteína que é conservada entre a proteína de diferentes espécies. Em algumas modalidades, a ligação específica pode incluir, mas não necessita de ligação exclusiva.

**[0090]** O termo "especificidade" refere-se ao reconhecimento seletivo de uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) para um epítipo particular de um antígeno. Os anticorpos naturais, por exemplo, são monospecíficos. O termo "multispecífico", tal como aqui utilizado, indica que uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) tem dois ou mais sítios de ligação ao antígeno, dos quais pelo menos dois ligam antígenos diferentes. "Bispecífico", tal como aqui utilizado, indica que uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) tem duas especificidades diferentes de ligação ao antígeno. O termo CAR "monospecífico", como aqui utilizado indica uma proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb) que tem um ou mais locais de ligação, cada um dos quais liga o mesmo antígeno.

**[0091]** O termo "valente", tal como aqui utilizado, indica a presença de um número especificado de sítios de ligação numa proteína de ligação ao antígeno (tal como um CAR ou um sdAb). Um anticorpo natural por exemplo ou um anticorpo de comprimento total tem dois sítios de ligação e é bivalente. Como tal, os termos "trivalente", "tetraivalente", "pentavalente" e "hexavalente" denotam a presença de dois sítios de ligação, três sítios de ligação, quatro sítios de ligação, cinco sítios de ligação e seis sítios de ligação, respectivamente, em uma proteína de ligação ao antígeno (como um CAR ou um sdAb).

**[0092]** "Funções efetoras de anticorpo" referem-se a atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região da Fc da sequência nativa ou região Fc variante da sequência de aminoácidos) de um anticorpo e variam com o isotipo do anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem: ligação de C1q e citotoxicidade dependente do

complemento; ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por célula dependente do anticorpo (ADCC); fagocitose; sobreexpressão dos receptores da superfície celular (*por exemplo*, receptor de células B); e ativação de células B. A função efetora de anticorpos "reduzida ou minimizada" significa que é reduzida em pelo menos 50% (alternativamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) do anticorpo de tipo selvagem ou não modificado. A determinação da função efetora do anticorpo é facilmente determinável e mensurável por um versada na técnica. Numa modalidade preferida, as funções efetoras do anticorpo de ligação ao complemento, citotoxicidade dependente de complemento e citotoxicidade dependente de anticorpos são afetadas. Em algumas modalidades, a função efetora é eliminada através de uma mutação na região constante que eliminou a glicosilação, *por exemplo*, "mutação sem efeito". Em um aspecto, a mutação sem efeito é uma mutação N297A ou DANA (D265A + N297A) na região C<sub>H</sub>2, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (9):6591-6604 (2001). Alternativamente, mutações adicionais resultando em função efetora reduzida ou eliminada incluem: K322A e L234A/L235A (LALA). Alternativamente, a função efetora pode ser reduzida ou eliminada por meio de técnicas de produção, como a expressão em células hospedeiras que não glicosilam (*por exemplo*, *E. coli.*) ou em que resulta num padrão de glicosilação alterado que é ineficaz ou menos eficaz na promoção da função efetora (*e. g.*, Shinkawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278(5):3466-3473 (2003).

**[0093]** "Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" ou ADCC refere-se a uma forma de citotoxicidade em que a Ig segregada ligada aos receptores Fc (FcRs) presentes em certas células citotóxicas (*por exemplo*, células assassinas naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) permitem que estas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo portadora de antígeno e subsequentemente matam a célula alvo com citotoxinas. Os anticorpos "armam" as células citotóxicas e são necessários para matar a célula alvo por este mecanismo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam FcγRIII apenas, desde que monócitos expressem FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de Fc em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para avaliar a atividade ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio de ADCC *in vitro*, tal como descrito na Patente US 5.500.362 ou 5.821.337 pode ser realizado. As células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e



células assassinas naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, *por exemplo*, em um modelo animal como o divulgado em Clynes *et al.* *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

**[0094]** O termo "região Fc" aqui é usado para definir uma região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo regiões de Fc de sequência nativa e regiões de Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é normalmente definida para se esticar a partir de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou de Pro230, para o seu terminal carboxil. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração da UE) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a produção ou a purificação do anticorpo, ou por engenharia recombinante do ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada do anticorpo. Consequentemente, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpos com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpos sem resíduos K447 removidos e populações de anticorpos possuindo uma mistura de anticorpos com e sem o resíduo K447. As regiões Fc de sequência nativa adequadas para utilização nos anticorpos aqui descritos incluem IgG1 humana, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4.

**[0095]** "Afinidade de ligação" refere-se geralmente à força da soma total de interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (*por exemplo*, um anticorpo ou um CAR) e seu parceiro de ligação (*por exemplo*, um antígeno). Salvo indicação em contrário, tal como aqui utilizado, "afinidade de ligação" refere-se a afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação 1:1 entre membros de um par de ligação (*por exemplo*, anticorpo e antígeno, ou CAR e antígeno). A afinidade de uma molécula X para seu parceiro Y pode geralmente ser representada pela constante de dissociação ( $K_d$ ). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo aqueles aqui descritos. Anticorpos de baixa afinidade geralmente ligam o antígeno lentamente e tendem a dissociar prontamente, considerando que os anticorpos de alta afinidade geralmente ligam o antígeno mais rápido e tendem a permanecer ligado por mais tempo. Uma variedade de métodos para medir a afinidade de ligação são conhecidos na técnica, que pode ser utilizada para fins do presente pedido. Modalidades ilustrativas e exemplos específicos para medir a afinidade de ligação encontram-se descritos a seguir.



[0096] Um anticorpo "de bloqueio" ou um anticorpo "antagonista" é um que inibe ou reduz a atividade biológica do antígeno que liga. Em algumas modalidades, os anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas inibem substancial ou completamente a atividade biológica do antígeno.

[0097] "Porcentagem (%) de identidade da sequência de aminoácidos" e "homologia" em relação a um peptídeo, polipeptídeo ou sequência de anticorpos são definidos como a porcentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos no peptídeo específico ou sequência de polipeptídeos, depois de alinhar as sequências e introduzir folgas, se necessário, para alcançar a porcentagem máxima de identidade de sequência e não considerar quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser obtido de várias maneiras que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, usando software de computador disponível publicamente, como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou MEGALIGN™ (DNASTAR). Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para atingir o alinhamento máximo sobre o comprimento total das sequências sendo comparados.

[0098] O "receptor de antígeno quimérico" ou "CAR", tal como aqui utilizado, refere-se a receptores geneticamente modificados, que podem ser utilizados para enxertar uma ou mais especificidades de antígeno em células efectoras imunes, tais como células T. Alguns CARs também são conhecidos como "receptores de células T artificiais", "receptores de células T quiméricas" ou "receptores imunes quiméricos". Em algumas modalidades, o CAR compreende um domínio de ligação ao antígeno extracelular específico para um ou mais antígenos (como antígenos de tumor), um domínio transmembranar e um domínio de sinalização intracelular de uma célula T e/ou de outros receptores. "CAR-T" refere-se a uma célula T que expressa um CAR. "BCMA CAR" refere-se a um CAR com um domínio de ligação extracelular específico para BCMA. "Bi-epítopo CAR" refere-se a uma CAR com um domínio de ligação extracelular específico para dois epítopos diferentes em BCMA.

[0099] Uma molécula de ácido nucleico "isolada" que codifica um CAR ou um sdAb aqui descrito é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo

menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está normalmente associada no ambiente em que foi produzida. De preferência, o ácido nucleico isolado é livre de associação com todos os componentes associados ao ambiente de produção. As moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam os polipeptídeos e os anticorpos aqui presentes estão numa forma diferente da forma ou configuração em que se encontra na natureza. As moléculas de ácido nucleico isoladas são, portanto, distinguidas do ácido nucleico que codifica os polipeptídeos e anticorpos aqui existentes naturalmente nas células.

**[0100]** O termo “sequências de controle” se refere a sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operacionalmente ligada num organismo hospedeiro particular. As sequências de controle que são adequadas para procariontes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um sítio de ligação de ribossoma. Células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de poliadenilação e acentuadores.

**[0101]** O ácido nucleico é “operacionalmente ligado” que é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, DNA para uma pré- sequência ou sequência principal secretora é operacionalmente ligado a DNA para um polipeptídeo se é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou acentuador é operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossoma é operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se é posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, “operacionalmente ligado” significa que as sequências de DNA sendo ligadas são contíguas e, no caso de um líder secretor contíguo e em fase de leitura. Entretanto, os potencializadores não precisam ser contíguos. A ligação é realizada pela ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, os adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeos sintéticos são usados de acordo com a prática convencional.

**[0102]** O termo “vetor”, como aqui utilizado, se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de propagar um outro ácido nucleico ao qual está ligado. O termo inclui o vetor como uma estrutura de ácido nucleico de autorreplicação, bem como o vetor incorporado no genoma de uma célula hospedeira na qual foi introduzido. Certos vetores são capazes de

dirigir a expressão de ácidos nucleicos aos quais estão operacionalmente ligados. Tais vetores são aqui referidos como “vetores de expressão”.

**[0103]** Tal como aqui utilizado, o termo "autólogo" pretende referir-se a qualquer material derivado do mesmo indivíduo a quem mais tarde será reintroduzido no indivíduo.

**[0104]** "Alogênico" refere-se a um enxerto derivado de um indivíduo diferente da mesma espécie.

**[0105]** O termo "transfectado" ou "transformado" ou "transduzido" tal como aqui utilizado refere-se a um processo pelo qual o ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula "transfectada" ou "transformada" ou "transduzida" é uma que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui a célula primária e sua progênie.

**[0106]** Tal como aqui utilizado, as expressões "célula", "linhagem celular" e "cultura celular" são usadas de forma intercambiável e todas essas designações incluem progênies. Assim, as palavras "transfectantes" e "células transfectadas" incluem a célula primária e as culturas derivadas lá, sem considerar o número de transferências. Também se entende que toda progênie pode não ser precisamente idêntica no conteúdo de DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. A progênie variante que possui a mesma função ou atividade biológica testada na célula originalmente transformada está incluída.

**[0107]** Os termos “célula hospedeira”, “linhagem celular hospedeira”, e “cultura de células hospedeiras” são usados indiferentemente e se referem às células hospedeiras nas quais foi introduzido o ácido nucleico exógeno, incluindo a progênie de tais células. As células hospedeiras incluem “transformantes” e “células transformadas”, que incluem a célula primária transformada e a descendência resultante desta, independentemente do número de passagens. A descendência pode não ser completamente idêntica em teor de ácido nucleico a uma célula parental, mas pode conter mutações. A progênie mutante que tem a mesma função ou atividade biológica que a triada ou selecionada para na célula originalmente transformada está incluída aqui.

**[0108]** Tal como aqui utilizado, "tratamento" ou "tratar é uma abordagem para a obtenção de resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para os fins desta invenção, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: aliviar um ou mais sintomas resultantes da doença, diminuir a extensão da doença, estabilizar a doença (*por exemplo*, prevenindo ou retardando o

agravamento da doença), prevenir ou retardar a propagação (*por exemplo*, metástase) da doença, prevenir ou retardar a recorrência da doença, retardar ou reduzir a progressão da doença, melhorar o estado da doença, proporcionar uma remissão (parcial ou total) da doença, diminuir a dose de um ou mais outros medicamentos necessário para tratar a doença, retardar a progressão da doença, aumentar a qualidade de vida e/ou prolongar a sobrevida. Também abrangido por "tratamento" é uma redução da consequência patológica do câncer. Os métodos do presente pedido contemplam qualquer um ou mais desses aspectos do tratamento.

**[0109]** Tal como aqui utilizado, um "indivíduo" ou um "sujeito" refere-se a um mamífero, incluindo, mas não limitado a, humano, bovino, cavalo, felino, canino, roedor ou primata. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

**[0110]** O termo "quantidade eficaz" aqui utilizado refere-se a uma quantidade de um agente, tal como um sdAb, uma célula efetor imune engenheirada ou uma composição farmacêutica do mesmo, suficiente para tratar um distúrbio, condição ou doença especificada, tais como melhorar, paliar, diminuir e/ou retardar um ou mais dos seus sintomas. Em referência ao câncer, uma quantidade eficaz compreende uma quantidade suficiente para fazer com que um tumor encolha e/ou diminua a taxa de crescimento do tumor (como para suprimir o crescimento do tumor) ou impedir ou retardar outra proliferação celular indesejada. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para retardar o desenvolvimento. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para prevenir ou retardar a recorrência. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. A quantidade eficaz da droga ou composição pode: (i) reduzir o número de células de câncer; (ii) reduzir o tamanho do tumor; (iii) inibir, retardar, reduzir até certo ponto, e, preferencialmente, impedir a infiltração de células de câncer em órgãos periféricos; (iv) inibir (isto é, reduzir até certo ponto e preferencialmente parar) metástases de tumor; (v) inibir o crescimento do tumor; (vi) prevenir ou retardar a ocorrência e/ou reincidência do tumor; e/ou (vii) aliviar, até certo ponto, um ou mais dos sintomas associados com o câncer.

**[0111]** "Configuração de adjuvante" refere-se a uma configuração clínica em que um indivíduo teve um histórico de câncer, e geralmente (mas não necessariamente) foram sensíveis à terapia, que inclui, mas não está limitado a, cirurgia (*por exemplo*, ressecção cirúrgica), radioterapia e quimioterapia. No entanto, devido ao seu histórico de câncer,

esses indivíduos são considerados em risco de desenvolvimento da doença. O tratamento ou a administração na "configuração de adjuvante" refere-se a um modo subsequente de tratamento. O grau de risco (*por exemplo*, quando um indivíduo na configuração de adjuvante é considerado como de "alto risco" ou de "baixo risco") depende de vários fatores, mais geralmente do grau da doença quando primeiramente tratada.

**[0112]** "Configuração de Neoadjuvante" refere-se a uma configuração clínica em que o método é realizado antes da terapia primária/definitiva.

**[0113]** Tal como aqui utilizado, "retardar" o desenvolvimento de câncer significa protelar, dificultar, reduzir, atrasar, estabilizar e/ou adiar o desenvolvimento da doença. Esse atraso pode variar em diferentes períodos de tempo, dependendo do histórico da doença e/ou do indivíduo a ser tratado. Como é evidente para um versado na técnica, um retardo suficiente ou significativo pode, de fato, abranger a prevenção, na medida em que o indivíduo não desenvolve a doença. Um método que "retarda" o desenvolvimento de câncer é um método que reduz a probabilidade de desenvolvimento da doença em um determinado período de tempo e/ou reduz a extensão da doença em um determinado período de tempo, quando comparado ao não usar o método. Tais comparações geralmente são baseadas em estudos clínicos, usando um número estatisticamente significativo de indivíduos. O desenvolvimento de câncer pode ser detectável usando métodos padrão, incluindo, mas não limitado a, tomografia axial computadorizada (CAT Scan), Ressonância Magnética de Imagem (MRI), ultrassom abdominal, testes de coagulação, arteriografia ou biópsia. O desenvolvimento também pode se referir à progressão de cancer isso pode ser inicialmente indetectável e inclui ocorrência, recorrência e início.

**[0114]** O termo "formulação farmacêutica" refere-se a uma preparação que está sob a forma de permitir que a atividade biológica do ingrediente ativo seja eficaz e que não contenha componentes adicionais que sejam inaceitavelmente tóxicos para um indivíduo ao qual a formulação seria administrada. Tais formulações são estéreis. Uma formulação "estéril" é asséptica ou isenta de todos os micro-organismos vivos e seus esporos.

**[0115]** Os "transportadores", tal como aqui utilizados, incluem veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis que não são tóxicos para a célula ou o mamífero que estão expostos a eles nas dosagens e concentrações utilizadas. Frequentemente, o transportador fisiologicamente aceitável é uma solução tamponada de pH aquoso. Exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais

como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, fenol, álcool butílico ou benzílico, alquil parabenos, tais como metil ou propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol); polipeptídeo de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrina; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contrações de formação de sal, tais como sódio; complexos metálicos (*por exemplo*, complexos de proteína-Zn); e/ou tensoativos não iônicos, tais como TWEEN™, polietilenoglicol (PEG) e PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

**[0116]** O "diluyente" de interesse aqui é um que é farmacologicamente aceitável (seguro e não tóxico para administração a um humano) e é útil para a preparação de uma formulação líquida, tal como uma formulação reconstituída após a liofilização. Diluentes exemplificativos incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (BWFI), uma solução de pH tamponado (*por exemplo*, solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose. Em uma modalidade alternativa, os diluentes podem incluir soluções aquosas de sais e/ou tampões.

**[0117]** Um "conservante" é um composto que pode ser adicionado às formulações aqui para reduzir a atividade bacteriana. A adição de um conservante pode, por exemplo, facilitar a produção de uma formulação de múltiplas doses (múltiplas doses). Exemplos de conservantes potenciais incluem cloreto de octadecildimetilbenzilamônio, cloreto de hexametileno, cloreto de benzalcônio (uma mistura de cloretos de alquilbenzildimetilamônio em que os grupos alquil são compostos de cadeia longa) e cloreto de benzetônio. Outros tipos de conservantes incluem álcoois aromáticos tais como fenol, butil e álcool benzílico, alquil parabenos tais como metilo ou propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol. O conservante mais preferido aqui é o álcool benzílico.

**[0118]** Uma formulação "estável" é aquela em que a proteína nela mantém essencialmente sua estabilidade e integridade física e química após o armazenamento.



Várias técnicas analíticas para medir a estabilidade da proteína estão disponíveis na técnica e são revisadas em *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) e Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). A estabilidade pode ser medida em uma temperatura selecionada durante um período de tempo selecionado. Para uma triagem rápida, a formulação pode ser mantida a 40°C durante 2 semanas a 1 mês, momento no qual a estabilidade é medida. Quando a formulação deve ser armazenada a 2-8°C, geralmente a formulação deve ser estável a 30°C ou 40°C durante pelo menos 1 mês e/ou estável a 2-8°C durante pelo menos 2 anos. Quando a formulação deve ser armazenada a 30°C, geralmente a formulação deve ser estável durante pelo menos 2 anos a 30°C e/ou estável a 40°C durante pelo menos 6 meses. Por exemplo, a extensão da agregação durante o armazenamento pode ser usada como um indicador de estabilidade da proteína. Assim, uma formulação "estável" pode ser uma em que menos que cerca de 10% e de preferência menos que cerca de 5% da proteína está presente como um agregado na formulação. Em outras modalidades, pode ser determinado qualquer aumento na formação de agregados durante o armazenamento da formulação.

**[0119]** Uma formulação "reconstituída" é uma que foi preparada por dissolução de uma proteína liofilizada ou formulação de anticorpo num diluente de tal modo que a proteína está dispersa por todo o lado. A formulação reconstituída é adequada para administração (*por exemplo*, administração subcutânea) a um paciente a ser tratado com a proteína de interesse e, em algumas modalidades do presente pedido, pode ser um que seja adequado para administração parenteral ou intravenosa.

**[0120]** Uma formulação "isotônica" é aquela que tem essencialmente a mesma pressão osmótica que o sangue humano. As formulações isotônicas terão geralmente uma pressão osmótica de cerca de 250 a 350 mOsm. O termo "hipotônico" descreve uma formulação com pressão osmótica abaixo da do sangue humano. Correspondentemente, o termo "hipertônico" é usado para descrever uma formulação com uma pressão osmótica acima da do sangue humano. A isotonicidade pode ser medida usando um osmômetro de pressão de vapor ou de congelamento de gelo, por exemplo. As formulações da presente invenção são hipertônicas como resultado da adição de sal e/ou tampão.

**[0121]** Entende-se que as modalidades do presente pedido descritas neste documento incluem "consistindo" e/ou "consistindo essencialmente em" modalidades.

[0122] A referência a "cerca de" um valor ou parâmetro inclui aqui (e descreve) variações de que são dirigidas a esse valor ou parâmetro *per se*. Por exemplo, a descrição que se refere a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

[0123] Tal como aqui utilizado, a referência a "não" um valor ou parâmetro geralmente significa e descreve "diferente de" um valor ou parâmetro. Por exemplo, o método não é usado para tratar câncer de tipo X significa que o método é usado para tratar câncer de outros tipos que não X.

[0124] O termo "cerca de X-Y" aqui utilizado tem o mesmo significado que "cerca de X a cerca de Y. "

[0125] Tal como aqui utilizado e nas reivindicações anexadas, as formas singulares "um/uma", "ou" e "o/a" incluem os plurais referentes, a menos que o contexto especifique claramente o contrário.

## II. Anticorpos de Domínio Único Anti-BCMA

[0126] Um aspecto do presente pedido proporciona anticorpos isolados de domínio único (aqui referidos como "sdAbs anti-BCMA") que se ligam especificamente a BCMA, tal como BCMA humano. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA modula a atividade BCMA. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é um anticorpo antagonista. Além disso, são proporcionados fragmentos de ligação ao antígeno derivados de qualquer um dos sdAbs anti-BCMA aqui descritos, e proteínas de ligação ao antígeno compreendendo qualquer um dos sdAbs anti-BCMA aqui descritos. Exemplos de sdAbs anti-BCMA estão listados na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2. SdAbs anti-BCMA exemplificativos.**

SdA	Ex.	Ex.	CDR1	CDR2	CDR3
b	AA SEQ ID	NA SEQ ID			
269A 3734 6	115	153	DYYAIG (SEQ ID NO:1)	CISRSDGSTYYADSVK G (SEQ ID NO:39)	AGADCSGY LRDYEF (SEQ ID NO:77)
269A	116	154	TYGMA	SKASMNYSGRYYAD	AGTGCSTYG

3734 8			(SEQ ID NO:2)	SVKG (SEQ ID NO:40)	CFDAQIIDY (SEQ ID NO:78)
269A 3791 7	117	155	TFTMG (SEQ ID NO:3)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO:41)	ADRKSVMSI RPDY (SEQ ID NO:79)
269A 3735 5	118	156	INAMG (SEQ ID NO:4)	SIRGLGRTNYDDSVK G (SEQ ID NO:42)	VYVTLGG VNRDY (SEQ ID NO:80)
269A 3791 5	119	157	SIVMG (SEQ ID NO:5)	AIMWNDGITYLQDSV KG (SEQ ID NO:43)	ASKGRYSEY EY (SEQ ID NO:81)
269A 3793 6	120	158	RAVIV (SEQ ID NO:6)	FIKPSDGTIYYIDSLKG (SEQ ID NO:44)	ASPEDWYT DWIDWSIYR (SEQ ID NO:82)
269A 3795 3	121	159	SDVMG (SEQ ID NO:7)	AIMWNDGITYLQDSV KG (SEQ ID NO:45)	ASKGRYSEY EY (SEQ ID NO:83)
269A 3796 5	122	160	NDHMA (SEQ ID NO:8)	AIDWSGRTTNYADPV EG (SEQ ID NO:46)	VLRAWISYD NDY (SEQ ID NO:84)
269A 3797 2	123	161	KNTVA (SEQ ID NO:9)	SITWDGRTTYADSV KG (SEQ ID NO:47)	DLGKWPAG PADY (SEQ ID NO:85)
269A	124	162	SHVMG	VIGWRDISTSYADSVK	ARRIDAADF

3735 3			(SEQ ID NO:10)	G (SEQ ID NO:48)	DS (SEQ ID NO:86)
269A 3794 8	125	163	TYFMA (SEQ ID NO:11)	GIAWSGGSTAYADSV KG (SEQ ID NO:49)	SRGIEVEEFG A (SEQ ID NO:87)
269B 005	126	164	INVMA (SEQ ID NO:12)	AVTRDGRKSCGDSVK G (SEQ ID NO:50)	DGWGATTL DYTYGMDY (SEQ ID NO:88)
269B 023	127	165	TFTMG (SEQ ID NO:13)	SITWDGRSAYYAESV KG (SEQ ID NO:51)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:89)
269B 024	128	166	INAMG (SEQ ID NO:14)	TITRGGSTNYGPSVKG (SEQ ID NO:52)	ERLDGSGYG YEYDY (SEQ ID NO:90)
269B 028	129	167	KNTVA (SEQ ID NO:15)	SITCDGRTTYANSV NG (SEQ ID NO:53)	YRKSIMSIQP DY (SEQ ID NO:91)
269B 030	130	168	SIVMG (SEQ ID NO:16)	AIMWNDGLTYLQGSV KG (SEQ ID NO:54)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:92)
269B 038	131	169	TFTMG (SEQ ID NO:17)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO:55)	RRIDAADFD S (SEQ ID NO:93)
269B	132	170	KNTVA	SITWDGRTTYADSV	LGKWPAGP

054			(SEQ ID NO:18)	KG (SEQ ID NO:56)	ADY (SEQ ID NO:94)
269B 059	133	171	INTMD (SEQ ID NO:19)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO:57)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:95)
269B 060	134	172	KNTVA (SEQ ID NO:20)	SITCDGRTTTYANSV KG (SEQ ID NO:58)	LGKWPAGS ADY (SEQ ID NO:96)
269B 069	135	173	DYWMH (SEQ ID NO:21)	SIDTSGQTTYADSLK G (SEQ ID NO:59)	RYRGGTWY GMAN (SEQ ID NO:97)
269B 074	136	174	SNTMA (SEQ ID NO:22)	STTWNGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO:60)	LGKWPAGP ADY (SEQ ID NO:98)
269B 076	137	175	TFTMG (SEQ ID NO:23)	DISGGRTNYADSVKG (SEQ ID NO:61)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:99)
269B 079	138	176	VAAISL (SEQ ID NO:24)	FTISRDNKNTVVLQ MNSLKP (SEQ ID NO:62)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:100)
269B 083	139	177	KNTVA (SEQ ID NO:25)	SITWDGRTTTYADSV KG (SEQ ID NO:63)	TASCHLFLG GSGAFVS (SEQ ID NO:101)
269B	140	178	TFTMG	AISLSPTLAYYAESVK	SKDRYSEYE

085			(SEQ ID NO:26)	G (SEQ ID NO:64)	Y (SEQ ID NO:102)
269B 093	141	179	TFTMG (SEQ ID NO:27)	AISLSPTLAYYAESVK GKG (SEQ ID NO:65)	KNGGPVDY (SEQ ID NO:103)
269B 094	142	180	SIVMG (SEQ ID NO:28)	AIMWNDGITYLQDSV KG (SEQ ID NO:66)	SKGRYSEYE Y (SEQ ID NO:104)
269B 104	143	181	TFTMG (SEQ ID NO:29)	AINLSPTLTYYAESVK G (SEQ ID NO:67)	ERKSVMAIP PDY (SEQ ID NO:105)
269B 109	144	182	TFTMG (SEQ ID NO:30)	SITLIPTFPYYAYSVKG (SEQ ID NO:68)	YRKYLMSIL PDY (SEQ ID NO:106)
269B 110	145	183	TFTMG (SEQ ID NO:31)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO:69)	NRNSQRVIA ALSWIGMN Y (SEQ ID NO:107)
269B 113	146	184	TFTMG (SEQ ID NO:32)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO:70)	RRIDAADFD S (SEQ ID NO:108)
269B 126	147	185	TFTMG (SEQ ID NO:33)	VIGWRDINASYADSV KG (SEQ ID NO:71)	RRIDATDFD S (SEQ ID NO:109)
269B 129	148	186	NHVMG (SEQ ID NO:34)	VIGWRDISTSYADSVK G	RRIDAADFD S



				(SEQ ID NO:72)	(SEQ ID NO:110)
269B 131	149	187	NYILA (SEQ ID NO:35)	HISRSGGKSGYGDSV KG (SEQ ID NO:73)	PLWYGSPTL IDY (SEQ ID NO:111)
269B 135	150	188	TFTMG (SEQ ID NO:36)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO:74)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:112)
269B 136	151	189	TFTMG (SEQ ID NO:37)	AISLSPTLAYYAEPVK G (SEQ ID NO:75)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:113)
269B 139	152	190	NNFVMG (SEQ ID NO:38)	AISLSPTLAYYVESVK G (SEQ ID NO:76)	DRKSVMSIR PDY (SEQ ID NO:114)

**[0127]** O antígeno maduro de células B (BCMA), também conhecido como CD269, é um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral, a saber, TNFRSF17 (Thompson et al., *J. Exp. Medicine*, 192 (1):129-135, 2000). O BCMA humano é expresso quase exclusivamente em plasmócitos e células de mieloma múltiplo *por exemplo* Novak et al., *Blood*, 103(2):689-694, 2004; Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 73(19):5903-5909; Felix et al., *Mol. Oncology*, 9(7):1348-58, 2015). BCMA pode ligar o fator de ativação das células B (BAFF) e uma proliferação que inclui o ligante (APRIL) (*por exemplo*, Mackay et al., 2003 e Kalled et al., *Immunological Review*, 204:43-54, 2005). O BCMA pode ser um alvo de antígeno tumoral adequado para agentes imunoterapêuticos contra mieloma múltiplo. Anticorpos de alta afinidade podem bloquear a ligação entre BCMA e seus ligandos nativos BAFF e APRIL. Os sdAbs anti-BCMA podem ser usados em combinação com imunoterapia celular usando células T-CAR, por exemplo, para aumentar os efeitos citotóxicos contra células tumorais.

[0128] Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:115. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:116. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:117. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:118. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:119. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:120. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:121. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:122. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:123. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:124. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:125. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:126. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:127. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:128. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:129. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:130. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb

anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:131. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:132. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:133. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:134. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:135. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:136. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:137. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:138. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:139. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:140. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:141. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:142. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:143. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:144. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:145. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:146. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb

anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:147. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:148. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:149. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:150. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:151. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo uma, duas ou todas as três CDRs da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:152. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é camelídeo. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende uma estrutura humana aceitadora, *por exemplo*, uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humano.

**[0129]** Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo pelo menos uma, pelo menos duas ou todas as três CDRs selecionadas de (a) uma CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:1-38; (b) uma CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:39-76; e (c) uma CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:77-114. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é camelídeo. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende uma estrutura humana aceitadora, *por exemplo*, uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humano.

**[0130]** Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 com pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 1-38; (b) uma CDR2 com pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 39-76; e (c) uma CDR3 com pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99 %, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:77-114. Em algumas modalidades, uma CDR tendo pelo menos cerca de qualquer um de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade contém substituições (*por exemplo*, substituições conservativas), inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas o sdAb anti-BCMA compreendendo essa sequência mantém a capacidade de se ligar ao BCMA. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 com cerca de qualquer uma das substituições de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos (*por exemplo*, substituições conservadoras), inserções ou deleções a uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 1-38; (b) uma CDR2 com cerca de qualquer uma das substituições de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos (*por exemplo*, substituições conservadoras), inserções ou deleções a uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 39-76; e (c) uma CDR3 com cerca de qualquer uma das substituições de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos (*por exemplo*, substituições conservadoras), inserções ou deleções a uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:77-

114. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é amadurecido por afinidade. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é camelídeo. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende uma estrutura humana aceitadora, *por exemplo*, uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humano.

**[0131]** Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:39; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:40; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:78. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:41; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79. Em

algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:80. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:5; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:43; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:81. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:44; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:7; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:83. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:84. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:85. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:48; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:86. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:49; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:87. Em



algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:50; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:88. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:51; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:89. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:52; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:90. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:53; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:91. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:54; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:92. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:17; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:94. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57; and (c) a CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:95. Em algumas

modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:96. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:21; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:97. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:22; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:98. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:23; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:99. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:24; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:101. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:26; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:102. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:27; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:65; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:103. Em

algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:66; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:104. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:29; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:105. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:30; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:68; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:106. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:107. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:32; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:70; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:108. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:33; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:34; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:72; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:110. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:35; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:111. Em

algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:36; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:74; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:112. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:75; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:113. Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA compreendendo três CDRs compreendendo:(a) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:38; (b) uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:76; e (c) uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:114. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é camelídeo. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende uma estrutura humana aceitadora, *por exemplo*, uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humano.

**[0132]** Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA, incluindo qualquer uma das modalidades descritas acima (*isto é*, sdAb anti-BCMA compreendendo CDR1, CDR2 e/ou CDR3 específicas compreende um domínio V<sub>H</sub>H com pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:115-152. Em algumas modalidades, uma sequência V<sub>H</sub>H com pelo menos cerca de qualquer um de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade contém substituições (*por exemplo*, substituições conservativas), inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas o sdAb anti-BCMA compreendendo essa sequência mantém a capacidade de se ligar ao BCMA. Em algumas modalidades, um total de 1 a 10 aminoácidos foram substituídos, inseridos e/ou deletados em uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:115-152. Em algumas modalidades, substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das CDRs (*isto é*, nas FRs). Opcionalmente, o sdAb anti-BCMA compreende uma sequência de aminoácidos selecionado de SEQ ID NO:115-152, incluindo modificações pós- traducionais daquela sequência.

**[0133]** Em algumas modalidades, é proporcionado um sdAb anti-BCMA isolado compreendendo um domínio V<sub>H</sub>H com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:115-152. Em algumas modalidades, é proporcionado um polipeptídeo multivalente compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:115-152.

**[0134]** Em algumas modalidades, os epítomos funcionais podem ser mapeados pela varredura combinada de alanina. Neste processo, uma estratégia combinatória de varredura de alanina pode ser usada para identificar aminoácidos na proteína BCMA que são necessários para a interação com sdAbs anti-BCMA. Em algumas modalidades, o epítomo é conformacional e a estrutura cristalina de sdAbs anti-BCMA ligado ao BCMA pode ser empregada para identificar os epítomos. Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um epítomo de BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:388-394. Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um epítomo de BCMA compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:388-394.

**[0135]** Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona anticorpos que competem com qualquer um dos sdAbs anti-BCMA aqui descritos por ligação ao BCMA. Em algumas modalidades, a invenção proporciona anticorpos que competem com os sdAbs anti-BCMA aqui proporcionados para ligação a um epítomo no BCMA. Em algumas modalidades, é proporcionado um anticorpo que se liga ao mesmo epítomo que um sdAb anti-BCMA compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:115-152. Em algumas modalidades, é proporcionado um anticorpo que se liga especificamente ao BCMA competitivamente com um sdAb anti-BCMA compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:115-152.

**[0136]** Em algumas modalidades, ensaios de competição podem ser usados para identificar um anticorpo monoclonal que compete com um sdAb anti-BCMA descrito aqui para ligação ao BCMA. Os ensaios de competição podem ser utilizados para determinar se dois anticorpos se ligam ao mesmo epítomo, reconhecendo epítomos idênticos ou sobreponíveis estereoquimicamente ou um anticorpo inibe competitivamente a ligação de outro anticorpo ao antígeno. Em certas modalidades, tal anticorpo competidor liga-se ao mesmo epítomo (*por exemplo*, um epítomo de BCMA derivado de uma sequência de

aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:388-394) que está ligado a um anticorpo aqui descrito. Ensaio de competição exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, ensaios de rotina, tais como os proporcionados em Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.). Métodos exemplificativos detalhados para mapear um epítipo ao qual um anticorpo se liga são proporcionados em Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, N. J.). Em algumas modalidades, dizem-se que dois anticorpos se ligam ao mesmo epítipo se cada um deles bloquear a ligação do outro em 50% ou mais. Em algumas modalidades, o anticorpo que compete com um sdAb anti-BCMA aqui descrito é um anticorpo caméledeo, quimérico, humanizado ou humano. Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um anticorpo que compete com um sdAb anti-BCMA de caméledeo, quimérico, humanizado ou humano, como aqui descrito.

**[0137]** Em algumas modalidades, é proporcionado um anticorpo anti-BCMA ou proteína de ligação ao antígeno compreendendo qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos acima. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-BCMA é um anticorpo monoclonal, incluindo um anticorpo de caméledeo, quimérico, humanizado ou humano. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-BCMA é um fragmento de anticorpo, *por exemplo*, um fragmento V<sub>H</sub>H. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-BCMA é um anticorpo de cadeia pesada de comprimento total que compreende uma região Fc de qualquer classe de anticorpos ou isotipo, tal como IgG1 ou IgG4. Em algumas modalidades, a região Fc reduziu ou minimizou a função efetora.

**[0138]** Em algumas modalidades, o anticorpo anti-BCMA (tal como o sdAb anti-BCMA) ou proteína de ligação ao antígeno de acordo com qualquer das modalidades anteriores pode incorporar qualquer uma das características, isoladamente ou em combinação, como descrito nas Seções 1-7 de "Características dos anticorpos" abaixo.

**[0139]** Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado que codifica qualquer um dos anticorpos anti-BCMA (tais como sdAb anti-BCMA) descritos acima. Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado que codifica um sdAb anti-BCMA em que o ácido nucleico compreende uma sequência tendo pelo menos cerca de qualquer um de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência para uma sequência de



ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:153-190. Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:153-190. Em algumas modalidades, um vetor (*por exemplo*, vetor de expressão) compreendendo esse ácido nucleico. Em algumas modalidades, é proporcionada uma célula hospedeira compreendendo esse ácido nucleico. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de produção de um anticorpo anti-BCMA, em que o método compreende cultivar uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico que codifica o anticorpo anti-BCMA, conforme proporcionado acima, em condições adequadas para a expressão do anticorpo anti-BCMA, e opcionalmente recuperar o anticorpo anti-BCMA da célula hospedeira (ou meio de cultura de célula hospedeira).

## **Características de anticorpos**

### **1. Afinidade de anticorpo**

[0140] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-BCMA proporcionado aqui tem uma constante de dissociação (Kd) de  $\leq 1\mu\text{M}$ ,  $\leq 100\text{ nM}$ ,  $\leq 10\text{ nM}$ ,  $\leq 1\text{ nM}$ ,  $\leq 0,1\text{ nM}$ ,  $\leq 0,01\text{ nM}$ , ou  $\leq 0,001\text{ nM}$  (*por exemplo*,  $10^{-8}\text{ M}$  ou menos *por exemplo* de  $10^{-8}\text{ M}$  a  $10^{-13}\text{ M}$ , *por exemplo*, de  $10^{-9}\text{ M}$  a  $10^{-13}\text{ M}$ ).

[0141] Em algumas modalidades, a Kd é medida por um ensaio de ligação ao antígeno radiomarcado (RIA) realizado com a versão Fab ou fragmento V<sub>H</sub>H de um anticorpo de interesse e do seu antígeno como descrito pelo seguinte ensaio. Por exemplo, a afinidade de ligação de solução de Fab para o antígeno é medida pelo Fab de equilíbrio com uma concentração mínima de antígeno marcado com (<sup>125</sup>I) na presença de uma série de titulação de antígeno não marcado, depois capturando antígeno ligado com uma placa revestida com anticorpo anti-Fab (ver, *por exemplo*, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)).

[0142] Em algumas modalidades, a Kd é medida utilizando ensaios de ressonância de plásmom de superfície utilizando um BIACORE<sup>®</sup>-2000 ou um BIACORE<sup>®</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com chips de antígeno CM5 imobilizados a ~ 10 unidades de resposta (RU). Resumidamente, chips biossensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE Inc.) são ativados com cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodi-imida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antígeno é diluído com acetato de sódio 10 mM, pH 4,8, para 5 µg/ml (~0,2 µM) antes da injeção a uma taxa de fluxo de 5 µl/minuto para atingir

aproximadamente 10 unidades de resposta (UR) de proteína acoplada. Após a injeção de antígeno, etanolamina 1 M é injetada para bloquear os grupos que não reagiram. Para medições cinéticas, duas diluições em série de Fab ou V<sub>H</sub>H do anticorpo de interesse (0,78 nM a 500 nM) são injetados em PBS com tensoativo de polissorbato 20 a 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) a 25°C a uma taxa de fluxo de aproximadamente 25 µl/min. Taxas de associação ( $k_{ON}$ ) e taxas de dissociação ( $k_{OFF}$ ) são calculadas usando um modelo simples de ligação de Langmuir um-para-um (Software de avaliação BIACORE® versão 3. 2) ajustando simultaneamente os modelos de associação e dissociação. A constante de dissociação de equilíbrio ( $K_d$ ) é calculada como a razão  $k_{OFF}/k_{ON}$ . Ver, *por exemplo*, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Se a taxa de associação passa de  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  pelo ensaio de ressonância de plásmom de superfície acima, então a taxa de associação pode ser determinada usando uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou diminuição da intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, 16 nm passa-banda) a 25°C de um anticorpo 20 nM anti-antígeno (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antígeno, tal como medido num espectrômetro, tal como um espectrofotômetro equipado com fluxo de paragem (Aviv Instruments) ou um espectrofotômetro SLM-AMINCO™ 8000-series (ThermoSpectronic) com uma cuveta agitada.

## 2. Fragmentos de Anticorpo

[0143] Em algumas modalidades, um anticorpo aqui proporcionado é um fragmento de anticorpo. Fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>V</sub>, e scF<sub>V</sub>, V<sub>H</sub>H, e outros fragmentos descritos abaixo. Para uma revisão de certos fragmentos de anticorpos, ver Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para uma revisão de fragmentos scF<sub>V</sub>, ver *por exemplo*, Pluckthün, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer- Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); ver, também WO 93/16185; e Patente U.S. 5.571.894 e 5.587.458). Para a discussão de fragmentos Fab e F(ab')<sub>2</sub> compreendendo resíduos de epítipo de ligação ao receptor de salvamento e tendo um aumento na meia vida in vivo, ver Patente US 5.869.046.

[0144] Os diacorpos são fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação ao antígeno que podem ser bivalentes ou biespecíficos. Ver, *por exemplo*, EP 404,097; WO

1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Triacoros e tetracoros também são descritos em Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0145] Os fragmentos de anticorpo podem ser produzidos por várias técnicas, incluindo, mas não se limitando à digestão proteolítica de um anticorpo intacto, bem como a produção por células hospedeiras recombinantes (*por exemplo E. coli* ou fago), conforme descrito neste documento.

### **3. Anticorpos quiméricos e humanizados**

[0146] Em algumas modalidades, o anticorpo proporcionado aqui é um anticorpo quimérico. Certos anticorpos quiméricos são descritos, *por exemplo*, na Patente US 4.816.567; e Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Em um exemplo, um anticorpo quimérico compreende uma região variável não humana (*por exemplo*, uma região variável derivada de uma espécie de camelídeo, como lhama) e uma região constante humana. Num outro exemplo, um anticorpo quimérico é um anticorpo de “classe trocada” em que a classe ou a subclasse foi alterada a partir do anticorpo parental. Os anticorpos quiméricos incluem fragmentos de ligação ao antígeno.

[0147] Em algumas modalidades, um anticorpo quimérico é um anticorpo humanizado. Tipicamente, um anticorpo não humano é humanizado para reduzir a imunogenicidade para os seres humanos, embora mantendo a especificidade e afinidade do anticorpo não humano parental. Geralmente, um anticorpo humanizado compreende um ou mais domínios variáveis nos quais HVRs, *por exemplo*, CDRs, (ou porções das mesmas) são derivadas de um anticorpo não humano, e FRs (ou porções das mesmas) são derivadas das sequências de anticorpo humano. Um anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante humana. Em algumas modalidades, alguns resíduos de FR em um anticorpo humanizado são substituídos por resíduos correspondentes de um anticorpo não humano (*por exemplo*, o anticorpo a partir do qual os resíduos de HVR são derivados), *por exemplo*, para restaurar ou melhorar a especificidade ou a afinidade do anticorpo.

[0148] Os anticorpos humanizados e métodos de preparar os mesmos são revistos, *por exemplo*, em Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), e são descritos adicionalmente, *por exemplo*, em Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); Patente U. S 5. 821. 337, 7. 527.

791, 6. 982. 321, e 7. 087. 409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (descrevendo enxerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (descrevendo “ressuperfície”); Dall’Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (descrevendo “embaralhamento de FR”); e Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) e Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (descrevendo a abordagem de “seleção guiada” para embaralhamento de FR).

**[0149]** As regiões estruturais humanas que podem ser utilizadas para a humanização incluem, mas não estão limitadas às: regiões de estrutura selecionadas usando o método “melhor ajuste” (*ver, por exemplo*, Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiões estruturais derivadas da sequência de consenso de anticorpos humanos de um subgrupo particular de regiões variáveis de cadeia leve ou pesada (*ver, por exemplo*, Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); e Presta *et al. J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiões estruturais humanas maduras (somaticamente mutadas) ou regiões estruturais da linhagem germinativa humana (*ver, por exemplo*, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); e regiões estruturais derivadas da triagem de bibliotecas de FR (*ver, por exemplo*, Baca *et al., J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) e Rosok *et al., J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

**[0150]** Em algumas modalidades, os SdAbs são modificados, tais como humanizados, sem diminuir a afinidade nativa do domínio para o antígeno e ao mesmo tempo que reduzem a sua imunogenicidade em relação a uma espécie heteróloga. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos do domínio variável de anticorpos (V<sub>H</sub>H) de um anticorpo de lhama pode ser determinado, e um ou mais dos aminoácidos de camelídeos, por exemplo, nas regiões da estrutura, são substituídos por sua contraparte humana, conforme encontrado na sequência de consenso humana, sem que esse polipeptídeo tenha perdido seu caráter típico, *i. e.* a humanização não afeta significativamente a capacidade de ligação ao antígeno do polipeptídeo resultante. A humanização de sdAbs de camelídeo requer a introdução e mutagênese de uma quantidade limitada de aminoácidos numa única cadeia polipeptídica. Isso contrasta com a humanização de scFv, Fab', (Fab')<sub>2</sub> e IgG, que requer a introdução de mudanças de aminoácidos em duas cadeias, a cadeia leve e pesada e a preservação da montagem de ambas as cadeias.

**[0151]** Anticorpos de domínio único compreendendo um domínio V<sub>H</sub>H podem ser humanizados para ter sequências semelhantes a humanos. Em algumas modalidades, as

regiões FR do domínio V<sub>H</sub>H usadas aqui compreendem, pelo menos, cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais de homologia de sequência de aminoácidos para regiões V<sub>H</sub> de estrutura humanas. Uma classe exemplificativa de domínios V<sub>H</sub>H humanizados é caracterizado pelo fato de V<sub>H</sub>Hs transporta um aminoácido do grupo que consiste em glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina, serina, treonina, asparagina ou glutamina na posição 45, como, por exemplo, L45 e um triptofano na posição 103, de acordo com a numeração de Kabat. Como tal, os polipeptídeos pertencentes a esta classe mostram uma alta homologia de sequência de aminoácidos para regiões V<sub>H</sub> de estrutura humanas e referidos polipeptídeos podem ser administrados a um humano diretamente sem a expectativa de uma resposta imune indesejada e sem a carga de humanização adicional.

**[0152]** Outra classe exemplificativa de sdAbs de camélídeo humanizados foi descrita em WO 03/035694 e contém resíduos de FR2 hidrofóbicos tipicamente encontrados em anticorpos convencionais de origem humana ou de outras espécies, mas compensando essa perda em hidrofobicidade pelo resíduo de arginina carregado na posição 103 que substitui o resíduo de triptofano conservado presente em V<sub>H</sub> de anticorpos de cadeia única. Como tal, os peptídeos pertencentes a estas duas classes mostram uma alta homologia de sequência de aminoácidos para regiões V<sub>H</sub> de estrutura humanas e referidos peptídeos podem ser administrados a um humano diretamente sem a expectativa de uma resposta imune indesejada e sem a carga de humanização adicional.

#### **4. Anticorpos Humanos**

**[0153]** Em algumas modalidades, um anticorpo aqui proporcionado é um anticorpo humano. Os anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica. Os anticorpos humanos são descritos geralmente em van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) e Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008). Camundongos transgênicos ou ratos capazes de produzir sdAbs totalmente humanos são conhecidos na técnica. Ver, *por exemplo*, US20090307787A1, Patente US 8.754.287, US20150289489A1, US20100122358A1, e WO2004049794.

**[0154]** Os anticorpos humanos podem ser preparados pela administração de um imunógeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir anticorpos humanos intactos ou anticorpos intactos com regiões variáveis humanas em resposta ao desafio antigênico. Tais animais tipicamente contêm toda ou uma porção dos loci de

imunoglobulina humana, que substituem os loci endógenos de imunoglobulina, ou que estão presentes extracromossomicamente ou integrados aleatoriamente nos cromossomas do animal. Em tais camundongos transgênicos, os loci da imunoglobulina endógena geralmente foram inativados. Para uma revisão de métodos para obter anticorpos humanos a partir de animais transgênicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Ver também, por exemplo, Patente. US 6.075.181 e 6.150.584 descrevendo a tecnologia XENOMOUSE™ ; Patente. U. S. 5. 770. 429 descrevendo a tecnologia HUMAB®; Patente US 7.041.870 descrevendo a tecnologia K-M MOUSE®, e Publicação do Pedido de Patente US 2007/0061900, descrevendo a tecnologia VELOCIMOUSE®). As regiões variáveis humanas de anticorpos intactos geradas por tais animais podem ser adicionalmente modificadas, *por exemplo*, através da combinação com uma região constante humana diferente.

**[0155]** Os anticorpos humanos também podem ser produzidos por métodos à base de hibridoma. Linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma de camundongo-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas. (*Ver, por exemplo*, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); e Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991).) Anticorpos humanos gerados via tecnologia de hibridoma de células B humanas são também descritos em Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Métodos adicionais incluem aqueles descritos, por exemplo, na Patente US 7. 189. 826 (descrevendo a produção de anticorpos IgM humanos monoclonais a partir de linhagens celulares de hibridoma) e Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (descrevendo hibridomas humano-humano). A tecnologia de hibridoma humano (tecnologia Trioma) é também descrita em Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) e Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

**[0156]** Os anticorpos humanos podem também ser gerados por isolamento de sequências de domínio variável de clones de Fv selecionados a partir de bibliotecas de exibição em fagos de origem humana. Tais sequências de domínio variáveis podem em seguida ser combinadas com um domínio constante humano desejado. As técnicas para a seleção de anticorpos humanos a partir de bibliotecas de anticorpos são descritas abaixo.



[0157] Uma técnica para obter sequências V<sub>H</sub>H dirigidas contra um antígeno ou alvo particular envolve imunizar adequadamente um mamífero transgênico que é capaz de expressar anticorpos de cadeia pesada (isto é, de modo a elevar uma resposta imune e/ou anticorpos de cadeia pesada dirigida contra o referido antígeno ou alvo), obtendo uma amostra biológica adequada do referido mamífero transgênico que contém (codificação de sequências de ácido nucleico) as referidas sequências V<sub>H</sub>H (como uma amostra de sangue, amostra de soro ou amostra de células B) e, em seguida, gerando sequências V<sub>H</sub>H dirigidas contra o referido antígeno ou alvo, a partir da referida amostra, utilizando qualquer técnica adequada conhecida per se (tal como qualquer dos métodos aqui descritos ou uma técnica de hibridoma). Por exemplo, para este fim, os camundongos que expressam anticorpo de cadeia pesada e os métodos e técnicas adicionais descritos em WO 02/085945, WO 04/049794 e WO 06/008548 e Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Oct. 10; 103(41):15130-5 podem ser usados. Por exemplo, tais camundongos que expressam anticorpo de cadeia pesada podem expressar anticorpos de cadeia pesada com qualquer domínio variável (único) adequado, como domínios variáveis (únicos) de fontes naturais (*por exemplo*, domínios variáveis humanos (únicos), domínios variáveis de camélídeo (únicos) ou domínios variáveis de tubarão (único), bem como, *por exemplo*, domínios variáveis sintéticos ou semissintéticos (únicos).

##### **5. Anticorpos derivados de Biblioteca**

[0158] Os anticorpos do presente pedido podem ser isolados por triagem de bibliotecas combinatórias de anticorpos com a atividade ou atividades desejadas. Por exemplo, uma variedade de métodos é conhecida na técnica para a geração de bibliotecas de apresentação em fagos e triagem de tais bibliotecas quanto a anticorpos que possuem as características de ligação desejadas. Esses métodos são revistos, *por exemplo*, em Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) e descritos adicionalmente, *por exemplo*, em the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, em *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); e Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004).



Métodos para construir bibliotecas sdAb foram descritos, por exemplo, ver Patente US 7.371.849.

[0159] Em certos métodos de exibição de fagos, repertórios de genes  $V_H$  e  $V_L$  são clonados separadamente por reação em cadeia da polimerase (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas de fagos, que podem então ser rastreados para o fago de ligação ao antígeno como descrito em Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). O fago exhibe normalmente fragmentos de anticorpo, tanto como fragmentos Fv de cadeia única (scFv) como fragmentos Fab. As bibliotecas de fontes imunizadas proveem anticorpos de alta afinidade ao imunógeno sem a necessidade de construir hibridomas. Alternativamente, o repertório naive pode ser clonado (*por exemplo*, a partir de humano), para proporcionar uma única fonte de anticorpos para uma ampla faixa de não auto e também autoantígenos sem qualquer imunização como descrito por Griffiths et al., *EMBO J*, 12:725-734 (1993). Finalmente, bibliotecas naive podem também ser produzidas sinteticamente através de clonagem de segmentos de genes V não rearranjados a partir de células-tronco, e utilizando iniciadores de PCR contendo uma sequência aleatória para codificar as regiões CDR3 altamente variáveis e para alcançar o rearranjo *in vitro*, tal como descrito por Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). As publicações de patentes que descrevem bibliotecas de fagos de anticorpo humano incluem, por exemplo: Patente US 5.750.373, e Publicação de Patente US 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, e 2009/0002360.

[0160] Os anticorpos ou fragmentos de anticorpo isolados a partir de bibliotecas de anticorpos humanos são considerados anticorpos humanos ou fragmentos de anticorpos humanos aqui.

## **6. Anticorpos multiespecíficos**

[0161] Em algumas modalidades, um anticorpo aqui proporcionado é um anticorpo multiespecífico, *por exemplo*, um anticorpo biespecífico. Anticorpos multiespecíficos são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois sítios diferentes. Em algumas modalidades, uma das especificidades de ligação é para um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, BCMA e CD38, e o outro é para qualquer outro antígeno. Em algumas modalidades, os anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítomos diferentes de um antígeno selecionado do grupo que consiste em

CD19, CD20, BCMA e CD38. Os anticorpos biespecíficos também podem ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para células que expressam um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, BCMA e CD38.

**[0162]** Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos completos ou fragmentos de anticorpos. As técnicas para produzir anticorpos multiespecíficos incluem, mas não estão limitadas a coexpressão recombinante de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina possuindo especificidades diferentes (ver Milstein and Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), WO 93/08829, e Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655 (1991)), engenharia “knob-in-hole” (ver, por exemplo, Patente US 5.731.168). Anticorpos multiespecíficos também podem ser produzidos através da engenharia de efeitos da direção eletroestática para produzir molulas heterodiméricas de Fc de anticorpo (WO 2009/089004A1); reticulação de dois ou mais anticorpos ou fragmentos (ver, por exemplo, Patente US 4. 676. 980, e Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)); usando zíperes de leucina para produzir anticorpos biespecíficos (ver, por exemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando a tecnologia “diacorpo” para fazer fragmentos de anticorpos biespecíficos (ver, por exemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); e usando dímeros de Fv de cadeia simples (sFv) (ver, por exemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); e preparando anticorpos trispecíficos como descrito, por exemplo, em Tutt et al. *J. Immunol.* 147:60 (1991); e criando polipeptídeos que compreendem anticorpos de domínio único em tandem (ver, por exemplo, Pedido de Patente 20110028695; e Conrath et al. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276 (10):7346-50). Os anticorpos engenheirados com três ou mais sítios de ligação ao antígeno funcionais, incluindo “Anticorpos octopus”, são também incluídos neste documento (ver, por exemplo, US 2006/0025576A1).

## **7. Variantes de Anticorpo**

**[0163]** Em algumas modalidades, variantes de sequências de aminoácidos dos anticorpos aqui proporcionados são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes de sequência de aminoácidos de um anticorpo podem ser preparadas através da introdução de modificações apropriadas na sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo, ou por síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções e/ou substituições de resíduos no interior das sequências de aminoácidos do anticorpo.

Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição pode ser feita para chegar ao construto final, contanto que o construto final possua as características desejadas, *por exemplo*, ligação ao antígeno.

**a) variantes de substituição, inserção e deleção**

[0164] Em algumas modalidades, variantes de anticorpo possuindo uma ou mais substituições de aminoácidos são proporcionadas. Sítios de interesse para a mutagênese de substituição incluem as HVRs e FRs. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 3, sob o título de “Substituições preferidas”. Alterações mais substanciais são proporcionadas na Tabela 3, sob o título de “substituições exemplificativas”, e tal como mais bem descrito abaixo em referência às classes da cadeia lateral de aminoácidos ácidos. As substituições de aminoácidos podem ser introduzidas num anticorpo de interesse e os produtos triados para uma atividade desejada, *por exemplo*, ligação ao antígeno retida/melhorada, imunogenicidade reduzida, ou ADCC ou CDC melhorada.

TABELA 3. Substituições de Aminoácidos

Original Resíduo	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
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; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

Original Resíduo	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

**[0165]** Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as propriedades da cadeia lateral comuns:

- (1) hidrofóbico:Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros:Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos:Asp, Glu;
- (4) básicos:His, Lys, Arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia:Gly, Pro;
- (6) aromáticos:Trp, Tyr, Phe.

**[0166]** Substituições não conservadoras irão implicar na troca de um membro de uma destas classes por outra classe.

**[0167]** Um tipo de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental (*por exemplo*, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, as variantes resultantes selecionadas para um estudo mais aprofundado terão modificações (*por exemplo*, melhorias) em certas propriedades biológicas (*por exemplo*, o aumento da afinidade, imunogenicidade reduzida) relativamente ao anticorpo parental e/ou terá substancialmente certas propriedades biológicas retidas do anticorpo parental. Uma variante de substituição exemplificativa é um anticorpo maturado por afinidade, que pode ser gerado convenientemente, *por exemplo*, usando técnicas de maturação de afinidade à base de exibição em fagos, tais como aquelas aqui descritas. Resumidamente, um ou mais resíduos de HVR são mutados e os anticorpos variantes exibidos em fago e triados para uma atividade biológica específica (*por exemplo*, afinidade de ligação).

**[0168]** As alterações (*por exemplo*, substituições) podem ser feitas em HVRs, *por exemplo*, para melhorar a afinidade do anticorpo. Tais alterações podem ser feitas em

"pontos principais" de HVR," isto é, resíduos codificados por códons que sofrem mutação em alta frequência durante o processo de maturação somática (*ver, por exemplo, Chowdhury, Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), e/ou SDRs (a-CDRs), com o V<sub>H</sub> ou V<sub>L</sub> variante resultante sendo testado para afinidade de ligação. A maturação por afinidade através da construção e resseleção de bibliotecas secundárias foi descrita, *por exemplo, em Hoogenboom et al. em Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) Em algumas modalidades de maturação por afinidade, a diversidade é introduzida nos genes variáveis escolhidos para a maturação por qualquer um de uma variedade de métodos (*por exemplo, por PCR propenso a erros, embaralhamento de cadeias, ou mutagênese dirigida por oligonucleotídeos*). É então criada uma biblioteca secundária. A biblioteca é então triada para identificar as variantes de anticorpo com a afinidade desejada. Outro método para introduzir diversidade envolve abordagens direcionadas a HVR, em que vários resíduos de HVR (*por exemplo, 4-6 resíduos por vez*) são randomizados. Resíduos HVR envolvidos na ligação ao antígeno podem ser especificamente identificados, *por exemplo, utilizando mutagênese de varredura de alanina ou de modelagem*. CDR-H3 e CDR-L3, em particular, são muitas vezes direcionados.

**[0169]** Em algumas modalidades, as substituições, inserções ou deleções podem ocorrer dentro de uma ou mais HVRs, contanto que tais alterações não reduzam substancialmente a capacidade do anticorpo de se ligar ao antígeno. Por exemplo, as alterações conservadoras (*por exemplo, substituições conservadoras como aqui proporcionadas*) que não reduzem substancialmente a afinidade de ligação podem ser feitas em HVRs. Essas alterações podem estar fora dos "pontos principais" da HVR ou CDRs. Em algumas modalidades das sequências V<sub>H</sub>H variantes proporcionadas acima, cada HVR está inalterada, ou contém não mais de uma, duas ou três substituições de aminoácidos.

**[0170]** Um método útil para a identificação de resíduos ou regiões de um anticorpo que podem ser alvo para mutagênese é denominado "mutagênese de varredura de alanina" como descrito por Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Neste método, um resíduo ou grupo de resíduos alvo (*por exemplo, resíduos carregados, tais como Arg, Asp, His, Lys, e Glu*) é identificado e substituído por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (*por exemplo, alanina ou polialanina*) para determinar se a interação do anticorpo com o antígeno é afetada. Outras substituições podem ser introduzidas nas

localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional para as substituições iniciais. Alternativamente, ou adicionalmente, uma estrutura cristalina de um complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Estes resíduos de contato e resíduos vizinhos podem ser direcionados ou eliminados como candidatos para substituição. As variantes podem ser triadas para determinar se contêm as propriedades desejadas.

[0171] As inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões amino e/ou carboxil terminais variando em comprimento variando de um resíduo aos polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequência de resíduos de aminoácido únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionil N-terminal. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N ou C-terminal do anticorpo a uma enzima (*por exemplo*, para ADEPT) ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida sérica do anticorpo.

#### **b) Variantes de glicosilação**

[0172] Em algumas modalidades, um anticorpo aqui proporcionado é alterado para aumentar ou diminuir o grau em que o anticorpo é glicosilado. A adição ou deleção de sítios de glicosilação a um anticorpo pode ser convenientemente realizada alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que um ou mais sítios de glicosilação sejam criados ou removidos.

[0173] Quando o anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato ligado aos mesmos pode ser alterado. Os anticorpos nativos produzidos por células de mamíferos compreendem, tipicamente, um oligossacarídeo ramificado, biantenário que é geralmente ligado por uma N-ligação a Asn297 do domínio CH2 da região Fc. *Ver, por exemplo*, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). O oligossacarídeo pode incluir vários carboidratos, *por exemplo*, manose, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactose e ácido siálico, bem como uma fucose ligada a um GlcNAc no “tronco” da estrutura oligossacarídeo biantenária. Em algumas modalidades, as modificações do oligossacarídeo num anticorpo do presente pedido podem ser feitas a fim de criar variantes de anticorpos com determinadas propriedades melhoradas.

[0174] Em algumas modalidades, as variantes de anticorpo são proporcionadas com uma estrutura de carboidratos que é desprovida de fucose ligada (direta ou indiretamente) a uma região Fc. Por exemplo, a quantidade de fucose de tal anticorpo pode ser de 1% a 80%, de

1% a 65%, de 5% a 65% ou de 20% a 40%. A quantidade de fucose é determinada pelo cálculo do valor médio de fucose no interior da cadeia de açúcar em Asn297, em relação à soma de todas as glicoestruturas ligadas a Asn 297 (*por exemplo*, estruturas de manose complexas, híbridas e altas) como medido por espectrometria de massa MALDI-TOF, como descrito no documento WO 2008/077546, *por exemplo*. Asn297 se refere ao resíduo de asparagina localizado em cerca da posição 297 na região Fc (numeração EU dos resíduos da região Fc); no entanto, Asn297 também pode estar localizado em cerca de  $\pm 3$  aminoácidos a montante ou a jusante da posição 297, *i. e.*, entre as posições 294 e 300, devido a menores variações de sequência nos anticorpos. Tais variantes de fucosilação podem ter função de ADCC melhorada. *Ver, por exemplo*, Publicação de Patente US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Exemplos de publicações relacionadas com variantes de anticorpos “desfucosiladas” ou “deficientes em fucose” incluem: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Exemplos de linhagens celulares capazes de produzir anticorpos desfucosilados incluem células CHO Lec13 deficientes em fucosilação de proteína (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Pedido de Patente US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente no Exemplo 11), e linhagens de células nocaute, tais como o gene da alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, células CHO nocaute (*ver, por exemplo*, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); and WO2003/085107).

**[0175]** As variantes de anticorpo são ainda proporcionadas com oligossacarídeos bissectados, *por exemplo*, em que um oligossacarídeo biantenário ligado à região Fc do anticorpo é bissectado por GlcNAc. Tais variantes de anticorpo podem ter fucosilação reduzida e/ou melhoria da função de ADCC. Exemplos de tais variantes de anticorpos estão descritos, *por exemplo*, em WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patente US 6. 602. 684 (Umana et al.); e US 2005/0123546 (Umana *et al.*). As variantes de anticorpos com, pelo menos, um resíduo de galactose no oligossacarídeo ligado à região Fc são também



proporcionados. Tais variantes de anticorpo podem ter função CDC melhorada. Tais variantes de anticorpos estão descritas, *por exemplo*, em WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); e WO 1999/22764 (Raju, S.).

### **c) Variantes de região Fc**

[0176] Em algumas modalidades, podem ser introduzidas uma ou mais modificações de aminoácidos na região Fc de um anticorpo aqui proporcionado, gerando assim uma variante da região Fc. A variante da região Fc pode compreender uma sequência de região Fc humana (*por exemplo*, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) compreendendo uma modificação de aminoácido (*por exemplo* uma substituição) em uma ou mais posições de aminoácidos.

[0177] Em algumas modalidades, o presente pedido contempla uma variante de anticorpo que possui algumas, mas não todas as funções efectoras, o que torna um candidato desejável para aplicações em que a meia-vida do anticorpo *in vivo* é importante ainda certas funções efectoras (tais como de complemento e ADCC) são desnecessárias ou prejudiciais. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* podem ser realizados para confirmar a redução/depleção das atividades de CDC e/ou ADCC. Por exemplo, ensaios de ligação ao receptor Fc (FcR) podem ser realizados para assegurar que o anticorpo seja desprovido de ligação a Fc $\gamma$ R (por isso provavelmente sem atividade ADCC), mas retém a capacidade de ligação a FcRn. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam Fc(RIII somente enquanto os monócitos expressam Fc(RI, Fc(RII e Fc(RIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Os exemplos não limitativos de ensaios *in vitro* para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse são descritos na Patente US 5.500.362 (*ver, por exemplo* Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) and Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (*ver* Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Em alternativa, os ensaios de métodos não radioativos podem ser utilizados (*ver, por exemplo*, ensaio de citotoxicidade não radioativo ACTI™ para citometria de fluxo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; e ensaio de citotoxicidade não radioativo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). As células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC da molécula de

interesse pode ser avaliada *in vivo*, *por exemplo*, num modelo animal, tal como o divulgado em Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Ensaio de ligação de C1q podem também ser realizados para confirmar que o anticorpo é incapaz de se ligar a C1q e, portanto, é desprovido de atividade CDC. *Ver, por exemplo*, ELISA de ligação a C1q e C3c em WO 2006/029879 e WO 2005/100402. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC pode ser realizado (*ver, por exemplo*, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); e Cragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). As determinações de ligação de FcRn e da depuração/meia-vida *in vivo* também podem ser realizadas usando métodos conhecidos na técnica (*ver, por exemplo*, Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18 (12):1759-1769 (2006)).

**[0178]** Anticorpos com função efetora reduzida incluem aqueles com substituição de um ou mais dos resíduos da região Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 e 329 (Patente US 6.737.056). Tais mutantes de Fc incluem mutantes de Fc com substituições em duas ou mais das posições de aminoácidos 265, 269, 270, 297 e 327, incluindo o assim denominado mutante de Fc "DANA" com substituição de resíduos 265 e 297 para alanina (Patente US 7.332.581).

**[0179]** Certas variantes de anticorpos com ligação melhorada ou diminuída para FcRs são descritas. (*Ver, por exemplo*, Patente US 6.737.056; WO 2004/056312, e Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).)

**[0180]** Em algumas modalidades, uma variante de anticorpo compreende uma região Fc com uma ou mais substituições de aminoácidos que melhoram a ADCC, *por exemplo*, as substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração UE de resíduos).

**[0181]** Em algumas modalidades, alterações são feitas na região de Fc que resultam em alterada (*isto é*, melhorada ou diminuída) ligação de C1q e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), *por exemplo*, como descrito na Patente US 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

**[0182]** Anticorpos com meia-vidas aumentadas e melhor ligação ao receptor Fc neonatal (FcRn), que é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al. *J. Immunol.* 24:249 (1994)), são descritos em US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esses anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições no seu interior que melhoram a ligação da região Fc para FcRn.

Tais variantes de Fc incluem aquelas com substituições em um ou mais dos resíduos da região Fc:238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ou 434, *por exemplo*, substituição do resíduo da região Fc434 (Patente US 7.371.826).

[0183] Ver, também Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente US 5.648.260; Patente US 5.624.821; e WO 94/29351 relativo a outros exemplos de variantes de região Fc.

**d) Variantes de anticorpo engenheiradas com cisteína**

[0184] Em algumas modalidades, pode ser desejável criar anticorpos engenheirados com cisteína, *por exemplo*, “thioMAbs,” em que um ou mais resíduos de um anticorpo são substituídos por resíduos de cisteína. Em modalidades particulares, os resíduos substituídos ocorrem em sítios acessíveis do anticorpo. Ao substituir os resíduos com cisteína, grupos tiol reativos são desse modo posicionados em sítios acessíveis do anticorpo e podem ser utilizados para conjugar o anticorpo a outras frações moleculares, tais como frações de drogas ou frações ligante-droga, para criar um imunocombinado, tal como descrito aqui adicionalmente. Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos seguintes resíduos pode ser substituído por cisteína: A118 (numeração EU) da cadeia pesada; e S400 (numeração EU) da região Fc da cadeia pesada. Anticorpos modificados com cisteína podem ser gerados como descrito, *por exemplo*, na Patente US 7.521.541.

**e) Derivados de Anticorpo**

[0185] Em algumas modalidades, um anticorpo aqui proporcionado pode ser ainda modificado para conter frações não proteínicas adicionais que são conhecidas na especialidade e prontamente disponíveis. As frações adequadas para derivatização do anticorpo incluem, mas não estão limitadas aos polímeros solúveis em água. Exemplos não limitativos de polímeros solúveis em água incluem, mas não estão limitados a polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etileno glicol/propileno glicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3- dioxolano, poli-1, 3, 6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros ou copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli (n-vinil pirrolidona) polietileno glicol, homopolímeros de propilenoglicol, copolímeros de óxido de óxido de propileno/etileno, polióis polioxiethylados (*por exemplo*, glicerol), álcool polivinílico, e misturas dos mesmos. O polietileno glicol propionaldeído pode ter vantagens na fabricação

devido à sua estabilidade em água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligados ao anticorpo pode variar, e se mais do que um polímero está ligado, estes podem ser as mesmas ou diferentes moléculas. Em geral, o número e/ou tipo de polímeros utilizados para derivatização podem ser determinados com base em considerações, incluindo, mas não limitado a, as propriedades ou funções particulares do anticorpo a serem melhoradas, se o derivado de anticorpo será utilizado numa terapia sob condições definidas, *etc.*

[0186] Em algumas modalidades, os conjugados de um anticorpo e fração não proteínica que pode ser seletivamente aquecida por exposição à radiação são proporcionados. Em algumas modalidades, a fração não proteínica é um nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11600-11605 (2005)). A radiação pode ser de qualquer comprimento de onda, e inclui, mas não está limitada aos comprimentos de onda que não prejudicam as células normais, mas que aquecem a fração não proteínica a uma temperatura na qual as células proximais à fração de anticorpo não proteínica são mortas.

### **Métodos de preparação**

[0187] Os anticorpos (tais como sdAbs) aqui descritos podem ser preparados usando qualquer método conhecido na técnica ou como aqui descrito.

[0188] Métodos de preparação de sdAbs foram descritos. Ver, por exemplo, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 2014; 9(3):599. Anticorpos de domínio único (tais como V<sub>H</sub>Hs) podem ser obtidos utilizando métodos conhecidos na técnica tais como imunizando uma espécie de *Camelídeo* (como camelo ou lhama) e a obtendo hibridomas a partir da mesma, ou por clonagem de uma biblioteca de sdAbs utilizando técnicas de biologia molecular conhecidas na técnica e subsequente seleção por ELISA com clones individuais de bibliotecas não selecionadas ou utilizando a exibição de fagos.

[0189] Para a produção recombinante dos sdAbs, o ácido nucleico que codifica os sdAbs pode ser isolado e inserido em um vetor replicável para clonagem adicional (ampliação do DNA) ou para expressão. O DNA que codifica o sdAb é facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (*por exemplo*, usando sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. A escolha do vetor depende em parte

da célula hospedeira a ser utilizada. Geralmente, as células hospedeiras preferidas são de origem procariótica ou eucariótica (geralmente mamífero).

### **1. Anticorpos Policlonais**

[0190] Anticorpos policlonais são geralmente criados em animais por múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína imunogênica na espécie a ser imunizada, *por exemplo*, hemocianina de lapa (KLH), albumina sérica, tireoglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, usando um agente bifuncional ou derivatizante, *por exemplo*, éster de maleimidobenzoil sulfossuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , ou  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , onde R e  $\text{R}^1$  são independentemente grupos alquil inferior. Exemplos de adjuvantes que podem ser utilizados incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil Lipídeo A, trealose dicorinomicolato sintética). O protocolo de imunização pode ser selecionado por um versado na técnica sem experimentação indevida.

[0191] Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos ou derivados combinando, *por exemplo*, 100  $\mu\text{g}$  ou 5  $\mu\text{g}$  ou a proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução por via intradérmica em múltiplos sítios. Um mês depois, os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado no adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos sítios. De sete a catorze dias depois, os animais são sangrados e o soro é ensaiado quanto ao título de anticorpos. Os animais são reforçados até o título se igualar. Os conjugados também podem ser preparados em cultura de células recombinantes como fusões de proteínas. Além disso, agentes de agregação, tais como alúmen são adequados para aumentar a resposta imune.

### **2. Anticorpos Monoclonais**

[0192] Anticorpos monoclonais são obtidos de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto por mutações de ocorrência possivelmente natural e/ou modificações pós-traducionais (*por exemplo*, isomerizações, amidações) que podem estar

presentes em menores quantidades. Assim, o modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos.

[0193] Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler *et al.* *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de DNA recombinante Patente US 4.816.567).

[0194] No método de hibridoma, é imunizado um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, como aqui descrito acima para desencadear linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

[0195] O agente imunizante irá tipicamente incluir a proteína antigênica ou uma variante de fusão da mesma. Geralmente, são utilizados linfócitos de sangue periférico ("PBLs") se forem desejadas células de origem humana, ou células de baço ou células de linfonodos são usadas se forem desejadas fontes de mamíferos não humanos. Os linfócitos são então fundidos com uma linhagem celular imortalizada utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

[0196] As linhagens celulares imortalizadas são geralmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origem de roedores, bovinos e humanos. Normalmente, empregam-se linhagens celulares de mieloma de rato ou camundongo. As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas em um meio de cultura adequado que preferencialmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células parentais do mieloma não possuírem a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), que são substâncias que impedem o crescimento de HGPRT células deficientes.

[0197] As células de mieloma imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem de forma eficiente, sustentam uma produção estável de alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio como o meio HAT. Entre



estas, são preferidas as linhagens de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis no Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia. USA, e células SP-2 (e derivados das mesmas, *por exemplo*, X63-Ag8-653) disponível na American Type Culture Collection, Manassas, Va. USA. Foram também descritas linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma de camundongo-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

**[0198]** O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas passa por ensaios para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

**[0199]** O meio de cultura em que as células de hibridoma são cultivadas pode ser ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno desejado. De preferência, a afinidade de ligação e a especificidade do anticorpo monoclonal podem ser determinadas por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio ligado a enzima (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidos na técnica. Por exemplo, a afinidade de ligação pode ser determinada pela análise Scatchard de Munson *et al.* *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

**[0200]** Após as células do hibridoma que produzem anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejada serem identificadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitantes e cultivados por métodos padrão (Goding, *supra*). Meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, o meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores num mamífero.

**[0201]** Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido ascítico ou soro por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

[0202] Os anticorpos monoclonais também podem ser preparados por métodos de DNA recombinante, tais como os descritos na Patente US 4.816.567, e como descrito acima. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (*por exemplo*, usando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras, tais como células *E. coli*, células COS simianas, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem outra proteína de imunoglobulina, de modo a sintetizar anticorpos monoclonais em tais células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA que codificam o anticorpo incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) e Pliickthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

[0203] Numa modalidade adicional, os anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos gerados utilizando as técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (gama nM) por "embaralhamento" de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Assim, essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais de hibridoma de anticorpos monoclonais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

[0204] O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação por domínios constantes de cadeia pesada e leve humana no lugar das sequências murinas homólogas (Patente US 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), ou por ligação covalente à sequência de codificação da imunoglobulina da totalidade ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo de não imunoglobulina. Tipicamente, tais polipeptídeos de não imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo ou são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo

bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno com especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno com especificidade para um antígeno diferente.

[0205] Os anticorpos monoclonais aqui descritos podem ser monovalentes, cuja preparação é bem conhecida na técnica. Por exemplo, um método envolve a expressão recombinante da cadeia leve da imunoglobulina e uma cadeia pesada modificada. A cadeia pesada é truncada geralmente em qualquer ponto na região Fc de modo a evitar a reticulação em cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes podem ser substituídos por outro resíduo de aminoácido ou são eliminados de modo a evitar a reticulação. Os métodos *in vitro* também são adequados para a preparação de anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir fragmentos dos mesmos, particularmente fragmentos Fab, pode ser realizada utilizando técnicas de rotina conhecidas na técnica.

[0206] Os anticorpos quiméricos ou híbridos também podem ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos em química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando uma reação de troca de bissulfeto ou pela formação de uma ligação de tioéter. Iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato são exemplos de reagentes apropriados para esta finalidade.

### **3. Produção recombinante em células procarióticas**

#### **a) Construção de Vetor**

[0207] As sequências polinucleotídicas que codificam os anticorpos do presente pedido podem ser obtidas utilizando técnicas recombinantes padrão. As sequências polinucleotídicas desejadas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de células produtoras de anticorpos, como células de hibridoma. Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser sintetizados utilizando técnicas de PCR ou um sintetizador de nucleotídeo. Uma vez obtidas, as sequências que codificam os polipeptídeos são inseridas num vetor recombinante capaz de replicar e expressar polinucleotídeos heterólogos em hospedeiros procarióticos. Muitos vetores que estão disponíveis e conhecidos na técnica podem ser utilizados para o propósito da presente invenção. A seleção de um vetor apropriado dependerá principalmente do tamanho dos ácidos nucleicos a serem inseridos no vetor e a célula hospedeira particular a ser transformada com o vetor. Cada vetor

contém vários componentes, dependendo da sua função (amplificação ou expressão de polinucleotídeo heterólogo, ou ambos) e sua compatibilidade com a célula hospedeira particular em que reside. Os componentes do vetor incluem geralmente, mas não estão limitados a: uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um sítio de ligação ao ribossoma (RBS), uma sequência de sinal, um inserto heterólogo de ácido nucleico e uma sequência de terminação da transcrição.

**[0208]** Em geral, os vetores plasmídicos contendo sequências de replicon e controle que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são usados em conexão com esses hospedeiros. O vetor normalmente transporta um sítio de replicação, bem como sequências de marcação que são capazes de proporcionar seleção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada usando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. O pBR322 contém genes que codificam a resistência à ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e, portanto, proporciona meios fáceis para identificar células transformadas. pBR322, seus derivados ou outros plasmídeos ou bacteriófagos microbianos também podem conter, ou ser modificados para conter, promotores que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para a expressão de proteínas endógenas. Exemplos de derivados de pBR322 utilizados para a expressão de anticorpos particulares são descritos em detalhes em Carter *et al.*, Patente US 5.648.237.

**[0209]** Além disso, os vetores de fago que contêm replicons e sequências de controle que são compatíveis com o micro-organismo hospedeiro podem ser usados como vetores transformadores em conexão com esses hospedeiros. Por exemplo, o bacteriófago tal como GEM™ -11 pode ser utilizado na preparação de um vetor recombinante que pode ser utilizado para transformar células hospedeiras suscetíveis tais como *E. coli* LE392.

**[0210]** O vetor de expressão do presente pedido pode compreender dois ou mais pares promotor-cístron, codificando cada um dos componentes polipeptídicos. Um promotor é uma sequência reguladora não traduzida localizada a montante (5') para um cístron que modula sua expressão. Os promotores procarióticos geralmente se dividem em duas classes, indutíveis e constitutivas. O promotor induzível é um promotor que inicia níveis aumentados de transcrição do cístron sob seu controle em resposta a mudanças na condição de cultura, *por exemplo*, presença ou ausência de um nutriente ou mudança de temperatura. **[0211]** Um grande número de promotores, reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras em potencial, é bem conhecido. O promotor selecionado pode ser

operacionalmente ligado ao DNA cístron que codifica a cadeia leve ou pesada, removendo o promotor da fonte de DNA através de digestão com enzimas de restrição e inserindo a sequência promotora isolada no vetor do presente pedido. Tanto a sequência promotora nativa como muitos promotores heterólogos podem ser utilizados para dirigir a amplificação e/ou a expressão dos genes alvo. Em algumas modalidades, utilizam-se promotores heterólogos, uma vez que geralmente permitem maior transcrição e maiores rendimentos do gene alvo expresso em comparação com o promotor do polipeptídeo alvo nativo.

**[0212]** Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor PhoA, os sistemas promotores de galactamase e lactose, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac* ou *trc*. No entanto, outros promotores que são funcionais em bactérias (tais como outros promotores conhecidos de bactérias ou fagos) também são adequados. As suas sequências de ácido nucleico foram publicadas, permitindo desse modo que um trabalhador versado operavelmente ligue-os a cístrons que codificam as cadeias alvo leves e pesadas (Siebenlist *et al.* (1980) *Cell* 20:269) usando ligantes ou adaptadores para proporcionar todos os sítios de restrição necessários.

**[0213]** Em um aspecto, cada cístron dentro do vetor recombinante compreende um componente de sequência de sinal de secreção que direciona a translocação dos polipeptídeos expressos através de uma membrana. Em geral, a sequência de sinal pode ser um componente do vetor, ou pode ser uma parte do DNA de polipeptídeo alvo que é inserido no vetor. A sequência de sinal selecionada para o propósito desta invenção deve ser uma que seja reconhecida e processada (*i. e.* clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Para as células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam as sequências de sinal nativas dos polipeptídeos heterólogos, a sequência de sinal é substituída por uma sequência de sinal procariótico selecionada, por exemplo, do grupo que consiste na fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp, líderes estáveis de enterotoxina

II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Em algumas modalidades do presente pedido, as sequências de sinal utilizadas em ambos os cístrons do sistema de expressão são sequências de sinal STII ou variantes dos mesmos.

**[0214]** Em algumas modalidades, a produção dos anticorpos de acordo com o presente pedido pode ocorrer no citoplasma da célula hospedeira e, portanto, não requer a presença

de sequências de sinal de secreção dentro de cada cístron. Em algumas modalidades, os componentes polipeptídicos, tais como o polipeptídeo que codifica o domínio  $V_H$  da primeira porção de ligação ao antígeno opcionalmente fundida à segunda porção de ligação ao antígeno, e o polipeptídeo que codifica o domínio  $V_L$  da primeira porção de ligação ao antígeno opcionalmente fundida à segunda porção de ligação ao antígeno, são expressas, dobradas e montadas para formar anticorpos funcionais dentro do citoplasma. Certas cepas hospedeiras (*por exemplo*, as cepas *E. coli*  $trxB^-$ ) proporcionam condições de citoplasma que são favoráveis para a formação de ligações dissulfeto, permitindo assim o dobramento e a montagem adequados de subunidades de proteínas expressas. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

**[0215]** A presente invenção proporciona um sistema de expressão no qual a proporção quantitativa de componentes polipeptídicos expressos pode ser modulada de modo a maximizar o rendimento de anticorpos segregados e adequadamente reunidos do presente pedido. Essa modulação é realizada, pelo menos em parte, por modulação simultânea de forças de tradução para os componentes polipeptídicos. Uma técnica para modular a força de tradução é divulgada em Simmons *et al.*, Patente US 5.840.523. Utiliza variantes da região de iniciação da tradução (TIR) dentro de um cístron. Para um determinado TIR, uma série de variantes de sequências de aminoácidos ou ácidos nucleicos pode ser criada com uma faixa de forças de tradução, proporcionando assim um meio conveniente para ajustar esse fator para o nível de expressão desejado da cadeia específica. As variantes de TIR podem ser geradas por técnicas de mutagênese convencionais que resultam em alterações de códons que podem alterar a sequência de aminoácidos, embora sejam preferidas alterações silenciosas na sequência de ácido nucleico. Alterações no TIR podem incluir, por exemplo, alterações no número ou espaçamento das sequências de Shine-Dalgarno, juntamente com alterações na sequência do sinal. Um método para gerar sequências de sinal mutantes é a geração de um "banco de códons" no início de uma sequência de codificação que não altera a sequência de aminoácidos da sequência de sinal (*i. e.*, as mudanças são silenciosas). Isto pode ser obtido alterando a terceira posição de nucleotídeo de cada códon; adicionalmente, alguns aminoácidos, como leucina, serina e arginina, possuem múltiplas primeiras e segundas posições que podem adicionar complexidade ao fazer o banco. Este método de mutagênese é descrito em detalhes em Yansura *et al.* (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.



[0216] De preferência, um conjunto de vetores é gerado com uma faixa de forças TIR para cada cístron nela. Este conjunto limitado proporciona uma comparação dos níveis de expressão de cada cadeia, bem como o rendimento dos produtos proteicos desejados sob várias combinações de força TIR. As forças TIR podem ser determinadas quantificando o nível de expressão de um gene repórter como descrito em detalhes em Simmons *et al.* Patente US 5.840.523. Com base na comparação de força de tradução, os TIR individuais desejados são selecionados para serem combinados nos construtos de vetores de expressão do presente pedido.

**b) Células Hospedeiras Procarióticas.**

[0217] As células hospedeiras procarióticas adequadas para expressar os anticorpos do presente pedido incluem Archaeobacteria e Eubacteria, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos. Exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (por exemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por exemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, espécies de *Pseudomonas* (por exemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, ou *Paracoccus*. Em algumas modalidades, as células gram-negativas são usadas. Em algumas modalidades, células de *E. coli* são usadas como hospedeiros para a invenção. Exemplos de cepas *E. coli* incluem cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D. C. :American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) e derivados dos mesmos, incluindo a cepa 33D3 possuindo o genótipo W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup> (Patente US 5.639.635). Outras cepas e derivados das mesmas, tais como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) e *E. coli* RV308(ATCC 31,608) também são adequadas. Esses exemplos são ilustrativos, não são limitativos. Os métodos para construir derivados de qualquer uma das bactérias acima mencionadas, tendo genótipos definidos, são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em, Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). Em geral, é necessário selecionar as bactérias apropriadas levando em consideração a replicabilidade do replicon nas células de uma bactéria. Por exemplo, as espécies *E. coli*, *Serratia*, ou *Salmonella* podem ser adequadamente utilizadas como hospedeiras quando plasmídeos bem conhecidos, tais como pBR322, pBR325, pACYC177 ou pKN410, são utilizados para proporcionar o replicon.

[0218] Tipicamente, a célula hospedeira deve secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores de protease adicionais podem ser desejáveis incorporados na cultura celular.

**c) Produção de proteína**

[0219] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão acima descritos e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriados para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas. A transformação significa a introdução de DNA no hospedeiro procariótico para que o DNA seja replicável, seja como elemento extracromossômico ou por integrante cromossômico. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita usando técnicas padrão apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio que emprega cloreto de cálcio é geralmente utilizado para células bacterianas que contêm barreiras substanciais de parede celular. Outro método de transformação emprega polietilenoglicol/DMSO. Outra técnica utilizada é a eletroporação.

[0220] As células procarióticas utilizadas para produzir os anticorpos do presente pedido são cultivadas em meios conhecidos na técnica e adequados para cultura das células hospedeiras selecionadas. Exemplos de meios adequados incluem caldo luria (LB) mais suplementos nutritivos necessários. Em algumas modalidades, o meio também contém um agente de seleção, escolhido com base na construção do vetor de expressão, para permitir seletivamente o crescimento de células procarióticas contendo o vetor de expressão. Por exemplo, a ampicilina é adicionada aos meios para o crescimento de células que expressam o gene resistente à ampicilina.

[0221] Todos os suplementos necessários além das fontes de carbono, nitrogênio e fosfato inorgânico também podem ser incluídos em concentrações apropriadas, isoladas ou em mistura com outro suplemento ou meio, como uma fonte de nitrogênio complexo. Opcionalmente, o meio de cultura pode conter um ou mais agentes redutores selecionados do grupo que consiste em glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotretitol.

[0222] As células hospedeiras procarióticas são cultivadas a temperaturas adequadas. Para o crescimento de *E. coli*, por exemplo, a temperatura preferida varia de cerca de 20°C a cerca de 39°C, mais preferencialmente de cerca de 25°C a cerca de 37°C, ainda mais preferencialmente a cerca de 30°C. O pH do meio pode ser qualquer pH entre cerca de 5 e

cerca de 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Para *E. coli*, o pH é de preferência de cerca de 6,8 a cerca de 7,4, e mais preferencialmente cerca de 7,0.

[0223] Se um promotor induzível é utilizado no vetor de expressão do presente pedido, a expressão da proteína é induzida sob condições adequadas para a ativação do promotor. Num aspecto do presente pedido, os promotores de PhoA são utilizados para controlar a transcrição dos polipeptídeos. Consequentemente, as células hospedeiras transformadas são cultivadas num meio de limitação de fosfato para indução. De preferência, o meio limitador de fosfato é o meio C. R. A. P (ver, *por exemplo*, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Pode ser utilizada uma variedade de outros indutores, de acordo com o construto de vetor utilizado, como é conhecido na técnica.

[0224] Os anticorpos expressos do presente pedido são segregados e recuperados a partir do periplasma das células hospedeiras. A recuperação de proteínas geralmente envolve a interrupção do micro-organismo, geralmente por meios como choque osmótico, sonicação ou lise. Uma vez que as células são interrompidas, os detritos celulares ou células inteiras podem ser removidos por centrifugação ou filtração. As proteínas podem ser adicionalmente purificadas, por exemplo, por cromatografia de resina de afinidade. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultura e isoladas nele. As células podem ser removidas da cultura e o sobrenadante de cultura sendo filtrado e concentrado para purificação adicional das proteínas produzidas. Os polipeptídeos expressos podem ser adicionalmente isolados e identificados utilizando métodos vulgarmente conhecidos, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio de Western blot.

[0225] Alternativamente, a produção de proteínas é conduzida em grande quantidade por um processo de fermentação. Vários procedimentos de fermentação por lotes alimentados em larga escala estão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes. As fermentações em larga escala têm pelo menos 1000 litros de capacidade, de preferência cerca de 1.000 a 100.000 litros de capacidade. Estes fermentadores usam impulsores de agitador para distribuir oxigênio e nutrientes, especialmente glicose (a fonte de carbono/energia preferida). A fermentação em pequena escala refere-se geralmente à fermentação em um fermentador que não passa de aproximadamente 100 litros de capacidade volumétrica e pode variar de cerca de 1 litro a cerca de 100 litros.

**[0226]** Durante o processo de fermentação, a indução de expressão de proteína é tipicamente iniciada depois que as células foram cultivadas sob condições adequadas para uma densidade desejada, *por exemplo*, uma OD<sub>550</sub> de cerca de 180-220, estágio no qual as células estão na fase inicial estacionária. Pode ser utilizada uma variedade de indutores, de acordo com o construto de vetor utilizado, como é conhecido na técnica e descrito acima. As células podem ser cultivadas por períodos mais curtos antes da indução. As células são geralmente induzidas por cerca de 12 a 50 horas, embora possa ser usado um tempo de indução mais longo ou mais curto.

**[0227]** Para melhorar o rendimento da produção e a qualidade dos anticorpos do presente pedido, várias condições de fermentação podem ser modificadas. Por exemplo, para melhorar a montagem e o dobramento adequados dos polipeptídeos segregados, vetores adicionais que sobre-expressam proteínas de chaperona, tais como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e ou DsbG) ou FkpA (uma peptidilprolil cis, trans-isomerase com atividade de chaperona) pode ser usado para cotransformar as células procarióticas do hospedeiro. As proteínas de chaperona foram demonstradas para facilitar o dobramento e a solubilidade adequados das proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente US 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente US 6.027.888; Bothmann e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

**[0228]** Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente aquelas que são proteoliticamente sensíveis), certas cepas hospedeiras deficientes para enzimas proteolíticas podem ser usadas para a presente invenção. Por exemplo, as cepas de células hospedeiras podem ser modificadas para efetuar mutações genéticas nos genes que codificam proteases bacterianas conhecida, tais como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI e combinações dos mesmos. Algumas cepas de *E. coli* deficientes de protease estão disponíveis e descritas, por exemplo, em, Joly *et al.* (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, Patente US 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente US 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

**[0229]** Cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas e transformadas com plasmídeos que sobre-expressam uma ou mais proteínas chaperona podem ser utilizadas

como células hospedeiras no sistema de expressão que codifica os anticorpos do presente pedido.

#### **d) Purificação de proteína**

[0230] Os anticorpos aqui produzidos são ainda purificados para obter preparações que são substancialmente homogêneas para outros ensaios e usos. Podem ser utilizados métodos de purificação de proteínas padrão conhecidos na técnica. Os seguintes procedimentos são exemplos de procedimentos de purificação adequados: fracionamento em colunas de permuta de imunoafinidade ou íons, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica ou em uma resina de permuta catiônica, tal como DEAE, cromatofocagem, SDS-PAGE, precipitação de sulfato de amônio e filtração em gel usando, por exemplo, Sephadex G -75.

[0231] Em um aspecto, a Proteína A imobilizada numa fase sólida é utilizada para a purificação por imunoafinidade dos anticorpos compreendendo uma região Fc do presente pedido. A proteína A é uma proteína de parede celular de 41kD de *Staphylococcus aureus* que se liga com uma alta afinidade à região Fc de anticorpos. Lindmark *et al* (1983) *J. Immunol. Meth*62:1-13. A fase sólida à qual a Proteína A é imobilizada é de preferência uma coluna compreendendo uma superfície de vidro ou de sílica, mais preferencialmente uma coluna de vidro de poro controlada ou uma coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna foi revestida com um reagente, como o glicerol, na tentativa de evitar a aderência inespecífica de contaminantes. A fase sólida é então lavada para remover contaminantes não ligados especificamente à fase sólida. Finalmente, os anticorpos de interesse são recuperados da fase sólida por eluição.

#### **4. Produção recombinante em células procarióticas**

[0232] Para expressão eucariótica, os componentes do vetor incluem, geralmente, entre outros, uma ou mais de uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição.

##### **a) Componente de sequência de sinal**

[0233] Um vetor para utilização num hospedeiro eucariota também pode ser um inserto que codifique uma sequência de sinal ou outro polipeptídeo possuindo um sítio de clivagem específico no N-terminal da proteína ou polipeptídeo maduro. A sequência de sinal heteróloga selecionada de preferência é uma que é reconhecida e processada (isto é,

clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Na expressão de células de mamíferos, as sequências de sinais de mamíferos, bem como os líderes secretores virais, por exemplo, o sinal herpes simplex gD estão disponíveis.

[0234] O DNA para tal região precursora é ligado na estrutura de leitura ao DNA que codifica os anticorpos do presente pedido.

#### **b) Origem de replicação**

[0235] Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamíferos (a origem SV40 normalmente pode ser usada apenas porque contém o promotor inicial).

#### **c) Componente de Gene de Seleção**

[0236] Os vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de seleção, também denominado marcador selecionável. Os genes típicos de seleção codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, *por exemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam as deficiências auxotróficas, ou (c) proporcionam nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, *por exemplo*, o gene que codifica D-alanina racemase para Bacilli.

[0237] Um exemplo de um esquema de seleção utiliza uma droga para deter o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência aos medicamentos e, assim, sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam drogas neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0238] Outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para absorver o ácido nucleico que codifica os anticorpos do presente pedido, tais como DHFR, timidina quinase, metalotioneína-I e II, de preferência genes de metalotioneínas de primatas, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilase, etc.

[0239] Por exemplo, as células transformadas com o gene de seleção DHFR são identificadas pela primeira vez cultivando todos os transformantes em um meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo da DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando o DHFR de tipo selvagem é empregado é a linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente na atividade DHFR (*por exemplo*, ATCC CRL-9096).



[0240] Alternativamente, as células hospedeiras (particularmente hospedeiros de tipo selvagem que contêm DHFR endógena) transformadas ou cotransformadas com as sequências de codificação de DNA de polipeptídeo, proteína de DHFR de tipo selvagem e outro marcador selecionável tal como 3'-fosfotransferase de aminoglicosídeo (APH) podem ser selecionadas por cultura celular em meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável, tal como um antibiótico aminoglicosídico, *por exemplo*, canamicina, neomicina ou G418. Ver Patente US 4.965.199.

#### **d) Componente de Promotor**

[0241] Os vetores de expressão e clonagem geralmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operacionalmente ligado ao ácido nucleico que codifica as sequências polipeptídicas desejadas. Praticamente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 com base a montante do local onde a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleotídeo. A extremidade 3' da maioria dos eucarióticos é uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda de poli A na extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências podem ser inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

[0242] Outros promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor *phoA*, os sistemas de promotor de lactação e lactose, o promotor de fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac*. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Os promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão uma sequência Shine-Dalgarno (S. D.) operacionalmente ligada ao DNA que codifica os anticorpos.

[0243] A transcrição de polipeptídeo a partir de vetores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus, tais como vírus de polioma, vírus da varzeia, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e mais preferencialmente vírus simiano 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, *por exemplo*, o promotor de actina ou um promotor de

imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

[0244] Os promotores precoces e tardios do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição SV40 que também contém a origem viral de replicação SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição de HindIII E. Um sistema para expressar DNA em hospedeiros de mamíferos utilizando o vírus do papiloma bovino como um vetor é divulgado na Patente US 4.419.446. Uma modificação deste sistema é descrita na Patente US 4.601.978. Ver, também, Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) na expressão de cDNA de interferon humano em células de camundongo sob o controle de um promotor de timidina quinase do vírus do herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa do Rous Sarcoma Virus pode ser usada como o promotor.

#### **e) Componente do Elemento Potenciador**

[0245] A transcrição de um DNA que codifica os anticorpos do presente pedido por eucariotas superiores é frequentemente aumentada inserindo uma sequência potenciadora no vetor. Muitas sequências potenciadoras são agora conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Normalmente, no entanto, será usado um potenciador de um vírus celular eucariótico. Exemplos incluem o potencializador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (bp 100-270), o potencializador do promotor precoce de citomegalovírus, o potencializador de polioma no lado tardio da origem de replicação e potencializadores de adenovírus. Ver, também Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potencializadores para a ativação de promotores eucarióticos. O potencializador pode ser unido no vetor numa posição 5' ou 3' para a sequência de codificação do polipeptídeo, mas está de preferência localizado num sítio 5' do promotor.

#### **f) Componente de terminação de transcrição**

[0246] Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de leveduras, fungos, insetos, plantas, animais, humanos ou nucleados de outros organismos multicelulares) também contêm sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilizar o mRNA. Tais sequências são comumente disponíveis a partir das regiões 5' e, ocasionalmente, 3', não traduzidas de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeos transcritos como fragmentos poliadenilados na

porção não traduzida do mRNA que codifica o polipeptídeo. Um componente útil de terminação da transcrição é a região de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino. Ver WO94/11026 e o vetor de expressão aqui divulgado.

**g) Seleção e transformação de células hospedeiras**

[0247] Células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do DNA nos vetores aqui incluídos células de eucariotas superiores aqui descritas, incluindo células hospedeiras de vertebrados. A propagação de células de vertebrados em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens de célula hospedeira de mamífero úteis são linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriogênica humana (293 ou 293 células subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de sertoli de rato (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980). células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CCRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

[0248] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem acima descritos para produção de anticorpos e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriados para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

**h) Cultivo de células hospedeiras**

[0249] As células hospedeiras usadas para produzir os anticorpos do presente pedido podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis, tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Mínimo Essencial ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para o cultivo das células hospedeiras. Além disso, qualquer dos meios descritos em Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Patente US

4.767.704; 4 657.866; 4.927.762; 4.560.655; ou 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou Patente US Re. 30.985 podem ser utilizados como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um desses meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (como insulina, transferrina ou fator de crescimento epidérmico), sais (como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (como HEPES), nucleotídeos (como adenosina e timidina), antibióticos (como o medicamento GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compostos inorgânicos geralmente presentes nas concentrações finais na faixa micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que seriam conhecidas dos versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são aquelas previamente utilizadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para o versado na técnica.

#### **i) Purificação de proteína**

[0250] Usando técnicas recombinantes, os anticorpos podem ser produzidos intracelularmente, no espaço periplásmico, ou diretamente secretado no meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detritos particulados, ou células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) descreve um procedimento para isolar anticorpos que são secretados para o espaço periplasmático *E. coli*. Em suma, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) ao longo de cerca de 30 min. Detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo é secretado para o meio, sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados usando um filtro de concentração de proteína disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease como PMSF pode ser incluído em qualquer uma das etapas anteriores para inibir proteólise e antibióticos podem ser incluídos para evitar o crescimento de contaminantes acidentais.

[0251] A composição de proteína preparada a partir das células pode ser purificada usando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica de purificação

preferida. A adequabilidade da proteína A como ligante de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar os anticorpos baseados em imunoglobulinas humanas contendo 1, 2 ou 4 cadeias pesadas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de camundongos e para humanos 3 (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade é ligado é muito frequentemente agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. As matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno, permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos do que podem ser obtidos com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio CH<sub>3</sub>, o Bakerbond ABXTMresin (J. Baker, Phillipsburg, N. J) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteína como fracionamento numa coluna de troca iônica, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia numa resina de troca aniônica ou catiônica (como uma coluna de ácido poliaspártico), cromato-focalização, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio também estão disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

[0252] Após qualquer etapa(s) de purificação preliminar, a mistura que compreende o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida à cromatografia de interação hidrofóbica de baixo pH usando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, de preferência realizado com baixas concentrações de sal (*por exemplo*, de cerca de 0-0,25M de sal).

### **Imunoconjugados**

[0253] Em algumas modalidades, o presente pedido também proporciona imunoconjugados compreendendo qualquer dos anticorpos (tais como sdAbs) aqui descritos conjugados com um ou mais agentes citotóxicos, tais como agentes quimioterapêuticos ou drogas, agentes inibidores do crescimento, toxinas (*por exemplo*, toxinas proteicas, toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos dos mesmos) ou isótopos radioativos.

[0254] Em algumas modalidades um imunoconjugado é um conjugado anticorpo-droga (ADC) em que um anticorpo é conjugado com uma ou mais drogas, incluindo mas não limitado a um maitansinoide (*ver* Patente US 5. 208. 020, 5. 416. 064 e Patente Europeia

EP 0 425 235 BI); uma auristatina, como frações de drogas monometilauristatina DE e DF (MMAE e MMAF) (ver Patente US 5. 635. 483 e 5. 780. 588, e 7. 498. 298); uma dolastatina; uma caliqueamicina ou derivado da mesma (ver Patente US 5. 712. 374, 5. 714. 586, 5. 739. 116, 5. 767. 285, 5. 770. 701, 5. 770. 710, 5. 773.001 e 5. 877. 296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); e Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); uma antraciclina tal como daunomicina ou doxorubicina (ver Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529- 1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); ePatente US 6. 630. 579); metotrexato; vindesina; um taxano, tais como o docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, e ortataxel; um tricoteceno; e CC1065.

**[0255]** Em algumas modalidades, um imunoc conjugado compreende um anticorpo como aqui descrito conjugado com uma toxina enzimaticamente ativa ou um fragmento do mesmo, incluindo mas não se limitando a cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxina de difteria, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia, A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos.

**[0256]** Em algumas modalidades, um imunoc conjugado compreende um anticorpo conforme descrito neste documento conjugado a um átomo radioativo para formar um radioconjugado. Uma variedade de isótopos radioativos está disponível para a produção de radioconjugados. Exemplos incluem  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radioativos de Lu. Quando o radioconjugado é utilizado para a detecção, que pode compreender um átomo radioativo para estudos de cintilografia, por exemplo  $^{99m}Tc$  ou  $^{112}In$ , ou um marcador de rotação para imagem de ressonância magnética nuclear (NMR) (também conhecida como imagiologia de ressonância magnética, mri), tal como iodo- 123 novamente, iodo-131, índio-111, flúor -19, carbono-13, nitrogênio-15, oxigênio- 17, gadolínio, manganês ou ferro.

**[0257]** Os conjugados de um anticorpo e agente citotóxico podem ser produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais, tais como



N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de dissuccinimidil), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos (tais como tolueno-2,6-diisocianato), e compostos bis-ativos de flúor (tais como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparado como descrito em Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado com carbono 14 (MX-DTPA) é um agente quelante exemplificativo para a conjugação de radionuclotídeos ao anticorpo. Ver WO94/11026. O ligante pode ser um “ligante clivável” que facilita a liberação de uma droga citotóxica na célula. Por exemplo, um ligante de ácido-lábil, ligante sensível a peptidases, ligante fotolábil, ligante dimetil ou ligante contendo dissulfeto (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente US 5.208.020) pode ser usado.

**[0258]** Os imunoconjugados ou ADCs aqui expressamente contemplam, mas não estão limitados a tais conjugados preparados com reagentes de reticulação incluindo, mas não limitado a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, e sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que estão comercialmente disponíveis (*por exemplo*, na Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

### **Métodos e Composições para Diagnósticos e Detecção**

**[0259]** Em algumas modalidades, qualquer um dos anticorpos (tais como sdAbs) aqui proporcionados é útil para detectar a presença de BCMA numa amostra biológica. O termo "detectar" como usado neste documento abrange a detecção quantitativa ou qualitativa. Em certas modalidades, uma amostra biológica é sangue, soro ou outras amostras líquidas de origem biológica. Em algumas modalidades, uma amostra biológica compreende uma célula ou tecido.

**[0260]** Em algumas modalidades, é proporcionado um anticorpo anti-BCMA (tal como qualquer um dos sdAbs anti-BCMA aqui descritos) para utilização num método de diagnóstico ou detecção. Em um aspecto adicional, é proporcionado um método de

detecção da presença de BCMA em uma amostra biológica. Em certas modalidades, o método compreende detectar a presença de proteína BCMA numa amostra biológica. Em certas modalidades, o BCMA é BCMA humano. Em certas modalidades, o método compreende colocar em contato a amostra biológica com um anticorpo anti-BCMA conforme descrito neste documento sob condições permissivas para a ligação do anticorpo anti-BCMA ao BCMA, e detectar se um complexo é formado entre o anticorpo anti-BCMA e BCMA. Esse método pode ser um método *in vitro* ou *in vivo*. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-BCMA é utilizado para selecionar indivíduos elegíveis para terapia com um anticorpo anti-BCMA, *por exemplo* onde BCMA é um biomarcador para seleção de pacientes.

[0261] Em certas modalidades, sdAbs anti-BCMA marcados são proporcionados. As marcações incluem, mas não estão limitadas a, marcações ou frações que são detectadas diretamente (tais como marcações fluorescentes, cromóforas, eletrodensas, quimioluminescentes, e radioativas), bem como frações, tais como enzimas ou ligantes, que são detectados indiretamente, *por exemplo*, através de uma reação enzimática ou interação molecular. As marcações exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a, os radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , e  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos, tais como quelatos de terras raras ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansil, umbeliferona, luciferases, *por exemplo*, luciferase de vagalume e luciferase bacteriana (PatenteUS 4.737.456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinedionas, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, glicamilase, lisozima, oxidases de sacarídeo, *por exemplo*, oxidase de glucose, oxidase de galactose e glucose-6-fosfato desidrogenase, oxidases heterocíclicas, tais como uricase e oxidase de xantina, juntamente com uma enzima que emprega peróxido de hidrogênio para oxidar um precursor de corante, tal como HRP, lactoperoxidase ou microperoxidase, biotina/avidina, marcadores de rotação, marcadores de bacteriófagos, radicais livres estáveis e semelhantes.

### III. Receptores de antígenos quiméricos

[0262] Um aspecto do presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo um domínio de ligação de antígeno extracelular compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único (tais como  $\text{V}_{\text{H}}\text{Hs}$ ). Qualquer um dos sdAbs anti-BCMA descritos na Seção II pode ser usado nos CARs aqui descritos. Estruturas exemplificativas de CARs são mostradas nas FIGs. 15A-15D.

**[0263]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR que direciona o BCMA (também aqui referido como "CAR BCMA") compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é de camélídeo, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é derivado de CD3 $\Gamma$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR BCMA também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR BCMA compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal : um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD28, um primeiro domínio de sinalização coestimulador derivado de CD28, um segundo domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\Gamma$ . Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\Gamma$ . Em algumas modalidades, o CAR BCMA é monoespecífico. Em algumas modalidades, o CAR BCMA é monovalente.

**[0264]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio

de sinalização intracelular, em que o sdAb anti-BCMA compreende qualquer um dos seguintes:(1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:77; (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:78; (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:79; (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:80; (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:81; (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:82; (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:83; (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84; (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:85; (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:86; (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:87; (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12; uma CDR2

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:88; (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:89; (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:52; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:90; (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:91; (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:92; (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:93; (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:94; (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:95; (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:96; (21) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:97; (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:98; (23) uma CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:99; (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100; (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:101; (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:102; (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:103; (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:104; (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:105; (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:106; (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:69; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:107; (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:108; (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71; e uma CDR3



compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:109; (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:110; (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:111; (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:112; (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113; or (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:114. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é de camélídeo, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:115-

152. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é derivado de CD3 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR BCMA também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR BCMA compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas

modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal : um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD28, um primeiro domínio de sinalização coestimulador derivado de CD28, um segundo domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\Gamma$  . Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\Gamma$  . Em algumas modalidades, o CAR BCMA é monoespecífico. Em algumas modalidades, o CAR BCMA é monovalente.

**[0265]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA compreendendo um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:216-256 e 298-335. Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:216-256 e 298-335. Também é proporcionado um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:216-256 e 298-335.

**[0266]** Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado que codifica qualquer um dos CARs BCMA proporcionados aqui. Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado possuindo pelo menos aproximadamente qualquer um de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência para uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:257-297 e 336-373. Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:257-297 e 336-373. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é um DNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é um RNA. Em algumas modalidades, é proporcionado um vetor compreendendo qualquer um dos ácidos nucleicos que codificam os CARs BCMA descritos acima. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de expressão. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor viral, como um vetor lentiviral. Em algumas modalidades,

o vetor é um vetor não viral. CARs BCMA monovalentes exemplificativos são mostradas na Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4. CARs BCMA monovalentes exemplificativos.**

Ex. Vetor ou Nome do CAR	Ex. AA SEQ ID	Ex. NA SEQ ID	SP	Extra celular. sdAb	Dobra diça	TM	Sinalização intracelular		
							CO1	CO2	Prim.
PLLV-hEF1a-269A37346	216	257	CD8 $\alpha$	269A37346	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV-hEF1a-269A37348	217	258	CD8 $\alpha$	269A37348	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV-hEF1a-269A37917	218	259	CD8 $\alpha$	269A37917	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV-hEF1a-269A37355	219	260	CD8 $\alpha$	269A37355	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV-hEF1a-269A37915	220	261	CD8 $\alpha$	269A37915	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV-hEF1a-	221	262	CD8 $\alpha$	269A3793	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$

269A37 936				6					
PLLV- hEF1a- 269A37 953	222	263	CD8 $\alpha$	269A 3795 3	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV- hEF1a- 269A37 965	223	264	CD8 $\alpha$	269A 3796 5	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV- hEF1a- 269A37 972	224	265	CD8 $\alpha$	269A 3797 2	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV- hEF1a- 269A37 353	225	266	CD8 $\alpha$	269A 3735 3	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLLV- hEF1a- 269A37 948	226	267	CD8 $\alpha$	269A 3794 8	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
GSI501 1 CAR	227	268	CD8 $\alpha$	269A 3734 6	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
GSI501 9 CAR	228	269	CD8 $\alpha$	269A 3735 3	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
GSI502 0 CAR	229	270	CD8 $\alpha$	269A 3791 7	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B00	230	271	CD8	269B	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13	NA	CD3 $\zeta$

5S			$\alpha$	005			7		
269B02 3S	231	272	CD8 $\alpha$	269B 023	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B02 4S	232	273	CD8 $\alpha$	269B 024	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B02 8S	233	274	CD8 $\alpha$	269B 028	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B03 0S	234	275	CD8 $\alpha$	269B 030	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B03 8S	235	276	CD8 $\alpha$	269B 038	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B05 4S	236	277	CD8 $\alpha$	269B 054	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B05 9S	237	278	CD8 $\alpha$	269B 059	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B06 0S	238	279	CD8 $\alpha$	269B 060	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B06 9S	239	280	CD8 $\alpha$	269B 069	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B07 4S	240	281	CD8 $\alpha$	269B 074	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B07 6S	241	282	CD8 $\alpha$	269B 076	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B07 9S	242	283	CD8 $\alpha$	269B 083	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B08 3S	243	284	CD8 $\alpha$	269B 085	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B08 5S	244	285	CD8 $\alpha$	269B 093	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B09 3S	245	286	CD8 $\alpha$	269B 094	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B09	246	287	CD8	269B	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13	NA	CD3 $\zeta$

4S			$\alpha$	104			7		
269B10 4S	247	288	CD8 $\alpha$	269B 109	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B10 9S	248	289	CD8 $\alpha$	269B 110	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B11 0S	249	290	CD8 $\alpha$	269B 113	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B11 3S	250	291	CD8 $\alpha$	269B 126	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B12 6S	251	292	CD8 $\alpha$	269B 129	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B12 9S	252	293	CD8 $\alpha$	269B 131	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B13 1S	253	294	CD8 $\alpha$	269B 135	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B13 5S	254	295	CD8 $\alpha$	269B 136	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B13 6S	255	296	CD8 $\alpha$	269B 139	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$
269B13 9S	256	297	CD8 $\alpha$	269B 024	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD13 7	NA	CD3 $\zeta$

### Receptores de antígenos quiméricos multivalentes

[0267] O presente pedido também proporciona CARs multivalentes que possuem duas ou mais (como cerca de qualquer um dos 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) frações de ligação que se ligam especificamente a um antígeno, tal como BCMA. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de ligação são fragmentos de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de ligação compreendem anticorpos de domínio único. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de ligação são derivadas de anticorpos camelídeos. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de ligação são derivadas de um anticorpo de quatro cadeias. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de ligação são scFvs. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de



ligação são derivadas de anticorpos humanos. Em algumas modalidades, uma ou mais das frações de ligação são ligandos polipeptídicos ou outros polipeptídeos não anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno. Em algumas modalidades, o CAR multivalente é monoespecífico, *isto é*, o CAR multivalente direciona um único antígeno e compreende dois ou mais sítios de ligação para o antígeno único. Em algumas modalidades, o CAR multivalente é monoespecífico, *isto é*, o CAR multivalente tem como alvo mais do que um antígeno e o CAR multivalente compreende dois ou mais sítios de ligação para pelo menos um antígeno. As frações de ligação específicas para o mesmo antígeno podem se ligar ao mesmo epítopo do antígeno (*isto é*, “monoepítopo CAR”) ou se ligam a diferentes epítopos (*isto é*, “multiepítopo CAR” como biepítopo CAR ou triepítopo CAR) do antígeno. Os sítios de ligação específicos para o mesmo antígeno podem compreender os mesmos ou diferentes sdAbs.

**[0268]** Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico multivalente (tal como bivalente, trivalente ou de maior número de valências) que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma pluralidade (tal como pelo menos cerca de qualquer um dos 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) de frações de ligação que se ligam especificamente a um antígeno (tal como um antígeno tumoral); (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o antígeno é selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 MAGE A3 e glicolípido F77.

**[0269]** Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico multivalente (tal como bivalente, trivalente ou de maior número de valências) que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma pluralidade (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) de anticorpos de domínio único (sdAb) que se liga especificamente a um antígeno (tal como um antígeno tumoral); (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o antígeno é selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 MAGE A3 e glicolípido F77.

**[0270]** Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico multivalente (tal como bivalente, trivalente ou de maior número de valências) que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação que liga especificamente a um primeiro epítopo de um antígeno (como um antígeno tumoral), e uma segunda fração de ligação que liga especificamente a um segundo epítopo do antígeno; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítopo e o segundo epítopo são diferentes. Em algumas modalidades, o antígeno é selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 MAGE A3 e glicolipídeo F77. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação é um sdAb e a segunda fração de ligação é derivada de um anticorpo humano (*por exemplo*, um scFv). Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação é um sdAb e a segunda fração de ligação é um ligando polipeptídico. Em algumas modalidades, o primeiro epítopo é o mesmo que o segundo epítopo. Em algumas modalidades, o primeiro epítopo é diferente do segundo epítopo. Em algumas modalidades, o CAR multivalente liga-se especificamente a dois epítopos diferentes num antígeno. Em algumas modalidades, o CAR multivalente liga-se especificamente a três ou mais epítopos diferentes num antígeno.

**[0271]** Em algumas modalidades, o presente pedido proporciona um receptor de antígeno quimérico multivalente (tal como bivalente, trivalente ou de maior número de valências) que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb que liga especificamente a um primeiro epítopo de um antígeno (como um antígeno tumoral), e um segundo sdAb que liga especificamente a um segundo epítopo do antígeno; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítopo e o segundo epítopo são diferentes. Em algumas modalidades, o antígeno é selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 MAGE A3 e glicolipídeo F77.

**[0272]** Em algumas modalidades, as frações de ligação, tais como sdAbs (incluindo a pluralidade de sdAbs, ou o primeiro sdAb e/ou o segundo sdAb) são camelídeos, quiméricos, humanos ou humanizados. Em algumas modalidades, as frações de ligação ou sdAbs são fundidas entre si através de ligações peptídicas ou de ligantes peptídicos. Em

algumas modalidades, cada ligante peptídico não tem mais que cerca de 50 (tal como não mais que qualquer um de 35, 25, 20, 15, 10 ou 5) aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é selecionado do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é derivado de CD3  $\Gamma$  . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR multivalente também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR multivalente compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3  $\Gamma$  . Em algumas modalidades, o CAR multivalente é monoespecífico. Em algumas modalidades, o CAR multivalente é multiespecífico, como biespecífico.

**[0273]** Os CARs multivalentes descritos aqui podem ser especialmente adequados para direcionar antígenos multiméricos através de ligação sinérgica pelos diferentes sítios de ligação de antígeno, ou para aumentar a afinidade de ligação ou a avidéz ao antígeno. Qualquer um dos sdAbs anti-BCMA aqui descritos pode ser utilizado no domínio de ligação ao antígeno extracelular dos CARs multivalentes aqui descritos. Uma lista de CARs BCMA multivalentes exemplificativos, sequências exemplificativas, construtos e vetores destes são mostrados na Tabela 5.

**[0274]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR multivalente que direciona BCMA compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular

compreendendo uma pluralidade (tal como pelo menos cerca de qualquer um dos 2, 3, 4 ou mais) de uma fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, um sdAb anti-BCMA); (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular. Qualquer um dos sdAbs anti-BCMA pode ser usado para construir o CAR BCMA multivalente. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno extracelular se liga especificamente a um único epítipo do BCMA, e esses CARs são aqui referidos como CARs BCMA multivalentes monoepítipo.

**[0275]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma pluralidade (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 2, 3, 4 ou mais) de um sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:39 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77.

**[0276]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente (também aqui referido como "CAR multivalente multiepítipo") compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo pelo menos duas (tal como qualquer uma de 2, 3, 4 ou mais) frações de ligação ao BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que as pelo menos duas frações de ligação ao BCMA se ligam especificamente a pelo menos dois epítipos diferentes em BCMA. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno extracelular compreende uma primeira fração de ligação ao BCMA e uma segunda fração de ligação ao BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é derivada de um anticorpo humano (*por exemplo*, um scFv). Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb e a segunda fração de ligação ao BCMA é um ligando polipeptídico de BCMA. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação anti-BCMA e/ou a segunda fração de ligação ao BCMA liga-se especificamente a um epítipo em BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs:388-394. Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA se liga especificamente a um epítipo derivado da SEQ ID NO:389 e/ou 390. Em algumas modalidades, a segunda

fração de ligação ao BCMA se liga especificamente a um epítopo derivado da SEQ ID NO:391 e/ou 392.

**[0277]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembrantar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb anti-BCMA e o segundo sdAb anti-BCMA se liga especificamente a epítopos diferentes no BCMA. Qualquer um dos sdAbs anti-BCMA pode ser usado para construir o CAR BCMA multivalente. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA e/ou o segundo sdAb anti-BCMA se liga especificamente a um epítopo em BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs:388-394. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA se liga especificamente a um epítopo derivado da SEQ ID NO:389 e/ou 390. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA se liga especificamente a um epítopo derivado da SEQ ID NO:391 e/ou 392.

**[0278]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembrantar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:41, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79; e em que o segundo sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:48 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:86. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:117. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:124. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:124. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:117.

**[0279]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:48, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:86; e em que o sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:49 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:87. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:124. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:125.

**[0280]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:7, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:83; e em que o sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:49 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:87. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:121. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:125.

**[0281]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb



anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:53, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:91; e em que o sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:94. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:129. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:132.

**[0282]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembrantar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:94; e em que o sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:96. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:132. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:134.

**[0283]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente, compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA e um segundo sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembrantar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:96; e em que o sdAb anti-BCMA compreende uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de



SEQ ID NO:28, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:66 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:104. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:134. Em algumas modalidades, o segundo sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:142.

**[0284]** Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) está localizado no N-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA). Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) está localizado no C-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA). Em algumas modalidades, a primeira fração de ligação BCMA (*por exemplo*, o primeiro sdAb anti-BCMA) e a segunda fração de ligação BCMA (*por exemplo*, o segundo sdAb anti-BCMA) são fundidos uns aos outros através de uma ligação peptídica ou um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o ligante peptídico não tem mais que cerca de 50 (tal como não mais que qualquer um de 35, 25, 20, 15, 10 ou 5) aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é derivado de CD3 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR BCMA multivalente também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR BCMA multivalente compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio

transmembrantar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o CAR BCMA multivalente é bivalente. Em algumas modalidades, o CAR BCMA multivalente é trivalente. Em algumas modalidades, o CAR BCMA multivalente liga-se especificamente a dois epítomos diferentes num BCMA. Em algumas modalidades, o CAR BCMA multivalente liga-se especificamente a três ou mais epítomos diferentes num BCMA.

**[0285]** Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente compreendendo um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:298-335. Em algumas modalidades, é proporcionado um CAR BCMA multivalente compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:298-335. Também é proporcionado um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:298-335.

**[0286]** Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado que codifica qualquer um dos CARs BCMA multivalentes proporcionados aqui. Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado possuindo pelo menos aproximadamente qualquer um de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência para uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:336-373. Em algumas modalidades, é proporcionado um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:336-373. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é um DNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é um RNA. Em algumas modalidades, é proporcionado um vetor compreendendo qualquer um dos ácidos nucleicos que codificam os CARs BCMA multivalentes descritos acima. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de expressão. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor viral, como um vetor lentiviral. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor não viral. CARs BCMA multivalentes exemplificativos são mostrados na Tabela 5 abaixo.

**Tabela 5. CARs BCMA multivalentes exemplificativos.**

C A R	Ex. AA SE Q ID	Ex . N A SE Q ID	SP	Domínio de ligação ao antígeno extracelular					Dobr adiça	TM	Sinaliza ção intracelu lar	
				sdA b #1	Ligaç ão#1 SEQ ID	sdAb #2	Ligaç ão #2 SEQ ID	sdA b #3			C O1	Pri m.
G SI 50 14	298	33 6	CD 8 $\alpha$	269 A37 346	208	269A 3734 6	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
G SI 50 15	299	33 7	CD 8 $\alpha$	269 A37 346	208	269A 3734 6	208	269 A37 346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
G SI 50 21	300	33 8	CD 8 $\alpha$	269 A37 353	208	269A 3791 7	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
G SI 50 22	301	33 9	CD 8 $\alpha$	269 A37 353	213	269A 3791 7	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
G SI 50 23	302	34 0	CD 8 $\alpha$	269 A37 353	215	269A 3791 7	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
G	303	34	CD	269	209	269A	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8	C	C

SI 50 24		1	8 $\alpha$	A37 917		3735 3				$\alpha$	D1 37	D3 $\zeta$
G SI 50 25	304	34 2	CD 8 $\alpha$	269 A37 917	213	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
G SI 50 26	305	34 3	CD 8 $\alpha$	269 A37 917	214	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R 00 1	306	34 4	CD 8 $\alpha$	269 A37 353	208	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R 00 2	307	34 5	CD 8 $\alpha$	269 A37 353	213	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R 00 3	308	34 6	CD 8 $\alpha$	269 A37 353	215	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A	309	34 7	CD 8 $\alpha$	269 A37 948	209	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$

R 00 4												
B C A R R 00 5	310	34 8	CD 8 $\alpha$	269 A37 948	213	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 00 6	311	34 9	CD 8 $\alpha$	269 A37 948	214	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 00 7	312	35 0	CD 8 $\alpha$	269 A37 953	208	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 00 8	313	35 1	CD 8 $\alpha$	269 A37 953	213	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 00	314	35 2	CD 8 $\alpha$	269 A37 953	215	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$

9												
B C A R R 01 0	315	35 3	CD 8 $\alpha$	269 A37 953	209	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 1	316	35 4	CD 8 $\alpha$	269 A37 953	213	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 2	317	35 5	CD 8 $\alpha$	269 A37 953	214	269A 3794 8	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 3	318	35 6	CD 8 $\alpha$	269 B02 8	208	269B 054	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 4	319	35 7	CD 8 $\alpha$	269 B02 8	213	269B 054	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B	320	35	CD	269	215	269B	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8	C	C

C A R R 01 5		8	8 $\alpha$	B02 8		054				$\alpha$	D1 37	D3 $\zeta$
B C A R R 01 6	321	35 9	CD 8 $\alpha$	269 B02 8	209	269B 054	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 7	322	36 0	CD 8 $\alpha$	269 B02 8	213	269B 054	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 8	323	36 1	CD 8 $\alpha$	269 B02 8	214	269B 054	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 01 9	324	36 2	CD 8 $\alpha$	269 B05 4	208	269B 060	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A A	325	36 3	CD 8 $\alpha$	269 B05 4	213	269B 060	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$



R 02 0												
B C A R R 02 1	326	36 4	CD 8 $\alpha$	269 B05 4	215	269B 060	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02 2	327	36 5	CD 8 $\alpha$	269 B05 4	209	269B 060	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02 3	328	36 6	CD 8 $\alpha$	269 B05 4	213	269B 060	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02 4	329	36 7	CD 8 $\alpha$	269 B05 4	214	269B 060	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02	330	36 8	CD 8 $\alpha$	269 B06 0	208	269B 094	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$

5												
B C A R R 02 6	331	36 9	CD 8 $\alpha$	269 B06 0	213	269B 094	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02 7	332	37 0	CD 8 $\alpha$	269 B06 0S	215	269B 094	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02 8	333	37 1	CD 8 $\alpha$	269 B06 0	209	269B 094	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 02 9	334	37 2	CD 8 $\alpha$	269 B06 0	213	269B 094	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$
B C A R R 03 0	335	37 3	CD 8 $\alpha$	269 B06 0	214	269B 094	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	C D1 37	C D3 $\zeta$

**Receptores de antígenos quiméricos multiespecíficos**

[0287] O presente pedido proporciona ainda receptores de antígenos quiméricos multiespecíficos que direcionam dois ou mais (por exemplo, cerca de qualquer um de 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) antígenos diferentes. Em algumas modalidades, o CAR multiespecífico possui um único sítio de ligação ao antígeno para cada antígeno. Em algumas modalidades, o CARs multiespecífico possui mais de dois sítios de ligação para pelo menos um antígeno. Cada sítio de ligação ao antígeno pode compreender um sdAb. Por exemplo, em algumas modalidades, o CAR multiespecífico é um CAR biespecífico compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo dois sdAbs diferentes cada um especificamente ligando-se a um antígeno. Em algumas modalidades, o CAR multiespecífico é um CAR triespecífico compreendendo um domínio de ligação do antígeno extracelular compreendendo três SdAbs diferentes cada um especificamente ligando-se a um antígeno.

[0288] Em algumas modalidades, é proporcionado um receptor de antígeno quimérico (CAR) multispecífico (tal como biespecífico) compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro anticorpo de domínio único (sdAb) que se liga especificamente ao BCMA e um segundo anticorpo de domínio único (sdAb) que se liga especificamente a um segundo antígeno (tal como um antígeno tumoral); (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro antígeno é diferente do segundo antígeno. Em algumas modalidades, o segundo antígeno é selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 MAGE A3 e glicolípídeo F77. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb e/ou o segundo sdAb é de camélídeo, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb e o segundo sdAb são fundidos um com o outro através de uma ligação peptídica ou um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o ligante peptídico não tem mais que cerca de 50 (tal como não mais que qualquer um de 35, 25, 20, 15, 10 ou 5) aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é selecionado do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de

sinalização intracelular primário é derivado de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR multiespecífico também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR multiespecífico compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD28, um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD28 e um domínio primário de sinalização intracelular derivado de CD3 $\zeta$ .

#### **Domínio de ligação ao antígeno extracelular**

[0289] O domínio de ligação ao antígeno extracelular dos CARs aqui descritos compreende um ou mais anticorpos de domínio único (como qualquer um de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) frações de ligação, tais como sdAbs. Em algumas modalidades, a uma ou mais frações de ligação são anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em algumas modalidades, a uma ou mais frações de ligação são derivadas de anticorpos de quatro cadeias. Em algumas modalidades, a uma ou mais frações de ligação são derivadas de anticorpos camelídeos. Em algumas modalidades, a uma ou mais frações de ligação são derivadas de anticorpos humanos. Em algumas modalidades, a uma ou mais frações de ligação são proteínas de ligação não anticorpos, tais como ligandos polipeptídicos ou proteínas engenheiradas que se ligam a um antígeno. As frações de ligação podem ser fundidas uma com a outra diretamente através de ligações peptídicas, ou através de ligantes peptídicos.

## 1. Anticorpos de domínio único

[0290] Em algumas modalidades, o CAR compreende um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um ou mais sdAbs. Os sdAbs podem ser do mesmo tipo de origens diferentes e de tamanhos iguais ou diferentes. sdAbs exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, domínios variáveis de cadeia pesada de apenas anticorpos de cadeia pesada (*por exemplo*,  $V_{HH}$  ou  $V_{NAR}$ ), moléculas de ligação naturalmente desprovidas de cadeias leves, domínios únicos (como  $V_H$  ou  $V_L$ ) derivados de anticorpos convencionais de 4 cadeias, anticorpos de cadeia pesada humanizados, sdAbs humanos produzidos por camundongos transgênicos ou ratos que expressam segmentos de cadeia pesada humana e domínios engenheirados e andaimes de domínio único diferentes daqueles derivados de anticorpos. Quaisquer sdAbs conhecidos na técnica ou desenvolvidos pelos inventores, incluindo os sdAbs descritos na Seção II do presente pedido, podem ser usados para construir os CARs aqui descritos. O sdAbs pode ser derivado de qualquer espécie, incluindo, mas não limitado a camundongo, ratos, humanos, camelos, lama, lampreia, peixe, tubarão, cabra, coelho e bovino. Os anticorpos de domínio único contemplados aqui também incluem moléculas de sdAb de ocorrência natural de espécies diferentes de *Camelidae* e tubarões.

[0291] Em algumas modalidades, o sdAb é derivado de uma molécula de ligação ao antígeno de domínio único de ocorrência natural conhecido como anticorpo de cadeia pesada desprovido de cadeias leves (também aqui referido como "anticorpos de cadeia pesada apenas"). Tais moléculas de domínio único são divulgadas em WO 94/04678 and Hamers-Casterman, C. *et al.* (1993) *Nature* 363:446-448, por exemplo. Por razões de clareza, o domínio variável derivado de uma molécula de cadeia pesada naturalmente desprovida de cadeia leve é aqui conhecido como um  $V_{HH}$  para distingui-lo do convencional  $V_H$  de imunoglobulinas de quatro cadeias. Tal molécula de  $V_{HH}$  pode ser derivada de anticorpos criados em espécies de *Camelidae*, por exemplo, camelo, lhama, vicuna, dromedário, alpaca e guanaco. Outras espécies além de *Camelidae* podem produzir moléculas de cadeia pesada, naturalmente desprovidas de cadeia leve, e tais  $V_{HH}$ s estão dentro do escopo do presente pedido.

[0292] Moléculas de  $V_{HH}$  dos Camelídeos são cerca de 10 vezes menores do que as moléculas de IgG. Elas são polipeptídeos únicos e podem ser muito estáveis, resistindo condições extremas de pH e temperatura. Além disso, elas podem ser resistentes à ação das

proteases, o que não é o caso dos anticorpos convencionais de 4 cadeias. Além disso, a expressão *in vitro* de V<sub>H</sub>H s produz V<sub>H</sub>Hs funcionais de alto rendimento e apropriadamente dobrados. Além disso, os anticorpos gerados em camelídeos podem reconhecer epítomos além daqueles reconhecidos por anticorpos gerados *in vitro* através da utilização de bibliotecas de anticorpos ou através da imunização de outros mamíferos além dos camelídeos (ver, por exemplo, WO9749805). Como tal, CARs multiespecíficos ou multivalentes compreendendo um ou mais domínios V<sub>H</sub>H podem interagir de forma mais eficiente com alvos do que CARs multiespecíficos ou multivalentes compreendendo fragmentos de ligação ao antígeno derivados de anticorpos convencionais de 4 cadeias. Uma vez que V<sub>H</sub>Hs são conhecidos por se ligar a epítomos "incomuns", tais como cavidades ou ranhuras, a afinidade de CARs que compreende tais V<sub>H</sub>Hs podem ser mais adequados para tratamento terapêutico do que polipeptídeos multiespecíficos convencionais.

**[0293]** Em algumas modalidades, o sdAb é derivado de uma região variável da imunoglobulina encontrada em peixes cartilagosos. Por exemplo, o sdAb pode ser derivado do isotipo de imunoglobulina conhecido como Novel Antigen Receptor (NAR) encontrado no soro de tubarão. Métodos de produção de moléculas de domínio único derivadas de uma região variável de NAR ("IgNARs") são descritos em WO 03/014161 e Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909.

**[0294]** Em algumas modalidades, o sdAb é recombinante, enxertado com CDR, humanizado, camelizado, desimunizado e/ou gerado *in vitro* (por exemplo, selecionado por exibição de fago). Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos das regiões de estrutura pode ser alterada por "camelização" de resíduos de aminoácidos específicos nas regiões de estruturais. A camelização refere-se à substituição ou troca de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio (de ocorrência natural) V<sub>H</sub> de um anticorpo convencional de 4 cadeias por um ou mais dos resíduos de aminoácidos que ocorrem na(s) posição(ões) correspondente(s) em um domínio V<sub>H</sub>H de um anticorpo de cadeia pesada. Isto pode ser realizado de uma maneira conhecida per se, que será clara para o versado, por exemplo com base na descrição adicional aqui descrita. Tais substituições de "camelização" são de preferência inseridas nas posições de aminoácidos que se formam e/ou estão presentes na interface V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> e/ou nos chamados resíduos de marca registrada de Camelidae, como aqui definidos (ver, por exemplo, WO

94/04678, Davies e Riechmann FEBS Letters 339:285-290, 1994; Davies and Riechmann Protein Engineering 9 (6):531-537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259:957-969, 1996; e Riechmann and Muyldermans J. Immunol. Meth. 231:25-38, 1999).

**[0295]** Em algumas modalidades, o sdAb é um sdAb humano produzido por camundongos transgênicos ou ratos que expressam segmentos de cadeia pesada humana. Ver, *por exemplo*, US20090307787A1, Patente US 8.754.287, US20150289489A1, US20100122358A1, e WO2004049794. Em algumas modalidades, o sdAb é amadurecido por afinidade.

**[0296]** Em algumas modalidades, os domínios V<sub>H</sub>H de ocorrência natural contra um determinado antígeno ou alvo, podem ser obtidos de bibliotecas (naïves ou imunes) de sequências V<sub>H</sub>H de Camelídeo. Tais métodos podem ou não envolver a varredura de tal biblioteca utilizando o referido antígeno ou alvo, ou pelo menos uma parte, fragmento, determinante antigênico ou epítopo do mesmo utilizando uma ou mais técnicas de varredura conhecidas per se. Tais bibliotecas e técnicas são, por exemplo, descritas em WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 e WO 03/035694. Alternativamente, bibliotecas sintéticas ou semissintéticas melhoradas derivadas de bibliotecas (naïve ou imune) de V<sub>H</sub>H podem ser usadas, tais como bibliotecas V<sub>H</sub>H obtidas de bibliotecas (naïve ou imune) de V<sub>H</sub>H por técnicas tais como mutagênese aleatória e/ou mistura de CDR, como por exemplo descrito em WO 00/43507.

**[0297]** Em algumas modalidades, os sdAbs são gerados a partir de anticorpos convencionais de quatro cadeias. Ver, por exemplo, EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 1989 Oct. 12; 341 (6242):544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; WO 06/030220; e WO 06/003388.

## **2. Antígenos**

**[0298]** O(s) antígeno(s) direcionado(s) pelo(s) CARs do presente pedido são moléculas de superfície celular. As frações de ligação (tal como sdAbs) podem ser escolhidas para reconhecer um antígeno que atua como um marcador de superfície celular em células alvo associadas a um estado de doença especial. Em algumas modalidades, o antígeno (tal como o primeiro antígeno e/ou o segundo antígeno) é um antígeno tumoral. Em algumas modalidades, os CARs multiespecíficos direcionam dois ou mais antígenos tumorais. Em algumas modalidades, o antígeno tumoral está associado a uma doença maligna das células B. Os tumores expressam uma série de proteínas que podem servir como um antígeno alvo



para uma resposta imune, particularmente respostas imunes mediadas por células T. Os antígenos visados pelo CAR podem ser antígenos em uma única célula ou antígenos doentes que são expressos em diferentes células que contribuem para a doença. Os antígenos visados pelo CAR podem estar envolvidos direta ou indiretamente nas doenças.

**[0299]** Os antígenos tumorais são proteínas que são produzidas por células tumorais que podem provocar uma resposta imune, particularmente respostas imunes mediadas por células T. A seleção do antígeno alvo da invenção dependerá do tipo particular de câncer a ser tratado. Antígenos tumorais exemplificativos incluem, por exemplo, um antígeno associado ao glioma, o antígeno carcinoembrionário (CEA), a gonadotropina coriônica humana, a alfafetoproteína (AFP), a AFP reativa à lectina, a tiroglobulina, a RAGE-1, a MN-CAIX, a transcriptase reversa humana de telomerase RU1, RU2 (AS), carboxil esterase intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostase, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostestina, PSMA, HER2/neu, survivina e telomerase, antígeno de tumor de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastase de neutrófilos, ephrinB2, CD22, fator de crescimento de insulina (IGF) -I, IGF-II, receptor de IGF-I e mesotelina.

**[0300]** Em algumas modalidades, o antígeno tumoral compreende um ou mais epítomos de câncer antigênico associados a um tumor maligno. Os tumores malignos expressam uma série de proteínas que podem servir como antígenos alvo para um ataque imune. Estas moléculas incluem, mas não estão limitadas a, antígenos específicos de tecido tais como MART-1, tirosinase e gp100 em melanoma e fosfatase de ácido prostático (PAP) e antígeno prostático específico (PSA) em câncer de próstata. Outras moléculas alvo pertencem ao grupo de moléculas relacionadas à transformação, como o oncogene HER2/Neu/ErbB-2. Ainda outro grupo de antígenos alvo são antígenos oncofetais, tais como antígeno carcinoembrionário (CEA). No linfoma de células B, a imunoglobulina idiotípica específica do tumor constitui um antígeno de imunoglobulina verdadeiramente específico do tumor que é exclusivo do tumor individual. Os antígenos de diferenciação de células B, tais como CD19, CD20 e CD37 são outros candidatos para antígenos alvo em linfoma de células B.

**[0301]** Em algumas modalidades, o antígeno tumoral é um antígeno específico do tumor (TSA) ou um antígeno associado ao tumor (TAA). Um TSA é exclusivo das células tumorais e não ocorre em outras células do corpo. Um antígeno associado com TAA não é

exclusivo de uma célula tumoral e, em vez disso, também é expresso em uma célula normal em condições que não conseguem induzir um estado de tolerância imunológica ao antígeno. A expressão do antígeno no tumor pode ocorrer em condições que permitam ao sistema imunológico responder ao antígeno. Os TAAs podem ser antígenos que são expressos em células normais durante o desenvolvimento fetal, quando o sistema imunológico é imaturo e incapaz de responder ou podem ser antígenos que normalmente estão presentes em níveis extremamente baixos em células normais, mas que são expressos em níveis muito mais altos em células tumorais.

**[0302]** Outros exemplos não limitativos dos antígenos TSA ou TAA incluem o seguinte: Antígenos de diferenciação, tais como MART-1/MelanA (MART-I), gp 100 (Pmel 17), tirosinase, TRP-1, TRP-2 e antígenos de multilínea específica de tumor, tais como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE -1, GAGE-2, p15; antígenos embrionários sobre-expressos, como CEA; oncógenos sobre-expressos e genes supressores de tumores mutados, tais como p53, Ras, HER2/neu; antígenos tumorais únicos resultantes de translocações cromossômicas; como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL- RAR; e antígenos virais, como os antígenos do vírus Epstein Barr EBVA e os antígenos E6 e E7 do vírus do papilomavírus humano (HPV). Outros antígenos grandes baseados em proteínas incluem TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23HI, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17. 1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27. 29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO- 1, RCAS 1,SDCCAG16, proteína de ligação TA-90\Mac-2\proteína associada à ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP e TPS.

**[0303]** Em algumas modalidades, o antígeno (tal como o primeiro antígeno e/ou o segundo antígeno) é selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 MAGE A3 e glicolípido F77.

### **3. Ligantes peptídicos**

**[0304]** As várias frações de ligação (tais como sdAbs) nos CARs multiespecíficos ou multivalentes aqui descritos podem ser fundidas entre si através de ligantes peptídicos. Em algumas modalidades, as frações de ligação (tais como sdAbs) são diretamente fundidas

entre si sem quaisquer ligantes peptídicos. Os ligantes peptídicos que ligam diferentes frações de ligação (como os sdAbs) podem ser iguais ou diferentes. Diferentes domínios dos CARs também podem ser fundidos um com o outro através de ligantes peptídicos.

**[0305]** Cada ligante peptídico em um CAR pode ter comprimento e/ou sequência iguais ou diferentes dependendo das características estruturais e/ou funcionais dos sdAbs e/ou de vários domínios. Cada ligante peptídico pode ser selecionado e otimizado de forma independente. O comprimento, o grau de flexibilidade e/ou outras propriedades do(s) ligante(s) peptídico(s) utilizado(s) nos CARs podem ter alguma influência nas propriedades, incluindo, mas não limitado à afinidade, especificidade ou avidéz para um ou mais antígenos ou epítomos particulares. Por exemplo, os ligantes peptídicos mais longos podem ser selecionados para garantir que dois domínios adjacentes não interfiram estericamente entre si. Por exemplo, num CAR multivalente ou multiespecífico do presente pedido que compreende sdAbs dirigidos contra um antígeno multimérico, o comprimento e a flexibilidade dos ligantes peptídicos são de preferência tais que permitem que cada sdAb no CAR multivalente se ligue ao determinante antigênico em cada uma das subunidades do multímero. Em algumas modalidades, um ligante peptídico curto pode estar disposto entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular de um CAR. Em alguma modalidades, um ligante peptídico compreende resíduos flexíveis (tais como glicina e serina) de modo que os domínios adjacentes sejam livres para se mover em relação um ao outro. Por exemplo, um duplete de glicina-serina pode ser um ligante peptídico adequado.

**[0306]** O ligante peptídico pode ser de qualquer comprimento adequado. Em algumas modalidades, o ligante peptídico tem pelo menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 ou mais aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante peptídico não tem mais que qualquer um de 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 ou menos aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o comprimento do ligante peptídico é de cerca de 1 aminoácido a cerca de 10 aminoácidos, cerca de 1 aminoácido a cerca de 20 aminoácidos, cerca de 1 aminoácido a cerca de 30 aminoácidos, cerca de 5 aminoácidos a cerca de 15 aminoácidos, cerca de 10 aminoácidos a cerca de 25 aminoácidos, cerca de 5 aminoácidos a cerca de 30 aminoácidos, cerca de 10 aminoácidos a cerca de 30 aminoácidos de comprimento, cerca de 30 aminoácidos a cerca de 50

aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos a cerca de 100 aminoácidos, ou cerca de 1 aminoácido a cerca de 100 aminoácidos.

**[0307]** O ligante peptídico pode ter uma sequência de ocorrência natural, ou uma sequência de ocorrência não natural. Por exemplo, uma sequência derivada da região de dobradiça de anticorpos de cadeia pesada apenas pode ser utilizada como o ligante. *Ver*, por exemplo, WO1996/34103. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é um ligante flexível. Os ligantes flexíveis exemplificativos incluem polímeros de glicina (G)<sub>n</sub>, polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub>, (GGGS)<sub>n</sub>, e (GGGGS)<sub>n</sub>, onde n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina e outros ligantes flexíveis conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende a sequência de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO:208), (GGGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:209), (GGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:210), GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGS (SEQ ID NO:211), GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:212), (GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:213), (GGGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:214), ou (GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:215).

#### **Domínio transmembranar**

**[0308]** Os CARs do presente pedido compreendem um domínio transmembranar que pode ser direta ou indiretamente fundido com o domínio de ligação do antígeno extracelular. O domínio transmembranar pode ser derivado de uma fonte natural ou de uma fonte sintética. Tal como aqui utilizado, um "domínio transmembranar" refere-se a qualquer estrutura proteica que seja termodinamicamente estável numa membrana celular, de preferência uma membrana celular eucariótica. Os domínios transmembranares compatíveis para uso nos CARs aqui descritos podem ser obtidos a partir de uma proteína natural. Alternativamente, pode ser um segmento proteico sintético, de ocorrência não natural, *por exemplo*, um segmento de proteína hidrofóbica que é termodinamicamente estável em uma membrana celular.

**[0309]** Os domínios transmembranares são classificados com base na estrutura tridimensional do domínio transmembranar. Por exemplo, os domínios transmembranares podem formar uma hélice alfa, um complexo de mais de uma hélice alfa, um barril beta ou qualquer outra estrutura estável capaz de abranger a bicamada de fosfolipídeos de uma célula. Além disso, os domínios transmembranares também podem ou ser classificados de acordo com a topologia do domínio transmembranar, incluindo o número de passagens que

o domínio transmembranar faz através da membrana e a orientação da proteína. Por exemplo, as proteínas de membrana de passagem única atravessam a membrana celular uma vez, e as proteínas de membrana de passagem múltipla passam pela membrana celular pelo menos duas vezes (*por exemplo*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais vezes). As proteínas da membrana podem ser definidas como Tipo I, Tipo II ou Tipo III dependendo da topologia de seus terminais e segmento(s) de passagem de membrana relativo ao interior e ao exterior da célula. As proteínas de membrana de tipo I têm uma única região de expansão da membrana e estão orientadas de tal forma que o N-terminal da proteína está presente no lado extracelular da bicamada lipídica da célula e o C-terminal da proteína está presente no lado citoplasmático, As proteínas de membrana de tipo II também possuem uma única região de expansão da membrana, mas são orientadas de modo que o C-terminal da proteína esteja presente no lado extracelular da bicamada lipídica da célula e o N-terminal da proteína esteja presente no lado citoplasmático. As proteínas de membrana de tipo III possuem vários segmentos que abrangem a membrana e podem ser subsequentemente subclassificadas com base no número de segmentos transmembranares e na localização dos terminais N- e C.

**[0310]** Em algumas modalidades, o domínio transmembranar do CAR descrito aqui é derivado de uma proteína de membrana de passagem única tipo I. Em algumas modalidades, domínios transmembranares de proteínas de membrana de passagem múltipla também podem ser compatíveis para utilização nos CARs aqui descritos. As proteínas de membrana de passagem múltipla podem compreender um complexo de (pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais) hélices alfa ou uma estrutura de folha beta. De preferência, o N-terminal e o C-terminal de uma proteína de membrana de passagem múltipla estão presentes em lados opostos da bicamada lipídica, *por exemplo*, o N-terminal da proteína está presente no lado citoplasmático da bicamada lipídica e o C-terminal da proteína está presente no lado extracelular.

**[0311]** Em algumas modalidades, o domínio transmembranar do CAR compreende um domínio transmembranar escolhido a partir do domínio transmembranar de uma cadeia alfa, beta ou zeta de um receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFl), CD160, CD19, IL-

2R beta, IL-2R gama, IL-7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD110 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, e/ou NKG2C. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é derivado de uma molécula selecionada do grupo que consiste em CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1.

**[0312]** Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é derivado de CD28. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de CD28 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:194. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar de CD28 é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:203.

**[0313]** Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é derivado de CD8 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de CD8 $\alpha$  compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:193. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar de CD8 $\alpha$  é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:202.

**[0314]** Os domínios transmembranares para uso nos CARs aqui descritos pode também compreender pelo menos uma porção de um segmento proteico sintético, de ocorrência não natural. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é uma hélice alfa sintética, de ocorrência não natural ou uma folha beta. Em algumas modalidades, o segmento de proteína é pelo menos aproximadamente 20 aminoácidos, *por exemplo*, pelo menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais aminoácidos. Exemplos de domínios transmembranares sintéticos são conhecidos na técnica, por exemplo na Patente US 7.052.906 B1 e Publicação PCT WO 2000/032776 A2, cujas divulgações relevantes são aqui incorporadas por referência.

**[0315]** O domínio transmembranar pode compreender uma região transmembranar e uma região citoplasmática localizada no lado C-terminal do domínio transmembranar. A região citoplasmática do domínio transmembranar pode compreender três ou mais aminoácidos e, em algumas modalidades ajuda a orientar o domínio transmembranar na bicamada lipídica.

Em algumas modalidades, um ou mais resíduos de cisteína estão presentes na região transmembranar do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, um ou mais resíduos de cisteína estão presentes na região citoplasmática do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, a região citoplasmática do domínio transmembranar compreende aminoácidos carregados positivamente. Em algumas modalidades, a região citoplasmática do domínio transmembranar compreende os aminoácidos arginina, serina e lisina.

**[0316]** Em algumas modalidades, a região transmembranar do domínio transmembranar compreende resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Nas modalidades preferenciais, o domínio transmembranar do CAR compreende uma sequência artificial hidrofóbica. Por exemplo, um triplete de fenilalanina, triptofano e valina podem estar presentes no C-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, a região transmembranar compreende principalmente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tais como alanina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano ou valina. Em algumas modalidades, a região transmembranar é hidrofóbica. Em algumas modalidades, a região transmembranar compreende uma sequência de poli-leucina-alanina. A hidropatia, ou características hidrofóbicas ou hidrofílicas de um segmento de proteína ou proteína, podem ser avaliadas por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, a análise da hidropatia Kyte e Doolittle

#### **Domínio de sinalização intracelular**

**[0317]** Os CARs do presente pedido compreendem um domínio de sinalização intracelular. O domínio de sinalização intracelular é responsável pela ativação de pelo menos uma das funções efêmeras normais da célula efetora imune expressando os CARs. O termo "função efetora" refere-se a uma função especializada de uma célula. A função efetora de uma célula T, por exemplo, pode ser atividade citolítica ou atividade auxiliar incluindo a secreção de citocinas. Assim, o termo "domínio de sinalização citoplasmática" refere-se à porção de uma proteína que transduz o sinal da função efetora e direciona a célula para realizar uma função especializada. Embora geralmente todo o domínio de sinalização citoplasmática possa ser empregado, em muitos casos não é necessário usar toda a cadeia. Na medida em que uma porção truncada do domínio de sinalização citoplasmática é usada, tal porção truncada pode ser usada no lugar da cadeia intacta, desde que transduza o sinal da função efetora. Por conseguinte, o termo domínio de sinalização



citoplasmática significa que inclui qualquer porção truncada do domínio de sinalização citoplasmática suficiente para transduzir o sinal da função efetora.

**[0318]** Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune. Em algumas modalidades, o CAR compreende um domínio de sinalização intracelular consistindo essencialmente num domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune. "Domínio de sinalização intracelular primário" refere-se à sequência de sinalização citoplasmática que atua de maneira estimulante para induzir funções efectoras imunes. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário contém um motivo de sinalização conhecido como motivo de ativação baseado em tirosina de imunorreceptor ou ITAM. Um "ITAM", tal como aqui utilizado, é um motivo de proteína conservada que está geralmente presente na porção de cauda de moléculas de sinalização expressas em muitas células imunes. O motivo pode compreender duas repetições da sequência de aminoácidos YxxL/I separadas por 6-8 aminoácidos, em que cada x é independentemente qualquer aminoácido, produzindo o motivo conservado YxxL/Ix (6-8) YxxL/I. ITAMs dentro de moléculas de sinalização são importantes para a transdução de sinal dentro da célula, que é mediada pelo menos em parte pela fosforilação de resíduos de tirosina no ITAM após a ativação da molécula de sinalização. Os ITAMs também podem funcionar como sítios de encaixe para outras proteínas envolvidas nas vias de sinalização. Sequências de sinalização citoplasmática primária exemplificativas contendo ITAM incluem as derivadas de CD3 $\zeta$ , FcR gama (FCER1G), FcR beta (Fc Epsilon Rib), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d.

**[0319]** Em algumas modalidades, o domínio primário de sinalização intracelular é derivado de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular consiste no domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é um domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\zeta$  de tipo selvagem. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário de CD3 $\zeta$  de tipo selvagem compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:197. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é um mutante funcional do domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\zeta$  contendo uma ou mais mutações, como Q65K. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário do CD3 $\zeta$  mutante compreende a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO:198. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:206 ou 207.

### **Domínio de sinalização coestimulador**

[0320] Muitas células efectoras imunes requerem coestimulação, além da estimulação de um sinal específico do antígeno, para promover a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além de ativar funções efectoras da célula. Em algumas modalidades, o CAR compreende pelo menos um domínio de sinalização coestimulador. O termo "domínio de sinalização coestimulador", tal como aqui utilizado, refere-se a pelo menos uma porção de uma proteína que medeia a transdução de sinal dentro de uma célula para induzir uma resposta imune, tal como uma função efetora. O domínio de sinalização coestimulador do receptor quimérico aqui descrito pode ser um domínio de sinalização citoplasmática a partir de uma proteína coestimuladora, que transduz um sinal e modula respostas mediadas por células imunes, tais como células T, células NK, macrófagos, neutrófilos ou eosinófilos. "Domínio de sinalização coestimulador" pode ser a porção citoplasmática de uma molécula coestimuladora. O termo "molécula coestimuladora" refere-se a um parceiro de ligação cognato numa célula imune (tal como célula T) que se liga especificamente com um ligando coestimulador, mediando assim uma resposta coestimuladora pela célula imune, tal como, mas não limitado a, proliferação e sobrevivência.

[0321] Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um único domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende dois ou mais domínios de sinalização coestimuladores (como, por exemplo, qualquer um de 2, 3, 4 ou mais). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende dois ou mais dos mesmos domínios de sinalização coestimuladores, por exemplo, duas cópias do domínio de sinalização coestimulador de CD28. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende dois ou mais domínios de sinalização coestimuladores de diferentes proteínas coestimuladoras, tais como quaisquer duas ou mais proteínas coestimuladoras aqui descritas. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário (como o domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\zeta$ ) e um ou mais domínios de sinalização coestimuladores. Em algumas modalidades, o um ou mais domínios de sinalização coestimuladores e o domínio

de sinalização intracelular primário (tal como domínio de sinalização citoplasmático de CD3 $\Gamma$ ) são fundidos entre si através de ligantes peptídicos opcionais. O domínio de sinalização intracelular primário, e um ou mais domínios de sinalização coestimuladores podem ser organizados em qualquer ordem adequada. Em algumas modalidades, um ou mais domínios de sinalização coestimuladores estão localizados entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular primário (como o domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\Gamma$ ). Múltiplos domínios de sinalização coestimuladores podem proporcionar efeitos estimuladores aditivos ou sinérgicos.

**[0322]** A ativação de um domínio de sinalização coestimulador em uma célula hospedeira (*por exemplo*, uma célula imune) pode induzir a célula a aumentar ou diminuir a produção e secreção de citocinas, propriedades fagocíticas, proliferação, diferenciação, sobrevivência e/ou citotoxicidade. O domínio de sinalização coestimulador de qualquer molécula coestimuladora pode ser compatível para uso nos CARs aqui descritos. O(s) tipo(s) de domínio de sinalização coestimulador é selecionado com base em fatores como o tipo de células efetoras imunes em que as moléculas efetoras seriam expressas (*por exemplo*, células T, células NK, macrófagos, neutrófilos ou eosinófilos) e a função efetora imune desejada (*por exemplo*, efeito ADCC). Exemplos de domínios de sinalização coestimuladores para uso nos CARs podem ser o domínio de sinalização citoplasmática de proteínas coestimuladores, incluindo, sem limitação, membros da família B7/CD28 (*por exemplo*, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, e PDCD6); membros da superfamília do TNF (*por exemplo*, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB Ligando/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 Ligando/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 Ligando/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 Ligando/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR Ligando/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, Linfotóxina- $\alpha$ /TNF- $\beta$ , OX40/TNFRSF4, OX40 Ligando/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF- $\alpha$ , e TNF RII/TNFRSF1B); membros da família SLAM (*por exemplo*, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, e SLAM/CD150); e quaisquer outras moléculas coestimuladoras, como CD2, CD7, CD53,

CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA Classe I, HLA-DR, Ikaros, Integrina alfa 4/CD49d, Integrina alfa 4 beta 1, Integrina alfa 4 beta 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, Dectina-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1), e NKG2C.

**[0323]** Em algumas modalidades, o um ou mais domínios de sinalização coestimuladores são selecionados do grupo que consiste em CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, CD3, antígeno 1 associado à função de linfócitos (LFA-1), CD2, CD7, LUZ, NKG2C, B7- H3 e ligandos que se ligam especialmente ao CD83.

**[0324]** Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular no CAR do presente pedido compreende um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD28. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\Gamma$  e um domínio de sinalização coestimulador de CD28. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador de CD28 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:195. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador de CD28 é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:204. **[0325]** Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular no CAR do presente pedido compreende um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 (*i. e.*, 4-1BB). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\Gamma$  e um domínio de sinalização coestimulador de CD137. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador de CD137 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:196. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador de CD137 é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:205.

**[0326]** Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular no CAR do presente pedido compreende um domínio de sinalização coestimulador de CD28 e um domínio de sinalização coestimulador de CD137. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\Gamma$  um domínio de sinalização coestimulador de CD28 e um domínio de sinalização coestimulador de CD137. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular

compreende um polipeptídeo compreendendo do N-terminal ao C-terminal: um domínio de sinalização coestimulador de CD28, um domínio de sinalização coestimulador de CD137 e um domínio de sinalização citoplasmática de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador de CD28 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:195. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador de CD137 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:196.

**[0327]** Também dentro do âmbito da presente divulgação estão variantes de qualquer dos domínios de sinalização coestimuladores aqui descritos, de modo que o domínio de sinalização coestimulador seja capaz de modular a resposta imune da célula imune. Em algumas modalidades, os domínios de sinalização coestimuladores compreendem até 10 variações de resíduos de aminoácidos (*por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5 ou 8) em comparação com uma contraparte do tipo selvagem. Tais domínios de sinalização coestimuladores compreendendo uma ou mais variações de aminoácidos podem ser referidos como variantes. A mutação de resíduos de aminoácidos do domínio de sinalização coestimulador pode resultar em um aumento na transdução de sinalização e estimulação reforçada de respostas imunes em relação aos domínios de sinalização coestimuladores que não compreendem a mutação. A mutação de resíduos de aminoácidos do domínio de sinalização coestimulador pode resultar em uma diminuição na transdução de sinalização e estimulação reduzida de respostas imunes em relação aos domínios de sinalização coestimuladores que não compreendem a mutação.

### **Região de dobradiça**

**[0328]** Os CARs do presente pedido podem compreender um domínio de dobradiça que está localizado entre o domínio de ligação ao antígeno extracelular e o domínio transmembranar. Um domínio de dobradiça é um segmento de aminoácido que é geralmente encontrado entre dois domínios de uma proteína e pode permitir a flexibilidade da proteína e o movimento de um ou ambos os domínios um em relação ao outro. É possível usar qualquer sequência de aminoácidos que forneça tal flexibilidade e movimento do domínio de ligação ao antígeno extracelular em relação ao domínio transmembranar da molécula efetora.

**[0329]** O domínio de dobradiça pode conter cerca de 10-100 aminoácidos, *por exemplo*, cerca de qualquer um de 15-75 aminoácidos, 20-50 aminoácidos ou 30-60 aminoácidos. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça pode ter pelo menos cerca de qualquer

um de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ou 75 aminoácidos de comprimento.

**[0330]** Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é um domínio de dobradiça de uma proteína natural. Os domínios de dobradiça de qualquer proteína conhecida na técnica por compreender um domínio de dobradiça são compatíveis para utilização nos receptores quiméricos aqui descritos. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça de uma proteína natural e confere flexibilidade ao receptor quimérico. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é derivado do CD8 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é uma porção do domínio de dobradiça de CD8 $\alpha$ , *por exemplo*, um fragmento contendo pelo menos 15 (*por exemplo*, 20, 25, 30, 35 ou 40) aminoácidos consecutivos do domínio de dobradiça de CD8 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça de CD8 $\alpha$  compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:192. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça de CD8 $\alpha$  é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:201.

**[0331]** Os domínios de dobradiça de anticorpos, tais como anticorpos IgG, IgA, IgM, IgE ou IgD, também são compatíveis para utilização nos sistemas de receptor quiméricos dependentes do pH aqui descritos. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é o domínio de dobradiça que une os domínios constantes CH1 e CH2 de um anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça é de um anticorpo e compreende o domínio de dobradiça do anticorpo e uma ou mais regiões constantes do anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de dobradiça compreende o domínio de dobradiça de um anticorpo e a região constante de CH3 do anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio da dobradiça compreende o domínio de dobradiça de um anticorpo e as regiões constantes CH2 e CH3 do anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG, IgA, IgM, IgE ou IgD. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em algumas modalidades, a região de dobradiça compreende a região de dobradiça e as regiões constantes de CH2 e CH3 de um anticorpo IgG1. Em algumas modalidades, a região de dobradiça compreende a região de dobradiça e a região constante de CH3 de um anticorpo IgG1.

**[0332]** Os peptídeos não naturais podem também ser utilizados como domínios de dobradiça para os receptores quiméricos aqui descritos. Em algumas modalidades, o



domínio de dobradiça entre o C-terminal do domínio de ligação do ligando extracelular de um receptor Fc e o N-terminal do domínio transmembranar é um ligante peptídico, tal como um ligante (GxS)<sub>n</sub>, em que x e n, independentemente podem ser um número inteiro entre 3 e 12, incluindo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou mais.

#### **Peptídeo de sinal**

[0333] Os CARs do presente pedido podem compreender um peptídeo de sinal (também conhecido como uma sequência de sinal) no N-terminal do polipeptídeo. Em geral, os peptídeos de sinal são sequências peptídicas que direcionam um polipeptídeo para o local desejado numa célula. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal direciona a molécula efetora para o caminho secretor da célula e permitirá a integração e a ancoragem da molécula efetora na bicamada lipídica. Os peptídeos sinal incluindo sequências sinal de proteínas de ocorrência natural ou sequências sinal sintéticas de ocorrência não natural, que são compatíveis para uso nos CARs aqui descritos serão evidentes para um versado na técnica. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal é derivado de uma molécula selecionada do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , receptor GM-CSF $\alpha$ , e cadeia pesada de IgG1. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é derivado de CD8 $\alpha$ . Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal de CD8 $\alpha$  compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:191. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal de CD8 $\alpha$  é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:199 ou 200.

#### **IV. Células efectoras imunes engenheiradas**

[0334] Além disso, são proporcionadas no presente pedido células hospedeiras (tais como células efectoras imunes) compreendendo qualquer um dos CARs aqui descritos.

[0335] Assim, em algumas modalidades, é proporcionada uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA que se liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação ao BMCA que se liga especificamente a um segundo epítipo de BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes.

[0336] Em algumas modalidades, é proporcionada uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente compreendendo



um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA que se liga especificamente a um primeiro epítopo de BCMA, e um segundo sdAb anti-BCMA que se liga especificamente a um segundo epítopo de BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítopo e o segundo epítopo são diferentes. Em algumas modalidades, o primeiro sdAb anti-BCMA e/ou o segundo sdAb anti-BCMA é de caméleão, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o primeiro anti-BCMA e o segundo anti-BCMA são fundidos um com o outro via uma ligação peptídica ou um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o ligante peptídico não tem mais que cerca de 50 (tal como não mais que qualquer um de 35, 25, 20, 15, 10 ou 5) aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é selecionado do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é derivado de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR multivalente também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR multivalente compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\zeta$ . Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é uma célula T, uma célula NK, uma célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma célula-tronco hematopoiética, uma célula-tronco pluripotente ou uma célula-tronco embrionária. Em

algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é autóloga. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é alogênica.

**[0337]** Em algumas modalidades, é proporcionada uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR BCMA compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o sdAb anti-BCMA compreende qualquer um dos seguintes:(1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:77; (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:78; (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:79; (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:80; (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:81; (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:82; (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:83; (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84; (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:85; (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10;

uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:86; (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:87; (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:88; (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:89; (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:52; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:90; (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:91; (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:92; (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:93; (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:94; (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:95; (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:96; (21) uma CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:97; (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:98; (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:99; (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100; (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:101; (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:102; (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:103; (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:104; (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:105; (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:106; (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:69; e uma CDR3

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:107; (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:108; (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:109; (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:110; (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:111; (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:112; (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113; or (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:114. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno extracelular compreende pelo menos dois sdAbs anti- BCMA. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é de camélídeo, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:115-152. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune (tal como célula T). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário é derivado de CD3 $\Gamma$ . Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular primário compreende um domínio de sinalização coestimulador. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma

molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o CAR BCMA também compreende um domínio de dobradiça (tal como um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ ) localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o CAR BCMA compreende ainda um peptídeo de sinal (tal como um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ ) localizado no N-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal : um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD28, um primeiro domínio de sinalização coestimulador derivado de CD28, um segundo domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\zeta$  . Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal: um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ , o domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD8 $\alpha$ , um domínio de sinalização coestimulador derivado de CD137 e um domínio de sinalização intracelular primário derivado de CD3 $\zeta$  . Em algumas modalidades, o CAR BCMA compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:216-256, 298-335. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é uma célula T, uma célula NK, uma célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma célula-tronco hematopoiética, uma célula-tronco pluripotente ou uma célula-tronco embrionária. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é autóloga. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é alogênica.

**[0338]** Também são proporcionadas células efetoras imunes engenheiradas compreendendo (ou expressando) dois ou mais CARs diferentes. Qualquer dois ou mais CARs aqui descritos podem ser expressos em combinação. Os CARs podem direcionar diferentes antígenos, proporcionando assim efeitos sinérgicos ou aditivos. Como os anticorpos de domínio único nos domínios de ligação ao antígeno extracelular dos CARs possuem apenas cadeias variáveis de antígeno único (como cadeias pesadas), essas células que expressam CAR não apresentam problemas de pareamento errado de cadeia variável, como visto em células efetoras imunes engenheiradas coexpressando dois ou mais CARs baseados em scFv. Células efetoras imunes engenheiradas exemplificativas que



coexpressam dois CARs baseados em VHH estão ilustradas na FIG. 15E. Um versado na técnica reconheceria que CARs baseados outros sdAbs ou que possuam outras estruturas, como aqui descritos, podem também ser coexpressados nas células efetoras imunes engenheiradas. Os dois ou mais CARs podem ser codificados no mesmo vetor ou vetores diferentes.

**[0339]** A célula efetora imune engenheirada pode ainda expressar uma ou mais proteínas terapêuticas e/ou imunomoduladoras, tais como inibidores do ponto de controle imune. Ver, por exemplo, os Pedidos de Patente Internacional PCT/CN2016/073489 e PCT/CN2016/087855, que são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

### **Vetores**

**[0340]** O presente pedido proporciona vetores para clonar e expressar qualquer um dos CARs aqui descritos. Em algumas modalidades, o vetor é adequado para replicação e integração em células eucarióticas, como células de mamífero. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor viral. Exemplos de vetores virais incluem, mas não estão limitados a, vetores adenovirais, vetores de vírus adeno-associados, vetor lentiviral, vetores retrovirais, vetor de vaccínia, vetor viral de herpes simplex e derivados dos mesmos. A tecnologia do vetor viral é bem conhecida na técnica e é descrita, por exemplo, em Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), e em outros manuais de virologia e biologia molecular.

**[0341]** Foram desenvolvidos vários sistemas baseados em vírus para transferência de genes em células de mamíferos. Por exemplo, os retrovírus proporcionam uma plataforma conveniente para sistemas de distribuição de genes. O ácido nucleico heterólogo pode ser inserido num vetor e empacotado em partículas retrovirais utilizando técnicas conhecidas na técnica. O vírus recombinante pode então ser isolado e distribuído à célula de mamífero engenheirada *in vitro* ou *ex vivo*. Uma série de sistemas retrovirais são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, são utilizados vetores de adenovírus. Uma série de vetores de adenovírus são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, são utilizados vetores de lentivírus. Em algumas modalidades, são utilizados vetores lentivirais autoinativadores. Por exemplo, os vetores lentivirais autoinativadores que transportam a sequência de codificação do imunomodulador (tal como o inibidor do ponto de controle imunológico) e/ou vetores lentivirais autoinativadores que transportam CARs podem ser empacotados com protocolos conhecidos na técnica. Os vetores lentivirais resultantes



podem ser utilizados para transduzir uma célula de mamífero (tal como células T humanas primárias) utilizando métodos conhecidos na técnica. Os vetores derivados de retrovírus, como os lentivírus, são ferramentas adequadas para obter uma transferência genética de longo prazo, porque permitem a integração estável de longo prazo de um transgene e sua propagação em células progênicas. Os vetores lentivirais também possuem pouca imunogenicidade e podem transduzir células não proliferantes.

**[0342]** Em algumas modalidades, o vetor é um vetor não viral. Em algumas modalidades, o vetor é um transposon, tal como um sistema de transposon de Sleeping Beauty (SB), ou um sistema de transposon PiggyBac. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor não viral baseado em polímero, incluindo, por exemplo, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e ácido poli láctico (PLA), poli(etileno imina) (PEI) e dendrímeros. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor não viral baseado em lipídeos catiônicos, tal como lipossoma catiônico, nanoemulsão lipídica e nanopartícula lipídica sólida (SLN). Em algumas modalidades, o vetor é um vetor não viral de gene baseado em peptídeo, tal como poli-L-lisina. Qualquer um dos vetores não virais conhecidos adequados para a edição do genoma pode ser utilizado para introduzir os ácidos nucleicos que codificam CAR nas células efectoras imunes engenheiradas. Ver, por exemplo, Yin H. et al. *Nature Rev. Genetics* (2014) 15:521-555; Aronovich EL et al. “The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy.” *Hum. Mol. Genet.* (2011) R1:R14-20; e Zhao S. et al. “PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing.” *Transl. Lung Cancer Res.* (2016) 5(1):120-125, que são aqui incorporados por referência. Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos ácidos nucleicos que codificam um CAR é introduzido nas células efectoras imunes engenheiradas por um método físico, incluindo, mas não limitado a eletroporação, sonoporação, fotoporação, magnetofecção, hidroporação.

**[0343]** Em algumas modalidades, o vetor compreende qualquer um dos ácidos nucleicos que codificam um CAR descrito aqui. O ácido nucleico pode ser clonado no vetor utilizando quaisquer métodos de clonagem molecular conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, utilizar sítios de endonuclease de restrição e um ou mais marcadores selecionáveis. Em algumas modalidades, o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor. As variedades de promotores foram exploradas para a expressão de genes em células de mamíferos e qualquer dos promotores conhecidos na técnica pode ser

utilizado na presente invenção. Os promotores podem ser categorizados como promotores constitutivos ou promotores regulados, como promotores indutíveis.

**[0344]** Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o CAR é operacionalmente ligado a um promotor constitutivo. Os promotores constitutivos permitem que os genes heterólogos (também referidos como transgenes) sejam expressos constitutivamente nas células hospedeiras. Os promotores constitutivos exemplificativos aqui contemplados incluem, mas não estão limitados a, promotores de citomegalovírus (CMV), fatores de alongamento humano-1alfa (hEF1a), promotor de ubiquitina C (UbiC), promotor de fosfoglicerinase (PGK), promotor precoce de vírus simiano 40 (SV40) e promotor de  $\beta$ -Actina de frango juntamente com o potenciador precoce de CMV (CAGG). As eficiências de tais promotores constitutivos sobre a condução da expressão do transgene foram amplamente comparadas em um grande número de estudos. Por exemplo, Michael C. Milone *et al* compararam as eficiências de CMV, hEF1 $\alpha$ , UbiC e PGK para impulsionar a expressão de CAR em células T primárias humanas e concluíram que o promotor de HEF1 $\alpha$  não só induziu o maior nível de expressão do transgene, mas também foi mantido de forma otimizada nas células T humanas CD4 e CD8 (Molecular Therapy, 17(8):1453-1464 (2009)). Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o CAR é operacionalmente ligado a um promotor hEF1 $\alpha$ .

**[0345]** Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o CAR é operacionalmente ligado a um promotor induzível. Os promotores induzíveis pertencem à categoria de promotores regulados. O promotor induzível pode ser induzido por uma ou mais condições, como uma condição física, microambiente da célula efetora imune engenheirada ou o estado fisiológico da célula efetora imune engenheirada, um indutor (*i. e.*, um agente indutor), ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a condição de indução não induz a expressão de genes endógenos na célula de mamífero engenheirada e/ou no sujeito que recebe a composição farmacêutica. Em algumas modalidades, a condição de indução é selecionada do grupo que consiste em: indutor, irradiação (como radiação ionizante, luz), temperatura (como calor), estado redox, ambiente tumoral e o estado de ativação da célula de mamífero engenheirada.

**[0346]** Em algumas modalidades, o vetor também contém um gene marcador selecionável ou um gene repórter para selecionar células que expressam o CAR a partir da população de células hospedeiras transfectadas através de vetores lentivirais. Ambos os

marcadores selecionáveis e os genes repórter podem ser encadernados por sequências reguladoras adequadas para permitir a expressão nas células hospedeiras. Por exemplo, o vetor pode conter terminadores de transcrição e tradução, sequências de iniciação e promotores úteis para a regulação da expressão das sequências de ácido nucleico.

**[0347]** Em algumas modalidades, o vetor compreende mais do que um ácido nucleico que codifica CARs. Em algumas modalidades, o vetor compreende um ácido nucleico compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico que codifica um primeiro CAR e uma segunda sequência de ácido nucleico que codifica um segundo CAR, em que o primeiro ácido nucleico está operacionalmente ligado ao segundo ácido nucleico através de uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um peptídeo autoclivante. Em algumas modalidades, o peptídeo autoclivante é selecionado do grupo que consiste em T2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, o peptídeo T2A tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:385.

### **Células efectoras imunes**

**[0348]** "Células efectoras imunes" são células imunes que podem desempenhar funções efectoras imunes. Em algumas modalidades, as células efectoras imunes expressam pelo menos FcγRIII e desempenham a função efectora ADCC. Exemplos de células efectoras imunes que medeiam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas, neutrófilos e eosinófilos.

**[0349]** Em algumas modalidades, as células efectoras imunes são células T. Em algumas modalidades, as células T são CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, ou combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, as células T produzem IL-2, TFN, e/ou TNF ao expressar o CAR e a ligação às células alvo, tais como células tumorais CD20+ ou CD19+. Em algumas modalidades, as células T CD8+ lisam as células alvo específicas do antígeno ao expressar o CAR e a ligação às células alvo.

**[0350]** Em algumas modalidades, as células efectoras imunes são células NK. Em outras modalidades, as células efectoras imunes podem ser estabelecidas linhagens celulares, por exemplo, células NK-92.

**[0351]** Em algumas modalidades, as células efectoras imunes são diferenciadas de uma célula-tronco, como uma célula-tronco hematopoiética, uma célula-tronco pluripotente, uma iPS ou uma célula-tronco embrionária.

[0352] As células efectoras imunes engenheiradas são preparadas pela introdução dos CARs nas células efectoras imunes, como células T. Em algumas modalidades, o CAR é introduzido nas células efectoras imunes através da transfecção de qualquer um dos ácidos nucleicos isolados ou qualquer um dos vetores descritos na Seção III. Em algumas modalidades, o CAR é introduzido nas células efectoras imunes inserindo proteínas na membrana celular ao passar células através de um sistema microfluídico, como CELL SQUEEZE<sup>®</sup> (*ver*, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente US 20140287509).

[0353] Os métodos de introdução de vetores ou ácidos nucleicos isolados numa célula de mamífero são conhecidos na técnica. Os vetores descritos podem ser transferidos para uma célula efectora imune por métodos físicos, químicos ou biológicos.

[0354] Os métodos físicos para a introdução do vetor em uma célula efectora imune incluem precipitação de fosfato de cálcio, lipofecção, bombardeamento de partículas, microinjeção, eletroporação e semelhantes. Os métodos para produzir células compreendendo vetores e/ou ácidos nucleicos exógenos são bem conhecidos na técnica. *Ver*, por exemplo, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Em algumas modalidades, o vetor é introduzido na célula por eletroporação.

[0355] Os métodos biológicos para a introdução do vetor em uma célula efectora imune incluem o uso de vetores de DNA e RNA. Os vetores virais se tornaram o método mais utilizado para inserir genes em mamíferos, *por exemplo*, células humanas.

[0356] Os meios químicos para a introdução do vetor numa célula efectora imune incluem sistemas de dispersão coloidal, tais como complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, grânulos e sistemas à base de lipídeos, incluindo emulsões óleo-em-água, micelas, micelas misturadas e lipossomas. Um sistema coloidal exemplificativo para uso como veículo de distribuição *in vitro* é um lipossoma (*por exemplo*, uma vesícula de membrana artificial).

[0357] Em algumas modalidades, as moléculas de RNA que codificam qualquer dos CARs aqui descritos podem ser preparadas por um método convencional (*por exemplo*, transcrição *in vitro*) e depois introduzidos nas células efectoras imunes através de métodos conhecidos, tais como eletroporação de mRNA. *Ver*, *por exemplo*, Rabinovich *et al.*, *Human Gene Therapy* 17:1027-1035.

[0358] Em algumas modalidades, a célula efetora imune transduzida ou transfectada é propagada *ex vivo* após a introdução do vetor ou ácido nucleico isolado. Em algumas modalidades, a célula efetora imune transduzida ou transfectada é cultivada para se propagar por pelo menos cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias ou 14 dias. Em algumas modalidades, a célula efetora imune transduzida ou transfectada é ainda avaliada ou selecionada para selecionar a célula de mamífero engenheirada.

[0359] Os genes repórter podem ser usados para identificar células potencialmente transfectadas e para avaliar a funcionalidade das sequências reguladoras. Em geral, um gene repórter é um gene que não está presente ou expresso pelo organismo ou tecido receptor e que codifica um polipeptídeo cuja expressão é manifestada por alguma propriedade facilmente detectável, *por exemplo*, atividade enzimática. A expressão do gene repórter é ensaiada em um momento adequado após o DNA ter sido introduzido nas células receptoras. Os genes repórter adequados podem incluir genes que codificam luciferase, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil-transferase, fosfatase alcalina segregada ou o gene da proteína fluorescente verde (*por exemplo*, Ui-Tei *et al.* FEBS Letters 479:79-82 (2000)). Os sistemas de expressão adequados são bem conhecidos e podem ser preparados utilizando técnicas conhecidas ou obtidos comercialmente.

[0360] Outros métodos para confirmar a presença do ácido nucleico que codifica os CARs na célula efetora imune engenheirada, incluem, por exemplo, ensaios biológicos moleculares bem conhecidos dos versados na técnica, tais como transferências Southern e Northern, RT-PCR e PCR; ensaios bioquímicos, tais como a detecção da presença ou ausência de um peptídeo particular, *por exemplo*, por métodos imunológicos (como ELISA e Western blots).

### **1. Fontes de Células T**

[0361] Antes da expansão e modificação genética das células T, uma fonte de células T é obtida de um indivíduo. As células T podem ser obtidas a partir de várias fontes, incluindo células mononucleares de sangue periférico, medula óssea, tecido linfonodal, sangue do cordão umbilical, tecido timo, tecido de um sítio de infecção, ascite, derrame pleural, tecido do baço e tumores. Em algumas modalidades, pode ser utilizado qualquer número de linhagens celulares T disponíveis na técnica. Em algumas modalidades, as células T podem ser obtidas a partir de uma unidade de sangue recolhida a partir de um sujeito

utilizando qualquer número de técnicas conhecidas pelos versados, tais como a separação de FICOLL™. Em algumas modalidades, as células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas por aférese. O produto de aférese contém tipicamente linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. Em algumas modalidades, as células recolhidas por aférese podem ser lavadas para remover a fração de plasma e para colocar as células num tampão ou meio apropriado para etapas de processamento subsequentes. Em algumas modalidades, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em algumas modalidades, a solução de lavagem carece de cálcio e pode carecer de magnésio ou pode carecer de muitos, se não todos, cátions divalentes. Novamente, surpreendentemente, as etapas iniciais de ativação na ausência de cálcio levam à ativação ampliada. Como os versados na técnica apreciariam prontamente uma etapa de lavagem pode ser realizada por métodos conhecidos por aqueles na técnica, tais como usando uma centrífuga semiautomática "fluída" (por exemplo, o processador de células Cobe 2991, o CytoMate Baxter ou o Haemonetics Cell Saver 5) de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem, as células podem ser ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis, como, por exemplo, Ca<sup>2+</sup>-livre, Mg<sup>2+</sup>-livre PBS, PlasmaLyte A, ou outra solução salina com ou sem tampão. Alternativamente, os componentes indesejáveis da amostra de aférese podem ser removidos e as células são ressuspensas diretamente em meios de cultura.

**[0362]** Em algumas modalidades, as células T são isoladas a partir de linfócitos do sangue periférico por lise dos glóbulos vermelhos e esvaziando os monócitos, por exemplo, por centrifugação através de um gradiente PERCOLL™ ou por elutriação centrífuga de contra-fluxo. Uma subpopulação específica de células T, como células CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ e CD45RO+, pode ser adicionalmente isolada por técnicas de seleção positiva ou negativa. Por exemplo, em algumas modalidades, as células T são isoladas por incubação com grânulos conjugados anti-CD3/anti-CD28 (isto é, 3×28), tais como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante um período de tempo suficiente para seleção positiva das células T desejadas. Em algumas modalidades, o período de tempo é de cerca de 30 minutos. Em uma outra modalidade, o período de tempo varia de 30 minutos a 36 horas ou mais e todos os valores inteiros entre eles. Em ainda uma outra modalidade, o período de tempo é pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas. Em algumas modalidades, o período de tempo é de 10 a 24 horas. Em algumas modalidades, o período

de incubação é de 24 horas. Para o isolamento de células T de pacientes com leucemia, o uso de períodos de incubação mais longos, como 24 horas, pode aumentar o rendimento celular. Os períodos de incubação mais longos podem ser usados para isolar as células T em qualquer situação em que existam poucas células T em comparação com outros tipos celulares, como isolar os linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) do tecido tumoral ou de indivíduos imunocomprometidos. Além disso, o uso de períodos de incubação mais longos pode aumentar a eficiência da captura de células T CD8+. Assim, simplesmente reduzindo ou prolongando o tempo, as células T podem ligar-se aos grânulos CD3/CD28 e/ou aumentando ou diminuindo a proporção de grânulos para células T (como aqui descrito mais adiante), as subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas para ou contra a iniciação da cultura ou em outros pontos de tempo durante o processo. Adicionalmente, aumentando ou diminuindo a proporção de anticorpos anti-CD3 e/ou anti-CD28 nos grânulos ou outra superfície, as subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas para ou contra na iniciação da cultura ou em outros pontos de tempo desejados. O versado reconheceria que várias rodadas de seleção também podem ser usadas. Em algumas modalidades, pode ser desejável executar o procedimento de seleção e usar as células "não selecionadas" no processo de ativação e expansão. As células "não selecionadas" também podem ser submetidas a mais rodadas de seleção.

**[0363]** O enriquecimento de uma população de células T por seleção negativa pode ser realizado com uma combinação de anticorpos dirigidos para marcadores de superfície únicos para as células selecionadas negativamente. Um método é a triagem e/ou seleção de células através de imunodepleção magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um coquetel de anticorpos monoclonais dirigidos para marcadores de superfície celular presentes nas células negativamente selecionadas. Por exemplo, para enriquecer para células CD4+ por seleção negativa, um coquetel de anticorpo monoclonal tipicamente inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Em certas modalidades, pode ser desejável enriquecer ou selecionar positivamente para células T reguladoras que tipicamente expressam CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ e FoxP3+. Alternativamente, em certas modalidades, as células T reguladoras são esgotadas por grânulos conjugados anti-CD25 ou outro método de seleção semelhante.

**[0364]** Para o isolamento de uma população desejada de células por seleção positiva ou negativa, a concentração de células e superfície (*por exemplo*, partículas, como grânulos)



podem ser variadas. Em certas modalidades, pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que os grânulos e as células são misturadas em conjunto (isto é, aumentar a concentração de células), para garantir o máximo contato de células e grânulos. Por exemplo, em uma modalidade, é utilizada uma concentração de 2 bilhões de células/ml. Em uma modalidade, é utilizada uma concentração de 1 bilhão de células/ml. Em uma outra modalidade, é utilizada mais de 100 milhões de células/ml. Em uma outra modalidade, é utilizada uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 milhões de células/ml. Em ainda uma outra modalidade, é utilizada uma concentração de células de 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 milhões de células/ml. Em modalidades adicionais, podem ser utilizadas concentrações de 125 ou 150 milhões de células/ml. O uso de altas concentrações pode resultar em aumento do rendimento celular, ativação celular e expansão celular. Além disso, o uso de altas concentrações celulares permite uma captura mais eficiente de células que podem expressar de forma fraca antígenos alvo de interesse, tais como células T CD28-negativas, ou de amostras onde existem muitas células tumorais presentes (i. e., sangue leucêmico, tecido tumoral, etc.). Tais populações de células podem ter valor terapêutico e seriam desejáveis de se obter. Por exemplo, o uso de alta concentração de células permite uma seleção mais eficiente de células T CD8+ que normalmente apresentam uma expressão mais baixa de CD28.

**[0365]** Em algumas modalidades, pode ser desejável usar menores concentrações de células. Por diluição significativa da mistura de células T e superfície (*por exemplo*, partículas, tais como grânulos), as interações entre partículas e células são minimizadas. Isso seleciona células que expressam grandes quantidades de antígenos desejados para serem ligados às partículas. Por exemplo, as células T CD4+ expressam níveis mais elevados de CD28 e são mais eficazes que as células T CD8+ em concentrações diluídas. Em algumas modalidades, a concentração de células utilizada é  $5 \times 10^6$ /ml. Em algumas modalidades, a concentração utilizada pode ser de aproximadamente  $1 \times 10^5$ /ml a  $1 \times 10^6$ /ml, e qualquer valor inteiro entre eles.

**[0366]** Em algumas modalidades, as células podem ser incubadas em um rotador por longos períodos variáveis a velocidades variáveis a 2-10°C, ou à temperatura ambiente.

**[0367]** As células T para estimulação também podem ser congeladas após uma etapa de lavagem. Desejando não estar vinculado pela teoria, o congelamento e subsequente etapa de descongelamento proporcionam um produto mais uniforme, removendo granulócitos e,

até certo ponto, monócitos na população de células. Após a etapa de lavagem que remove plasma e plaquetas, as células podem ser suspensas em uma solução congelante. Enquanto muitas soluções e parâmetros de congelamento são conhecidos na técnica e serão úteis neste contexto, um método envolve a utilização de PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina de soro humano, ou meio de cultura contendo 10% de Dextrano 40 e Dextrose a 5%, 20% de Albumina de soro humano e 7% de DMSO, ou 31,25% de Plasmalyte-A, 31,25% de Dextrose a 5%, NaCl a 0,45%, Dextrano 40 a 10% e Dextrose a 5%, Albumina de Soro Humano a 20% e DMSO a 7,5% ou outros meios de congelamento de células adequados contendo, por exemplo, Hespan e PlasmaLyte A, as células são congeladas até  $-80^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $1^{\circ}$  por minuto e armazenados na fase de vapor de um tanque de armazenamento de nitrogênio líquido. Podem ser utilizados outros métodos de congelamento controlado, bem como congelamento descontrolado imediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou em nitrogênio líquido.

**[0368]** Em algumas modalidades, as células criopreservadas são descongeladas e lavadas como aqui descrito e deixadas repousar durante uma hora à temperatura ambiente antes da ativação.

**[0369]** Também contemplado no presente pedido é a recolha de amostras de sangue ou produto de aférese de um indivíduo num período de tempo anterior a que as células expandidas como aqui descritas podem ser necessárias. Como tal, a fonte das células a serem expandidas pode ser coletada em qualquer ponto de tempo necessário e células desejadas, como células T, isoladas e congeladas para uso posterior na terapia com células T para qualquer número de doenças ou condições que se beneficiariam da terapia com células T, como as descritas aqui. Em uma modalidade, uma amostra de sangue ou uma aférese é retirada de um sujeito geralmente saudável. Em certas modalidades, uma amostra de sangue ou uma aférese é retirada de um sujeito geralmente saudável que corre o risco de desenvolver uma doença, mas que ainda não desenvolveu uma doença e as células de interesse são isoladas e congeladas para uso posterior. Em certas modalidades, as células T podem ser expandidas, congeladas e usadas em um momento posterior. Em certas modalidades, as amostras são recolhidas de um paciente logo após o diagnóstico de uma doença particular como aqui descrito, mas antes de qualquer tratamento. Em uma modalidade adicional, as células são isoladas a partir de uma amostra de sangue ou uma aférese de um sujeito antes de qualquer número de modalidades de tratamento relevantes,

incluindo mas não limitado a tratamento com agentes, tais como natalizumabe, efalizumabe, agentes antivirais, quimioterapia, radiação, agentes imunossuppressores, tais como a ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos ou outros agentes imunológicos, tais como CAMPATH, anticorpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiação. Essas drogas inibem a fosfatase calcineurina dependente de cálcio (ciclosporina e FK506) ou inibem a p70S6 quinase que é importante para a sinalização induzida por fator de crescimento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). Em uma outra modalidade, as células são isoladas para um paciente e congeladas para uso posterior em conjunto com (*por exemplo*, antes, simultaneamente ou após) transplante de medula óssea ou células estaminais, terapia ablativa de células T usando agentes de quimioterapia, como fludarabina, radioterapia de feixe externo (XRT), ciclofosfamida ou anticorpos, como OKT3 ou CAMPATH. Em uma outra modalidade, as células são isoladas antes e podem ser congeladas para uso posterior para tratamento após a terapia ablativa com células B, tais como agentes que reagem com CD20, *por exemplo*, Rituxano.

**[0370]** Em algumas modalidades, as células T são obtidas de um paciente diretamente após o tratamento. A este respeito, observou-se que, após certos tratamentos contra o câncer, em tratamentos específicos com drogas que danificam o sistema imunológico, logo após o tratamento durante o período em que os pacientes normalmente se recuperariam do tratamento, a qualidade das células T obtidas pode ser otimizada ou melhorou a sua capacidade de expansão *ex vivo*. Do mesmo modo, após a manipulação *ex vivo* usando os métodos aqui descritos, estas células podem estar em um estado preferido para enxertia aumentada e expansão *in vivo*. Assim, é contemplado dentro do contexto da presente invenção coletar células sanguíneas, incluindo células T, células dendríticas ou outras células da linhagem hematopoiética, durante esta fase de recuperação. Além disso, em certas modalidades, a mobilização (*por exemplo*, a mobilização com GM-CSF) e os regimes de condicionamento podem ser usados para criar uma condição em um sujeito em que o repovoamento, recirculação, regeneração e ou expansão de tipos de células particulares é favorecido, especialmente durante uma janela de tempo definida após a terapia. Os tipos de células ilustrativos incluem células T, células B, células dendríticas e outras células do sistema imunológico.

## 2. Ativação e expansão de células T

[0371] Seja antes ou depois da modificação genética das células T com os CARs aqui descritos, as células T podem ser ativadas e expandidas geralmente usando métodos como descrito, por exemplo, nas Patente US 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; e Publicação de Pedido de Patente US 20060121005.

[0372] Geralmente, as células T podem ser expandidas por contato com uma superfície que tem ligado ao mesmo um agente que estimula um sinal associado ao complexo CD3/TCR e um ligando que estimula uma molécula coestimuladora na superfície das células T. Em particular, as populações de células T podem ser estimuladas como aqui descrito, tal como por contato com um anticorpo anti-CD3 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-CD28 imobilizado numa superfície, ou por contato com um ativador da proteína quinase C (*por exemplo*, briostatina) em conjunto com um ionóforo de cálcio. Para a coestimulação de uma molécula acessório na superfície das células T, é utilizado um ligando que liga a molécula acessório. Por exemplo, uma população de células T pode ser contactada com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, em condições adequadas para estimular a proliferação das células T. Para estimular a proliferação de células T CD4+ ou células T CD8+, um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Exemplos de um anticorpo anti-CD28 incluem 9,3, B-T3, XR- CD28 (Diaclone, Besancon, França) podem ser utilizados como outros métodos vulgarmente conhecidos na técnica (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998. Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190 (9): 13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

[0373] Em algumas modalidades, o sinal estimulador primário e o sinal coestimulador para a célula T podem ser proporcionados por diferentes protocolos. Por exemplo, os agentes que proporcionam cada sinal podem estar em solução ou acoplados a uma superfície. Quando acoplados a uma superfície, os agentes podem ser acoplados à mesma superfície (isto é, na formação "cis") ou para separar superfícies (isto é, na formação "trans"). Alternativamente, um agente pode ser acoplado a uma superfície e ao outro agente em solução. Em uma modalidade, o agente que proporciona o sinal coestimulador está ligado a uma superfície celular e o agente que proporciona o sinal primário de ativação está

em solução ou acoplado a uma superfície. Em certas modalidades, ambos os agentes podem estar em solução. Em uma outra modalidade, os agentes podem estar em forma solúvel, e depois reticulados a uma superfície, tal como uma célula que expressa receptores Fc ou um anticorpo ou outro agente de ligação que se liga aos agentes. A este respeito, ver, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente US 20040101519 e 20060034810 para células apresentadoras de antígenos artificiais (aAPCs) que são contempladas para serem usadas na ativação e ampliação de células T na presente invenção.

**[0374]** Em algumas modalidades, as células T, são combinadas com grânulos revestidos com agente, os grânulos e as células são subsequentemente separados e, em seguida, as células são cultivadas. Em uma modalidade alternativa, antes da cultura, os grânulos e as células revestidas com agente não são separados, mas são cultivados em conjunto. Em uma outra modalidade, os grânulos e as células são primeiro concentradas por aplicação de uma força, tal como uma força magnética, resultando numa ligadura aumentada de marcadores de superfície celular, induzindo assim a estimulação celular.

**[0375]** A título de exemplo, as proteínas da superfície celular podem ser ligadas ao permitir que os grânulos paramagnéticos ao qual anti-CD3 e anti-CD28 estão ligados ( $3 \times 28$  grânulos) entre em contato com as células T. Em uma modalidade, as células (por exemplo,  $10^4$  a  $10^9$  células T) e os grânulos (por exemplo, os grânulos paramagnéticos DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T com razão de 1:1) são combinados em um tampão, de preferência PBS (sem cátions divalentes, como cálcio e magnésio). Novamente, os versados na técnica podem facilmente apreciar que qualquer concentração de células pode ser usada. Por exemplo, a célula alvo pode ser muito rara na amostra e compreender apenas 0,01% da amostra ou toda a amostra (isto é, 100%) pode compreender a célula alvo de interesse. Consequentemente, qualquer número de célula está dentro do contexto da presente invenção. Em certas modalidades, pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que as partículas e as células são misturadas em conjunto (isto é, aumentar a concentração de células), para garantir o máximo contato de células e partículas. Por exemplo, em uma modalidade, é utilizada uma concentração de cerca de 2 bilhões de células/ml. Em uma outra modalidade, são utilizadas mais de 100 milhões de células/ml. Em uma outra modalidade, é utilizada uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 milhões de células/ml. Em ainda uma outra modalidade, é utilizada uma concentração de células de 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 milhões de células/ml. Em

modalidades adicionais, podem ser utilizadas concentrações de 125 ou 150 milhões de células/ml. O uso de altas concentrações pode resultar em aumento do rendimento celular, ativação celular e expansão celular. Além disso, o uso de altas concentrações celulares permite uma captura mais eficiente de células que podem expressar de forma fraca antígenos alvo de interesse, como células T CD28-negativas. Tais populações de células podem ter valor terapêutico e seriam desejáveis de se obter em certas modalidades. Por exemplo, o uso de alta concentração de células permite uma seleção mais eficiente de células T CD8+ que normalmente apresentam uma expressão mais baixa de CD28.

[0376] Em algumas modalidades, a mistura pode ser cultivada durante várias horas (cerca de 3 horas) a cerca de 14 dias ou qualquer valor inteiro horário no meio. Em uma outra modalidade, a mistura pode ser cultivada durante 21 dias. Em uma modalidade da invenção, os grânulos e as células T são cultivados juntos durante cerca de oito dias. Em uma outra modalidades, os grânulos e as células T são cultivados em conjunto durante 2-3 dias. Vários ciclos de estimulação também podem ser desejados de tal forma que o tempo de cultura das células T pode ser de 60 dias ou mais. Condições apropriadas para cultura de células T incluem um meio apropriado (*por exemplo*, Meio Essencial Mínimo ou Meio RPMI 1640 ou, X-vivo 15, (Lonza)) que podem conter os fatores necessários para a proliferação e viabilidade, incluindo o soro (*por exemplo*, soro fetal bovino ou humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  e TNF- $\alpha$  ou quaisquer outros aditivos para o crescimento de células conhecidos pelos versados. Outros aditivos para o crescimento de células incluem, mas não estão limitados a, tensoativo, plasmanato e agentes redutores, tais como N-acetil-cisteína e 2- mercaptoetanol. O meio pode incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 e X-Vivo 20, otimizador, com aminoácidos adicionados, piruvato de sódio e vitaminas, sem soro ou suplementado com uma quantidade apropriada de soro (ou plasma) ou um conjunto definido de hormônios, e/ou uma quantidade de citocinas suficientes para o crescimento e expansão de células T. Antibióticos, *por exemplo*, penicilina e estreptomicina, são incluídos apenas em culturas experimentais, não em culturas de células que devem ser infundidas em um sujeito. As células-alvo são mantidas sob condições necessárias para suportar o crescimento, por exemplo, uma temperatura apropriada (*por exemplo*, 37 °C) e atmosfera (*por exemplo*, ar mais 5% de CO<sub>2</sub>). As células T que foram expostas a tempos de estimulação variados podem exibir características diferentes. Por

exemplo, o sangue típico ou os produtos de células mononucleares de sangue periférico de aférese têm uma população de células T auxiliares (TH, CD4+) que é maior que a população de células T citotóxicas ou supressoras (TC, CD8). A expansão *ex vivo* de células T por meio da estimulação de receptores CD3 e CD28 produz uma população de células T que, antes de cerca dos dias 8-9, consiste predominantemente em células TH, enquanto que, após alguns dos dias 8-9, a população de células T compreende uma população cada vez maior de células TC. Conseqüentemente, dependendo da finalidade do tratamento, a infusão de um sujeito com uma população de células T compreendendo predominantemente células TH pode ser vantajosa. Da mesma forma, se um subconjunto específico de antígenos de células TC estiver isolado, pode ser benéfico expandir este subconjunto em maior grau.

[0377] Além disso, além de marcadores CD4 e CD8, outros marcadores fenotípicos variam significativamente, mas em grande parte, reproduzivelmente durante o processo de expansão celular. Assim, essa reprodutibilidade permite a capacidade de adaptar um produto de célula T ativado para fins específicos.

## **V. Composições Farmacêuticas**

[0378] Adicionalmente, são proporcionadas pelo presente pedido composições farmacêuticas compreendendo qualquer um dos anticorpos de domínio único anti-BCMA, ou qualquer uma das células efectoras imunes engenheiradas, compreendendo qualquer um dos CARs (tais como CARs BCMA) como aqui descritos, e um transportador farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas podem ser preparadas misturando um sdAb, ou uma pluralidade de células efectoras imunes engenheiradas com o grau de pureza desejado com transportadores, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou de soluções aquosas. [0379] Os transportadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões, antioxidantes incluindo ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabissulfito de sódio; conservantes, isotonicificadores, estabilizadores, complexos metálicos (*por exemplo*, complexos de proteína-Zn); agentes quelantes, tais como EDTA e/ou tensoativos não iônicos.

[0380] Os tampões são usados para controlar o pH em uma faixa que otimiza a eficácia terapêutica, especialmente se a estabilidade depende do pH. Os tampões estão



preferencialmente presentes em concentrações que variam de cerca de 50 mM a cerca de 250 mM. Os agentes tampão adequados para utilização com a presente invenção incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e sais dos mesmos. Por exemplo, citrato, fosfato, succinato, tartarato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, os tampões podem compreender sais de histidina e trimetilamina tais como Tris.

**[0381]** Os conservantes são adicionados para retardar o crescimento microbiano e estão tipicamente presentes em uma faixa de 0,2% -1,0% (p/v). Conservantes adequados para utilização com a presente invenção incluem cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametileno; haletos de benzalcônio (*por exemplo*, cloreto, brometo, iodeto), cloreto de benzetônio; álcool timerosal, fenol, butil ou benzílico; alquil parabenos, tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol.

**[0382]** Os agentes de tonicidade, às vezes conhecidos como "estabilizadores", estão presentes para ajustar ou manter a tonicidade do líquido em uma composição. Quando usado com biomoléculas grandes e carregadas, como proteínas e anticorpos, muitas vezes são chamados de "estabilizadores" porque podem interagir com os grupos carregados das cadeias laterais de aminoácidos, reduzindo assim o potencial de interações inter e intramoleculares. Os alcoóis poli-hídricos podem estar presentes em uma quantidade entre 0,1% a 25% em peso, normalmente 1 a 5%, levando em consideração as quantidades relativas dos outros ingredientes. Os agentes de tonicidade preferidos incluem álcoois de açúcar poli-hídrico, de preferência álcoois de açúcar tri-hídricos ou superiores, tais como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol.

**[0383]** Excipientes adicionais incluem agentes que podem servir como um ou mais dos seguintes: (1) agentes de volume, (2) potenciadores da solubilidade, (3) estabilizadores e (4) e agentes que impedem a desnaturação ou aderência à parede do recipiente. Tais excipientes incluem: álcoois de açúcar poli-hídrico (enumerados acima); aminoácidos, tais como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, etc. ; açúcares orgânicos ou álcoois de açúcar tais como sacarose, lactose, lactitol, trealose, estaquiase, manose, sorbose, xilose, ribose, ribitol, mioiniositose, mioiniositol, galactose, galactitol, glicerol, ciclitos (*por exemplo*, inositol), polietileno glicol; agentes redutores contendo enxofre, tais como ureia, glutatona, ácido tiótico, tioglicolato de sódio, tioglicerol,  $\alpha$ -monotioglicerol e tio-sulfato de sódio; proteínas de baixo peso molecular, tais como albumina de soro humano,

albumina de soro bovino, gelatina ou outras imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; monossacarídeos (*por exemplo*, xilose, manose, frutose, glicose; dissacarídeos (*por exemplo*, lactose, maltose, sacarose); trissacarídeos como rafinose; e polissacarídeos como dextrina ou dextrano.

**[0384]** Os tensoativos ou detergentes não iônicos (também conhecidos como "agentes umectantes") estão presentes para ajudar a solubilizar o agente terapêutico, bem como para proteger a proteína terapêutica contra a agregação induzida por agitação, o que também permite que a formulação seja exposta ao estresse superficial do cisalhamento sem causar desnaturação da proteína ou anticorpo terapêutico ativo. Os tensoativos não iônicos estão presentes numa faixa de cerca de 0,05 mg/ml a cerca de 1,0 mg/ml, de preferência cerca de 0,07 mg/ml a cerca de 0,2 mg/ml.

**[0385]** Os tensoativos não iônicos adequados incluem polissorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), polioxâmeros (184, 188, etc.), polióis de PLURONIC®, TRITON®, monoéteres de polioxietileno sorbitano (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.), lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, óleo de rícino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 e 60, monoestearato de glicerol, éster de ácido graxo de sacarose, metil-celulose e carboximetilcelulose. Os detergentes aniônicos que podem ser utilizados incluem lauril sulfato de sódio, dioctil sulfossuccinato de sódio e dioctil sulfonato de sódio. Os detergentes catiônicos incluem cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio.

**[0386]** Para que as composições farmacêuticas sejam utilizadas para administração *in vivo*, elas devem ser estéreis. A composição farmacêutica pode ser tornada estéril por filtração através de membranas de filtração estéril. Composições farmacêuticas do presente documento geralmente são colocadas num recipiente tendo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um frasco ou bolsa de solução intravenosa que tem um batente perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

**[0387]** A via de administração está de acordo com métodos conhecidos e aceitos, tais como por bolus único ou múltiplo ou infusão durante um longo período de tempo de uma maneira adequada, *por exemplo*, injeção ou infusão por via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-arterial, intralesional ou intra-articular, administração tópica, inalação ou por meio de liberação prolongada ou liberação estendida.

**[0388]** Preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros

hidrofóbicos sólidos contendo o antagonista, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, *por exemplo* filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxiethyl-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (Patente US 3. 773. 919), copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, tais como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolide) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

[0389] As composições farmacêuticas aqui descritas também podem conter mais de um composto ou agente ativo, conforme necessário, para a indicação particular a ser tratada, de preferência aqueles com atividades complementares que não se afetam adversamente. Alternativamente, ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente citotóxico, agente quimioterapêutico, citocina, agente imunossupressor ou agente inibidor de crescimento. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

[0390] Os ingredientes ativos podem ser aprisionados em umas microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou pela polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de distribuição de droga coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas da albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Essas técnicas são divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition.

## **VI. Métodos de Tratamento**

[0391] O presente pedido refere-se ainda a métodos e composições para uso na imunoterapia celular. Em algumas modalidades, a imunoterapia celular é para o tratamento do câncer, incluindo, entre outros, doenças malignas hematológicas e tumores sólidos. Qualquer um dos sdAbs anti-BCMA, CARs e células efetoras imunes engenheiradas (tais como células T-CAR) descritas aqui podem ser usadas no método de tratamento do câncer. Os CARs aqui descritos podem ser úteis para tratar tumores com mutações de escape de perda de antígeno e para reduzir a resistência a terapias existentes. Em algumas modalidades, os métodos e as composições aqui descritos podem ser usados para tratar

outras doenças que estão associadas aos antígenos especificamente reconhecidos pelos anticorpos de um só domínio ou CARs, incluindo, por exemplo, doenças autoimunes.

**[0392]** Em algumas modalidades, é proporcionado um método para tratar um câncer (como o mieloma múltiplo, *por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário) num indivíduo (tal como um indivíduo humano), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA que se liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação ao BMCA que se liga especificamente a um segundo epítipo de BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, é proporcionado um método para tratar um câncer (como o mieloma múltiplo, *por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário) num indivíduo (tal como um indivíduo humano), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um primeiro sdAb anti-BCMA que se liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e um segundo sdAb anti-BMCA que se liga especificamente a um segundo epítipo de BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é autóloga. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é alogênica. Em algumas modalidades, as células efetoras imunes engenheiradas são células T-CAR. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer líquido, como mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfocítica crônica. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada a uma dose de cerca de  $10^5$  a cerca de  $10^7$  células/kg, como cerca de  $3 \times 10^5$  a cerca de  $7 \times 10^6$  células/kg, ou cerca de  $3 \times 10^6$  células/kg. Em algumas modalidades, a célula efetora imune

engenheirada é administrada por injeção intravenosa. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada em três doses divididas ao longo de cerca de uma semana.

**[0393]** Em algumas modalidades, é proporcionado um método para tratar um câncer (como o mieloma múltiplo, *por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário) num indivíduo (tal como um indivíduo humano), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR BCMA que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo um sdAb anti-BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável, em que o sdAb anti-BCMA compreende qualquer um dos seguintes:(1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:77; (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:78; (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:79; (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:80; (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:81; (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:82; (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:83; (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46; e uma CDR3

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84; (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:85; (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:86; (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:87; (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:88; (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:89; (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:52; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:90; (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:91; (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:92; (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:93; (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:94; (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57; e uma CDR3



compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:95; (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:96; (21) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:97; (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:98; (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:99; (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100; (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:101; (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:102; (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:103; (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:104; (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:105; (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30; uma CDR2



compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:106; (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:69; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:107; (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:108; (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:109; (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:110; (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:111; (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:112; (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113; or (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:114. Em algumas modalidade, o domínio de ligação ao antígeno extracelular compreende pelo menos dois sdAbs anti- BCMA. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é de camélídeo, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende um domínio V<sub>H</sub>H compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:115-152. Em algumas modalidades, o CAR BCMA é uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:216-256 e

298-335. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é autóloga. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é alogênica. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer líquido, como mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfocítica crônica. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada a uma dose de cerca de  $10^5$  a cerca de  $10^7$  células/kg, como cerca de  $3 \times 10^5$  a cerca de  $7 \times 10^6$  células/kg, ou cerca de  $3 \times 10^6$  células/kg. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada por injeção intravenosa. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada em três doses divididas ao longo de cerca de uma semana.

**[0394]** Em algumas modalidades, é proporcionado um método para obter remissão clínica parcial ou completa num indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é autóloga. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é alogênica. Em algumas modalidades, as células efectoras imunes engenheiradas são células T-CAR. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer líquido, como mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfocítica crônica. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada a uma dose de cerca de  $10^5$  a cerca de  $10^7$  células/kg, como cerca de  $3 \times 10^5$  a cerca de  $7 \times 10^6$  células/kg, ou cerca de  $3 \times 10^6$  células/kg. Em algumas modalidades, a célula efetora imune engenheirada é administrada por injeção intravenosa. Em algumas modalidades, a célula

efetora imune engenheirada é administrada em três doses divididas ao longo de cerca de uma semana.

[0395] Em algumas modalidades, é proporcionado um método de tratamento de um câncer (como o mieloma múltiplo, *por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário) em um indivíduo (como um indivíduo humano), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um sdAb anti-BCMA e um transportador farmacêuticamente aceitável, em que o sdAb anti- BCMA compreende qualquer um dos seguintes:(1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:77; (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:78; (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:79; (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:80; (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:81; (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:82; (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:83; (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84; (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:85; (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:86; (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:87; (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:88; (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:89; (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:52; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:90; (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:91; (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:92; (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:93; (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:94; (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:95; (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:96; (21) uma CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:97; (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:98; (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:99; (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100; (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:101; (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:102; (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:103; (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:104; (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:105; (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:106; (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:69; e uma CDR3

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:107; (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:108; (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:109; (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:110; (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:111; (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:112; (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113; or (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:114. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA é de camélideo, quimérico, humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o sdAb anti-BCMA compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:115-152. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer líquido, como mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfocítica crônica. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado.

**[0396]** Os métodos aqui descritos são adequados para tratar vários tipos de câncer, incluindo câncer sólido e câncer líquido. Os métodos são aplicáveis aos cânceres de todos os estágios, incluindo estágio inicial, estágio avançado e câncer metastático. Os métodos aqui descritos podem ser utilizados como primeira terapia, segunda terapia, terceira terapia



ou combinação com outros tipos de terapias de câncer conhecidas na técnica, tais como quimioterapia, cirurgia, radiação, terapia genética, imunoterapia, transplante de medula óssea, transplante de células estaminais, terapia direcionada, crioterapia, terapia de ultrassom, terapia fotodinâmica, ablação por radiofrequência ou similar, em uma configuração adjuvante ou em uma configuração neoadjuvante.

**[0397]** Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo de estágio I, estágio II ou estágio III e/ou estágio A ou estágio B com base no sistema de estadiamento de Durie-Salmon. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo de estágio I, estágio II ou estágio III com base no sistema de estadiamento internacional publicado pelo International Myeloma Working Group (IMWG). Em algumas modalidades, o câncer é gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS). Em algumas modalidades, o câncer é mieloma assintomático (latente/indolente). Em algumas modalidades, o câncer é mieloma ativo ou sintomático. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo refratário. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo metastático. Em algumas modalidades, o indivíduo não respondeu a um tratamento anterior para mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o indivíduo tem doença progressiva após um tratamento anterior de mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o indivíduo recebeu anteriormente pelo menos cerca de qualquer um dos 2, 3, 4 ou mais tratamentos para o mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo recidivado.

**[0398]** Em algumas modalidades, o indivíduo tem mieloma múltiplo ativo. Em algumas modalidades, o indivíduo tem células plasmáticas clonais de medula óssea de pelo menos 10%. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um plasmocitoma ósseo ou extramedular comprovado por biópsia. Em algumas modalidades, o indivíduo tem evidência de danos no órgão final que podem ser atribuídos à doença proliferativa celular plasmática subjacente. Em algumas modalidades, o indivíduo tem hipercalemia, *por exemplo*, cálcio sérico  $> 0,25$  mmol/L ( $> 1$  mg/dL) maior que o limite superior do normal ou  $> 2,75$  mmol/L ( $> 11$  mg/dL). Em algumas modalidades, o indivíduo tem insuficiência renal, *por exemplo*, clearance de creatinina  $< 40$  mL por minuto ou creatinina sérica  $> 177$   $\mu$ mol / L ( $> 2$  mg/dL). Em algumas modalidades, o indivíduo tem anemia, *por exemplo*, valor de hemoglobina  $> 20$  g/L abaixo do limite inferior do normal ou valor de hemoglobina  $< 100$  g/L. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma ou mais lesões ósseas, *por*



*exemplo*, uma ou mais lesões osteolíticas na radiografia do esqueleto, CT ou PET/CT. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um ou mais dos seguintes biomarcadores de malignidade (MDEs):(1) 60% ou mais de células plasmáticas clonais no exame da medula óssea; (2) razão de cadeia leve livre/não envolvida no soro de 100 ou mais, desde que o nível absoluto da cadeia leve envolvida seja de pelo menos 100 mg/L; e (3) mais de uma lesão focal na ressonância magnética que é pelo menos 5 mm ou mais em tamanho.

**[0399]** A administração das composições farmacêuticas pode ser realizada de qualquer maneira conveniente, incluindo por injeção, ingestão, transfusão, implantação ou transplante. As composições podem ser administradas a um paciente de forma transarterial, subcutânea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, intravenosa ou intraperitoneal. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada sistematicamente. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada a um indivíduo por infusão, tal como infusão intravenosa. As técnicas de infusão para imunoterapia são conhecidas na técnica (ver, *por exemplo*, Rosenberg *et al.*, *New Eng. J. of Med.* 319:1676 (1988)). Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada a um indivíduo por injeção intradérmica ou subcutânea. Em algumas modalidades, as composições são administradas por injeção intravenosa. Em algumas modalidades, as composições são injetadas diretamente em um tumor, ou em um linfonodo. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é administrada localmente a um local de tumor, tal como diretamente nas células tumorais, ou a um tecido que tem células tumorais.

**[0400]** As dosagens e a concentração de droga desejada das composições farmacêuticas da presente invenção podem variar dependendo do uso particular previsto. A determinação da dosagem apropriada ou via de administração está bem dentro da habilidade de um versado comum. Experimentos em animais proporcionam orientação confiável para a determinação de doses efetivas para terapia humana. A escala intraespécies de doses efetivas pode ser realizada de acordo com os princípios estabelecidos por Mordenti, J. e Chappell, W. “The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,” Em *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46. É dentro do escopo do presente pedido que formulações diferentes serão eficazes para diferentes tratamentos e diferentes distúrbios, e que a administração destinada a tratar um

órgão ou tecido específico pode exigir a administração de uma maneira diferente da de outro órgão ou tecido.

**[0401]** Em algumas modalidades, em que a composição farmacêutica compreende qualquer um dos sdAbs aqui descritos, a composição farmacêutica é administrada a uma dosagem de cerca de 10 ng/kg até cerca de 100 mg/kg de peso corporal do indivíduo ou mais por dia, por exemplo, a cerca de 1 mg/kg/dia a 10 mg/kg/dia, dependendo da via de administração. A orientação sobre as dosagens e os métodos de distribuição específicos é proporcionada na literatura; ver, por exemplo, Patente US 4. 657. 760; 5. 206. 344; ou 5. 225. 212.

**[0402]** Em algumas modalidades, em que a composição farmacêutica compreende qualquer uma das células imunes engenheiradas aqui descritas, a composição farmacêutica é administrada a uma dosagem de pelo menos aproximadamente qualquer um de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , ou  $10^9$  células/kg do peso corporal do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada numa dosagem de qualquer de cerca de  $10^4$  a cerca de  $10^5$ , cerca de  $10^5$  a cerca de  $10^6$ , cerca de  $10^6$  a cerca de  $10^7$ , cerca de  $10^7$  a cerca de  $10^8$ , cerca de  $10^8$  a cerca de  $10^9$ , cerca de  $10^4$  a cerca de  $10^9$ , cerca de  $10^4$  a cerca de  $10^6$ , cerca de  $10^6$  a cerca de  $10^8$ , ou cerca de  $10^5$  a cerca de  $10^7$  células/kg de peso corporal do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada a uma dose de pelo menos cerca de  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  células/kg ou mais. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada a uma dose de cerca de  $3 \times 10^5$  a cerca de  $7 \times 10^6$  células/kg, ou cerca de  $3 \times 10^6$  células/kg.

**[0403]** Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada por uma única vez. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada por várias vezes (como qualquer uma das 2, 3, 4, 5, 6 ou mais vezes). Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada uma vez por semana, uma vez 2 semanas, uma vez 3 semanas, uma vez 4 semanas, uma vez por mês, uma vez por 2 meses, uma vez por 3 meses, uma vez por 4 meses, uma vez por 5 meses, uma vez por 6 meses, uma vez por 7 meses, uma vez por 8 meses, uma vez por 9 meses, ou uma vez por ano. Em algumas modalidades, o intervalo entre as administrações é de cerca de 1 semana a 2 semanas, 2 semanas a 1 mês, 2 semanas a 2 meses, 1 mês a 2 meses, 1 mês a 3 meses, 3 meses a 6 meses ou 6 meses a um ano. A dosagem ideal e o regime de tratamento para um paciente

particular podem ser facilmente determinados por um versado na técnica do medicamento, monitorizando o paciente para detectar sinais de doença e ajustando o tratamento de acordo.

[0404] Além disso, as dosagens podem ser administradas por uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada em doses separadas, tal como cerca de qualquer uma das doses de 2, 3, 4, 5 ou mais. Em algumas modalidades, as doses divididas são administradas ao longo de cerca de uma semana. Em algumas modalidades, a dose é igualmente dividida. Em algumas modalidades, as doses divididas são cerca de 20%, cerca de 30% e cerca de 50% da dose total. Em algumas modalidades, o intervalo entre as doses divididas consecutivas é de cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias ou mais. Para administrações repetidas ao longo de muitos dias ou maiores, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas de doença. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais.

[0405] Em algumas modalidades, a quantidade da composição farmacêutica é eficaz para causar uma resposta clínica objetiva no indivíduo. Em algumas modalidades, é proporcionado um método para obter uma resposta clínica objetiva em um indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a Resposta Clínica Rigorosa (sCR) é obtida no indivíduo.

[0406] Em algumas modalidades, a quantidade da composição farmacêutica é eficaz para causar remissão da doença (parcial ou completa) no indivíduo. Em algumas modalidades, é

proporcionado um método de causar remissão da doença (parcial ou completa) em um indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacologicamente aceitável. Em alguns, a remissão clínica é obtida após não mais que qualquer um dos 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mês ou menos após o indivíduo receber a composição farmacêutica.

**[0407]** Em algumas modalidades, a quantidade da composição farmacêutica é eficaz para prevenir a recidiva ou progressão da doença do câncer no indivíduo. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de prevenir de recidiva ou progressão da doença em um indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a recidiva ou progressão da doença é prevenida por pelo menos cerca de 6 meses, 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 anos, 5 anos ou mais.

**[0408]** Em algumas modalidades, a quantidade da composição farmacêutica é eficaz para prolongar a sobrevivência (tal como sobrevivência livre de doença) no indivíduo. Em algumas

modalidades, a sobrevida é prolongada durante pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 12 ou 24 meses. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de prolongar a sobrevida de um indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável

**[0409]** Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é eficaz para melhorar a qualidade de vida no indivíduo. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de melhorar a qualidade de vida de um indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável

**[0410]** Em algumas modalidades, a quantidade da composição farmacêutica é eficaz para inibir o crescimento ou reduzir o tamanho de um tumor sólido ou linfático. Em algumas modalidades, o tamanho do tumor sólido ou linfático é reduzido para pelo menos cerca de 10% (incluindo, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%). Em algumas modalidades, é proporcionado um método para inibir o crescimento ou reduzir o tamanho de um tumor sólido ou linfático num indivíduo.

[0411] Em algumas modalidades, a quantidade da composição farmacêutica é eficaz para inibir a metástase do tumor no indivíduo. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 10% (incluindo, por exemplo, pelo menos, cerca de 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100%) de metástase é inibida. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de inibir a metástase tumoral de um indivíduo com mieloma múltiplo (*por exemplo*, mieloma múltiplo recidivado ou refratário), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo:(1) uma célula efetora imune engenheirada (tal como célula T) compreendendo um CAR multivalente que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo uma primeira fração de ligação ao BCMA (como um primeiro sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um primeiro epítipo de BCMA, e uma segunda fração de ligação BCMA (como um segundo sdAb anti-BCMA) que liga especificamente a um segundo epítipo do BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular, em que o primeiro epítipo e o segundo epítipo são diferentes; e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de inibição de metástase para o nódulo linfático. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de inibição de metástase para o pulmão. Em algumas modalidades, é proporcionado um método de inibição de metástase para o fígado. A metástase pode ser avaliada por quaisquer métodos conhecidos na técnica, tais como por exames de sangue, exames de osso, exames de raios-x, tomografias computadorizadas (TC), exames de PET e biópsia.

## **VII. Kits e artigos de fabricação**

[0412] São também proporcionados kits, dosagens unitárias e artigos de fabricação compreendendo qualquer dos anticorpos de domínio único, os receptores de antígeno quiméricos ou as células efectoras imunes engenheiradas aqui descritas. Em algumas modalidades, é proporcionado um kit que contém qualquer uma das composições farmacêuticas aqui descritas e, de preferência, proporciona instruções para a sua utilização.

[0413] Os kits do presente pedido estão em embalagens adequadas. As embalagens adequadas incluem, mas não estão limitadas a, frascos, garrafas, jarros, embalagens flexíveis (*por exemplo*, Mylar selado ou sacos plásticos) e semelhantes. Os kits podem opcionalmente proporcionar componentes adicionais, como tampões e informações

interpretativas. O presente pedido também proporciona artigos de fabricação, que incluem frascos (tais como frascos selados), garrafas, jarros, embalagens flexíveis e semelhantes.

**[0414]** O artigo de fabricação pode compreender um recipiente e um rótulo ou bula no ou associado com o recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, *etc.* Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais como o vidro ou plástico. Geralmente, o recipiente mantém uma composição que é eficaz para tratar uma doença ou distúrbio (tal como câncer) aqui descrita e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco para injetáveis com uma rolha perfurante por uma agulha de injeção hipodérmica). O rótulo ou bula indica que a composição é usada para tratar a condição específica em um indivíduo. O rótulo ou bula incluirá ainda instruções para administrar a composição ao indivíduo. O rótulo pode indicar instruções para reconstituição e/ou uso. O recipiente que contém a composição farmacêutica pode ser um frasco de uso múltiplo, que permite administrações repetidas (*por exemplo* de 2-6 administrações) da formulação reconstituída. Bula refere-se às instruções habitualmente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contraindicações e/ou avisos quanto ao uso de tais produtos terapêuticos. Adicionalmente, o artigo de fabricação pode compreender ainda um segundo recipiente, compreendendo um tampão farmacêuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode incluir ainda outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

**[0415]** Os kits ou o artigo de fabricação podem incluir doses unitárias múltiplas da composição farmacêutica e instruções de uso, empacotadas em quantidades suficientes para armazenamento e uso em farmácias, por exemplo, farmácias hospitalares e farmácias de composição.

**[0416]** Os exemplos e as modalidades exemplificativas abaixo pretendem ser puramente exemplificativos da invenção e, portanto, não devem ser considerados como limitativos da invenção de qualquer maneira. Os seguintes exemplos e modalidades exemplificativas são oferecidos a título de ilustração e não como limitação.



### **VIII. Modalidades exemplificativas**

[0417] A invenção proporciona as seguintes modalidades:

[0418] Modalidade 1. Um anticorpo de domínio único anti-BCMA (sdAb), compreendendo qualquer um dos seguintes: (1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:77; (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:78; (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:79; (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:80; (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:81; (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:82; (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:83; (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84; (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:85; (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:86; (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49; e uma CDR3

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:87; (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:88; (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:89; (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:52; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:90; (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:91; (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:92; (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:93; (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:94; (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:95; (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:96; (21) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:97; (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22; uma CDR2

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:98; (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:99; (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100; (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:101; (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:102; (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:103; (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:104; (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:105; (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:106; (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:69; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:107; (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:108; (33) uma CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:109; (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:110; (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:111; (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:112; (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113; or (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:114.

**[0419]** Modalidade 2. O sdAb anti-BCMA da modalidade 1, em que o sdAb anti-BCMA compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 115-152.

**[0420]** Modalidade 3. Um anticorpo anti-BCMA que compete com o sdAb anti-BCMA da modalidade 1 ou 2.

**[0421]** Modalidade 4. O anticorpo anti-BCMA da modalidade 3, em que o anticorpo anti-BCMA é um sdAb.

**[0422]** Modalidade 5. O sdAb anti-BCMA de qualquer uma das modalidades 1, 2 e 4, em que o sdAb anti-BCMA é um anticorpo camélideo.

**[0423]** Modalidade 6. O sdAb anti-BCMA de qualquer uma das modalidades 1, 2 e 4, em que o sdAb anti-BCMA é um anticorpo quimérico.

**[0424]** Modalidade 7. O sdAb anti-BCMA de qualquer uma das modalidades 1, 2 e 4, em que o sdAb anti-BCMA é humanizado.

[0425] Modalidade 8. O sdAb anti-BCMA de qualquer uma das modalidades 1-2 e 4-7, em que o sdAb anti-BCMA é um fragmento V<sub>H</sub>H.

[0426] Modalidade 9. Receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo o sdAb anti-BCMA de qualquer uma das modalidades 1-2 e 4-7; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular.

[0427] Modalidade 10. O CAR da modalidade 9, em que o domínio de ligação de antígeno extracelular compreende pelo menos dois sdAbs anti-BCMA.

[0428] Modalidade 11. Receptor de antígeno quimérico multivalente (CAR), caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo compreendendo:(a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo pelo menos duas frações de ligação ao BCMA; (b) um domínio transmembranar; e (c) um domínio de sinalização intracelular.

[0429] Modalidade 12. O CAR multivalente da modalidade 11, em que o domínio de ligação ao antígeno extracelular compreende uma primeira fração de ligação ao BCMA e uma segunda fração de ligação ao BCMA.

[0430] Modalidade 13. O CAR multivalente da modalidade 12, em que uma ou mais da primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um sdAb.

[0431] Modalidade 14. O CAR multivalente da modalidade 12 ou 13, em que a primeira fração de ligação ao BCMA é um primeiro sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um segundo sdAb anti-BCMA.

[0432] Modalidade 15. O CAR multivalente da modalidade 12 ou 13 a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é derivada de um anticorpo humano.

[0433] Modalidade 16. O CAR multivalente da modalidade 12 ou 13, em que a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um ligando de polipeptídeo de BCMA.

[0434] Modalidade 17. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12 a 16, em que a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA ligam-se especificamente ao mesmo epítipo no BCMA.

[0435] Modalidade 18. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12-16, em que a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA se ligam especificamente a epítipos diferentes em BCMA.

[0436] Modalidade 19. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12 a 18, em que a primeira fração de ligação ao BCMA e/ou a segunda fração de ligação ao BCMA ligue-se especificamente a um epítopo em BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs:388-394.

[0437] Modalidade 20. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12 a 19, em que uma ou mais da primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é o sdAb anti-BCMA da modalidade 1.

[0438] Modalidade 21. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12 a 20, em que a primeira fração de ligação ao BCMA está localizada no N-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA.

[0439] Modalidade 22. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12 a 20, em que a primeira fração de ligação ao BCMA está localizada no C-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA.

[0440] Modalidade 23. O CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 12-22, em que a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA são fundidas entre si através de um ligante peptídico.

[0441] Modalidade 24. O CAR multivalente da modalidade 23, em que o ligante peptídico não tem mais de cerca de 50 aminoácidos de comprimento.

[0442] Modalidade 25. O CAR multivalente da modalidade 24, em que o ligante peptídico compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:208-215.

[0443] Modalidade 26. O CAR ou o CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 9 a 25, em que o domínio transmembranar é derivado de uma molécula selecionada do grupo que consiste em CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1.

[0444] Modalidade 27. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 26, em que o domínio transmembranar é derivado de CD8 $\alpha$  ou CD28.

[0445] Modalidade 28. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 27, em que o domínio transmembranar compreende a sequência de aminoácidos de SED ID NO:193 ou 194.

[0446] Modalidade 29. O CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 9 a 28, em que o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune.



[0447] Modalidade 30. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 29, em que o domínio transmembranar é derivado de CD3 $\zeta$ .

[0448] Modalidade 31. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 30, em que o domínio de sinalização intracelular primário compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:197 ou 198.

[0449] Modalidade 32. O CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 9-31, em que o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador.

[0450] Modalidade 33. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 32, em que o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos.

[0451] Modalidade 34. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 33, o domínio de sinalização coestimulador compreende um domínio citoplasmático de CD28 e/ou um domínio citoplasmático de CD137.

[0452] Modalidade 35. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 34, em que o domínio de sinalização coestimulador compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:195 e/ou SEQ ID NO:196.

[0453] Modalidade 36. O CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 32 a 35, em que o domínio de sinalização intracelular compreende pelo menos dois domínios de sinalização coestimuladores.

[0454] Modalidade 37. O CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 9 a 36, compreendendo ainda um domínio de dobradiça localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar.

[0455] Modalidade 38. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 37, em que o domínio de dobradiça é derivado de CD8 $\alpha$ .

[0456] Modalidade 39. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 38, em que o domínio de dobradiça compreende a sequência de aminoácidos de SED ID NO:192.

[0457] Modalidade 40. O CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 9 a 39, compreendendo ainda um peptídeo de sinal localizado no N-terminal do polipeptídeo.

[0458] Modalidade 41. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 40, em que o peptídeo de sinal é derivado de CD8 $\alpha$ .



[0459] Modalidade 42. O CAR ou CAR multivalente da modalidade 41, em que o peptídeo de sinal compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:191.

[0460] Modalidade 43. Um receptor de antígeno quimérico compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:216-256 e 298-335.

[0461] Modalidade 44. Um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica o CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 11 a 43.

[0462] Modalidade 45. Um ácido nucleico isolado da reivindicação 44, compreendendo uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:257-297 e 336-373.

[0463] Modalidade 46. O ácido nucleico isolado da modalidade 45, compreendendo ainda uma segunda sequência de ácido nucleico que codifica um segundo CAR, em que a sequência de ácido nucleico que codifica o CAR está operacionalmente ligada à segunda sequência de ácido nucleico através de uma terceira sequência de ácido nucleico que codifica um peptídeo de autoclivagem.

[0464] Modalidade 47. O ácido nucleico isolado da modalidade 46, o peptídeo de autoclavagem é selecionado do grupo que consiste em T2A, P2A e F2A.

[0465] Modalidade 48. O ácido nucleico isolado da modalidade 47, a terceira sequência de ácido nucleico é a SEQ ID NO:385.

[0466] Modalidade 49. O ácido nucleico isolado de qualquer uma das modalidades 44-48, o ácido nucleico isolado é uma molécula de RNA.

[0467] Modalidade 50. Um vetor compreendendo o ácido nucleico isolado de qualquer uma das modalidades 44 a 49.

[0468] Modalidade 51. O vetor da modalidade 50, em que o vetor é um vetor de expressão.

[0469] Modalidade 52. O vetor da modalidade 50 ou 51, em que o vetor é um vetor viral.

[0470] Modalidade 53. O vetor da modalidade 52, em que o vetor é um vetor lentiviral.

[0471] Modalidade 54. O vetor da modalidade 50 ou 51, em que o vetor é um vetor não viral.

[0472] Modalidade 55. Uma célula efetora imune engenheiradas, compreendendo o CAR ou CAR multivalente de qualquer uma das modalidades 9 a 43, o ácido nucleico isolado de qualquer uma das modalidades 44 a 49, ou o vetor de qualquer uma das modalidades 50 a 54.

[0473] Modalidade 56. A célula efetora imune engenheirada da modalidade 55, em que a célula efetora imune engenheirada é uma célula T, uma célula NK, uma célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma célula-tronco hematopoiética, uma célula-tronco pluripotente ou uma célula-tronco embrionária.

[0474] Modalidade 57. A célula efetora imune engenheirada da modalidade 56, em que a célula efetora imune é uma célula T.

[0475] Modalidade 58. Uma composição farmacêutica, compreendendo a célula efetora imune engenheirada de qualquer uma das modalidades 55 a 57 e um transportador farmacêuticamente aceitável.

[0476] Modalidade 59. Um método de tratamento de câncer num indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica da modalidade 58.

[0477] Modalidade 60. O método da modalidade 59, em que o câncer é mieloma múltiplo.

[0478] Modalidade 61. O método da modalidade 60, em que o câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado.

[0479] Modalidade 62. O método de qualquer uma das modalidades 59 a 61, em que a célula efetora imune engenheirada é autóloga.

[0480] Modalidade 63. O método de qualquer uma das modalidades 59 a 61, em que a célula efetora imune engenheirada é alogênica.

[0481] Modalidade 64. O método de qualquer uma das modalidades 59 a 63, em que o indivíduo é humano.

[0482] Modalidade 65. O método de qualquer uma das modalidades 59-64, em que a composição farmacêutica é administrada intravenosamente.

[0483] Modalidade 66. O método de qualquer uma das modalidades 59 a 65, em que a composição farmacêutica é administrada a uma dose de cerca de  $1 \times 10^5$  a cerca de  $1 \times 10^7$  células/kg.

[0484] Modalidade 67. O método de qualquer uma das modalidades, 59 a 66, em que a composição farmacêutica é administrada em 3 doses divididas durante cerca de uma semana.

[0485] Modalidade 68. Uso da composição farmacêutica da modalidade 58 para tratar o câncer em um indivíduo.

[0486] Modalidade 69. Uso da composição farmacêutica da modalidade 58 na preparação de um medicamento para tratar o câncer em um indivíduo.

[0487] Modalidade 70. Uma composição farmacêutica, compreendendo o sdAb anti- BCMA de qualquer uma das modalidades 1 a 8.

[0488] Modalidade 71. Um método de tratamento de uma doença num indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica da modalidade 70.

[0489] Modalidade 72. O método da modalidade 71, em que a doença é câncer.

## EXEMPLOS

[0490] Os exemplos discutidos abaixo pretendem ser puramente exemplificativos da invenção e não devem ser considerados como limitativos da invenção de qualquer forma. Os exemplos não pretendem representar que as experiências abaixo são todas ou as únicas experiências realizadas. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperaturas *etc.*) mas alguns erros experimentais e desvios devem ser contabilizados. A menos que indicado de outra forma, as partes são partes em peso, peso molecular é o peso molecular médio, temperatura é em graus centígrados e pressão é atmosférica ou próxima à atmosférica.

### **Exemplo 1. Preparação de sdAbs anti-BCMA**

[0491] Para desenvolver sdAbs com alta afinidade de ligação ao BCMA, lhamas foram imunizadas com um antígeno BCMA recombinante. Uma biblioteca de exibição de fagos foi então construída para identificar líderes V<sub>H</sub>H. Clones distintos foram colhidos aleatoriamente e foram classificados de acordo com a região de determinação da complementaridade da cadeia pesada 3 (CDR3), uma região que pode desempenhar um papel importante na ligação do antígeno. Um protocolo exemplificativo é descrito abaixo. Outros protocolos para preparar sdAbs foram descritos. Ver, por exemplo, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 2014; 9(3):674.

#### **1. Ensaio de imunização animal e resposta imune**

##### **1.1 Imunização animal**

[0492] Um imunógeno compreendendo uma proteína BCMA humana recombinante com uma etiqueta Fc C-terminal (ACRO Biosystems, Cat No. :BC7-H5254) foi misturado com

adjuvante ou PBS e injetado em lhamas. Os animais foram imunizados pelo vendedor de serviços (Cedarline) por sete vezes, tipicamente com 200 µg de imunógeno e CFA (adjuvante completo de Freund) a cada intervalo de aproximadamente 1 semana a 2 semanas. As amostras de sangue foram coletadas na fase de pré-imunização e após a 5ª e a 7ª imunização. Após várias rodadas de imunização, as reações imunes das lhamas contra o antígeno alvo foram avaliadas para confirmar o título de sdAbs específicos de antígeno. Os linfócitos foram isolados por centrifugação em gradiente de cerca de 100 ml de sangue periférico. As células foram suplementadas com RNALATER™ e armazenadas a -80°C. Os soros foram obtidos por centrifugação de amostras de sangue anticoagulado e armazenados a -80°C.

## 1.2 Fracionamento de IgG

[0493] O fracionamento da subclasse IgG foi realizado de acordo com o Procedimento Operacional Padrão da GenScript. As subclasses de IgG foram fracionadas a partir de soro de sangramento terminal utilizando as proteínas Proteína G e Proteína A. A amostra de soro de 1 ml foi carregada sobre uma coluna de 1 ml HITRAP® de Proteína G HP, e a coluna foi lavada com 10 ml de tampão de fosfato (20 mM, pH 7,0). A fração IgG3 (PM 100,000 Da) foi eluída com NaCl 0,15 M, ácido acético 0,58% (pH 3,5), e o eluato foi neutralizado com Tris-HCl 1 M (pH 9,0) até pH 7,4. Posteriormente, a fração IgG1 (PM 170,000 Da) foi eluída com glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7) e o eluato foi neutralizado com Tris-HCl 1 M (pH 8,5) até pH 7,4. O fluxo de coluna HITRAP® de Proteína G HP foi então carregado em uma coluna de 1 ml HITRAP® de Proteína A HP, e a coluna foi lavada com 20 ml de tampão de fosfato (20 mM, pH 7,0). A fração IgG2 (MW 100,000 Da) foi eluída com NaCl 0,15 M, ácido acético 0,58% (pH 4,5), e o eluato foi neutralizado com Tris-HCl 1 M (pH 9,0) até pH 7,4. As concentrações dos anticorpos purificados de IgG1, IgG2 e IgG3 foram determinadas por OD280 e a pureza de cada uma foi avaliada por análise SDS-PAGE redutora e não redutora.

## 1.3 Ensaio de resposta imune

[0494] A resposta imune das lhamas foi avaliada por ELISA, no qual as amostras de soro e IgG purificadas foram testadas quanto à ligação a imunógenos imobilizados. A pré-imunização coletada de soros, após a 5ª imunização e no sangramento terminal foi avaliada. O antígeno (*i. e.*, proteína de antígeno humano recombinante) foi diluído em

tampão de revestimento a 4 µg/ml. A placa de microtitulação foi revestida com antígeno diluído a 4°C durante a noite. A placa foi então lavada 3 vezes com tampão de lavagem seguido de bloqueio à temperatura ambiente durante 2 horas. A placa foi subsequentemente lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Uma série de soros ou IgG diluídos foram adicionados à placa e incubados à temperatura ambiente durante 1,5 horas. A placa foi então lavada 4 vezes com tampão de lavagem. O anticorpo secundário IgG anti-lhama conjugado com HRP foi adicionado à placa e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a lavagem, o substrato de TMB foi adicionado a cada poço e incubado durante 10 minutos antes de parar com HCl 1 M. Para quantificar a ligação, mediu-se a absorbância a 450 nm para cada poço utilizando um espectrômetro MK3.

## **2. Construção de biblioteca de exibição de fago de V<sub>H</sub>H**

### **2.1 Extração de RNA**

[0495] O RNA total foi extraído dos linfócitos isolados (de 1.1.1) usando Reagente TRIZOL<sup>®</sup> de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel e quantificadas medindo a absorbância a OD260/280.

### **Amplificação 2. 2 RT-PCR e V<sub>H</sub>H**

[0496] O RNA total foi transcrito reverso em cADN com um iniciador oligo(dT)<sub>20</sub> usando Kit de Síntese de cDNA de 1<sup>a</sup> Fita PRIMESCRIPT<sup>™</sup> de acordo com o protocolo do fabricante. Seis iniciadores degenerados para frente e dois reversos específicos foram projetados para amplificar os fragmentos V<sub>H</sub>H, que tinham dois sítios de restrição BglI introduzidos. Os fragmentos V<sub>H</sub>H foram amplificados de acordo com o procedimento operacional padrão da GenScript conforme descrito abaixo.

[0497] As regiões variáveis das imunoglobulinas de cadeias pesadas (*isto é*, V<sub>H</sub>Hs) foram amplificadas usando uma reação em cadeia da polimerase em duas etapas (PCR). No primeiro PCR, misturou-se 100 ng de molde de cDNA com iniciadores CALL001 (SEQ ID NO:374) e CALL002 (SEQ ID NO:375). Os produtos de DNA da primeira reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Após a purificação em gel, os produtos de DNA do primeira PCR foram utilizados como modelos no segundo PCR. O segundo PCR foi realizado com os iniciadores BACK-1 (SEQ ID NO:376), BACK-2 (SEQ ID NO:377) e PMCF (SEQ ID NO:378). Os segundos produtos amplificados de PCR que

contêm os fragmentos de PCR V<sub>H</sub>H foram purificados em gel e digeridos por enzima, e depois inseridos em plasmídeos fagemídeos. Os plasmídeos recombinantes com fragmentos de gene V<sub>H</sub>H foram eletrotransferidos para células *E. coli* para gerar a biblioteca imune de exibição de fagos V<sub>H</sub>H.

[0498] O procedimento da reação de PCR tem uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 1 min; e seguido de uma etapa de extensão final a 72°C por 7 min.

### **2. 3 Construção de biblioteca de fago**

[0499] Os produtos de PCR V<sub>H</sub>H foram obtidos por amplificação usando diferentes pares de iniciadores. Os produtos de PCR foram então digeridos com BglI e purificado em gel. Os fragmentos purificados em gel foram inseridos no vetor de fagemídeo interno da GenScript. Foi construída uma biblioteca piloto para otimizar as condições de ligação e transformação. As condições otimizadas de ligação e transformação foram empregadas para desenvolver a biblioteca de fagemídeos. Uma pequena porção das células transformadas foi diluída e listada em placas de 2 x YT suplementadas com 100 µg/ml de ampicilina. As colônias foram contadas para calcular o tamanho da biblioteca. Clones positivos foram selecionados aleatoriamente e sequenciados para avaliar a qualidade da biblioteca. O resto das células transformadas foram listadas em placas de YT suplementadas com 100 µg/ml de ampicilina e 2% de glicose. Partes de colônias foram raspados dos pratos. Uma pequena alíquota das células foi utilizada para o isolamento do plasmídeo da biblioteca. O resto foi suplementado com glicerol e armazenado a -80°C como estoque.

## **3. Panning para exibição de fago**

### **3.1 Biopanning**

[0500] A biblioteca de fago V<sub>H</sub>H construída foi analisada contra proteína BCMA humana recombinante e células CHO que expressam BCMA humano (*isto é*, células CHO-BCMA, preparadas internamente pela Legend Biotec), respectivamente, usando um procedimento padrão desenvolvido pela GenScript. O estoque da biblioteca cresceu até a fase logarítmica e, em seguida, a biblioteca foi resgatada com o fago auxiliar M13KO7 e foi amplificada durante a noite a 25°C num agitador. O fago foi então precipitado com PEG/NaCl, ressuspenso em PBS e armazenado a -80°C. Para panning em fase sólida, os

poços das microplacas foram revestidos com proteína BCMA humana recombinante em PBS a 4°C durante a noite. Para a filtração em fase líquida, as células CHO-BCMA foram bloqueadas com tampão de bloqueio à temperatura ambiente durante 1 hora. Durante a etapa de revestimento ou bloqueio, as partículas de fago foram pré-incubadas com o tampão de bloqueio e a proteína de controle Fc em poços de microplacas. Após a pré- incubação, as partículas de fago foram adicionadas aos poços revestidos com proteínas BCMA ou solução CHO-BCMA respectivamente e incubadas durante 1 hora. Após a incubação, os fagos unidos e não ligados especificamente foram lavados lavando os poços ou as células CHO-BCMA com PBST por seis vezes suplementado com duas lavagens adicionais de PBS. As partículas de fago ligadas foram eluídas por trietilamina 100 mM (TEA), e o eluato foi neutralizado por Tris-HCl 1 M (pH 7,4). Metade do eluato foi usado para infectar crescimento exponencial de células *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> = 0,4~ 0,6) para titulação de saída.

### **3.2 ELISA de fagos**

**[0501]** O ELISA de fagos foi realizado para identificar clones específicos dos antígenos alvo. Os clones de fagos de saída individual foram cultivados em placas de 96 poços profundos e resgatados por fagos auxiliares M13KO7 durante a noite. Para identificar clones que se ligam a proteínas de antígeno, as placas de microtitulação ELISA de 96 poços foram revestidas com proteína de BCMA humano recombinante e proteína de controle Fc, respectivamente, em tampão de revestimento durante a noite a 4°C e as placas foram então bloqueadas com tampão de bloqueio. Após o bloqueio, aproximadamente 50 µl por poço do sobrenadante do fago da cultura de células durante a noite foi adicionado às placas durante 1,5 horas de incubação a 4°C. As placas foram lavadas quatro vezes e o anticorpo monoclonal anti-M13 conjugado com HRP foi adicionado às placas durante 45 minutos de incubação a 4°C. As placas foram novamente lavadas cinco vezes e a solução de substrato foi adicionada aos poços para desenvolvimento. A absorção a 450 nm foi medida para cada poço.

**[0502]** Para identificar os clones que se ligam às células CHO-BCMA, as células CHO-BCMA foram bloqueadas com tampão de bloqueio à temperatura ambiente durante 1 hora. Após o bloqueio, adicionou-se aproximadamente 20 µl por poço de sobrenadante de fago da cultura celular durante a noite às soluções celulares durante 1 hora de incubação à temperatura ambiente. Após as células serem lavadas 4 vezes, o anticorpo monoclonal anti-



M13 conjugado com HRP foi adicionado durante 30 minutos de incubação à temperatura ambiente. As células foram lavadas cinco vezes e a solução de substrato foi então adicionada para o desenvolvimento. A absorção foi medida a 450 nm. Após o panning, clones de fagos positivos para ELISA foram selecionados aleatoriamente e o DNA foi preparado a partir de fagos de saída usando kits de extração de plasmídeo. Os V<sub>H</sub>Hs anti- BCMA nos plasmídeos foram sequenciados.

### **Exemplo 2. Preparação de receptores de antígeno quimérico de BCMA monovalentes exemplificativos**

[0503] Uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de espinha dorsal de CAR que compreende do N-terminal ao C-terminal: um domínio de dobradiça CD8 $\alpha$ , um domínio transmembranar CD28, um domínio citoplasmático CD28, um domínio citoplasmático CD137 e um domínio citoplasmático CD3 $\zeta$  foram sintetizados quimicamente e clonados num vetor lentiviral pré-modificado a jusante e operacionalmente ligados a um promotor constitutivo de hEF1 $\alpha$ . O vetor de espinha dorsal de CAR resultante foi denominado “PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373”. Os sítios de multiclonagem (MCS) no vetor permitiram a inserção de uma sequência de ácido nucleico compreendendo uma sequência de Kozak (SEQ ID NO:379) operacionalmente ligada a uma sequência de ácido nucleico codificando um peptídeo de sinal CD8 $\alpha$  fundido com o N-terminal de um fragmento V<sub>H</sub>H no vetor PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373, a montante e operacionalmente ligado à sequência de espinha dorsal de CAR.

[0504] Para construir um CAR monoespecífico com um único domínio V<sub>H</sub>H usando a espinha dorsal PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373, a sequência de ácido nucleico que codifica ao domínio V<sub>H</sub>H estava operacionalmente ligada ao 3' da sequência de ácido nucleico que codifica o peptídeo de sinal CD8 $\alpha$ . A sequência de ácido nucleico de fusão foi sintetizada quimicamente e clonada na espinha dorsal de CAR PLLV-HEF1a-8281373 via EcoRI (SEQ ID NO:380:5'-GAATTC-3') e SpeI (SEQ ID NO: 381:sítios de restrição 5'- ACTAGT-3') por técnicas de clonagem molecular conhecidas na técnica. A Tabela 4 lista os vetores que foram construídos para expressar os CARs anti-BCMA monovalentes monoespecíficos exemplificativos.

[0505] Para facilitar a inserção adicional de sequências adicionais, como um nucleotídeo que codifica um segundo V<sub>H</sub>H, ao projetar um construto de CAR

monoespecífico, sítios de restrição incluindo HpaI (SEQ ID NO:382:5'-GTTAAC-3'), MluI (SEQ ID NO:383:5'-ACGCGT-3'), NsiI (SEQ ID NO:384:5'-ATGCAT-3') os sítios foram incluídos entre a sequência de ácido nucleico do peptídeo de sinal CD8 $\alpha$  e a sequência V<sub>H</sub>H de ácido nucleico.

**[0506]** A mistura de plasmídeo de empacotamento de lentivírus incluindo pCMV- $\Delta$ R-8.74 e pMD2.G (Addgene #12259) foi pré-misturada com os vetores PLLV-hEF1a-8281373 tendo fragmentos V<sub>H</sub>H numa razão pré-otimizada com polieterimida (PEI), depois misturou-se adequadamente e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. A mistura de transfecção foi então adicionada gota a gota às células HEK293 e misturada suavemente. Depois, as células foram incubadas durante a noite a 37°C e 5% de incubador de células com CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação a 4°C, 500 g durante 10 min.

**[0507]** Os sobrenadantes contendo vírus foram filtrados através de um filtro PES de 0,45  $\mu$ m, seguido de ultracentrifugação para concentração de lentivírus. Após ultracentrifugação, os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os grânulos de vírus foram enxaguados com precaução com DPBS pré-resfriado. O vírus foi dividido em alíquotas corretamente, depois armazenado a -80°C imediatamente. O título do vírus foi determinado pela p24 com base no kit HTRF desenvolvido pela GenScript.

#### **Preparação de PBMC:**

**[0508]** Os leucócitos foram coletados de doadores saudáveis por aférese e a concentração celular foi ajustada para 5 $\times$ 10<sup>6</sup> células/ml em meio R10. Os leucócitos foram então misturados com solução de NaCl a 0,9% a uma razão de 1:1 (v/v). O meio de linfoprep de 3 ml foi adicionado a um tubo de centrífuga de 15 ml e 6 ml de mistura de linfócitos diluídos foram lentamente em camadas em cima do meio de linfoprep. A mistura de linfócitos foi centrifugada a 800 g durante 30 minutos sem paradas a 20°C. A camada leucocitária de linfócitos foi então recolhida com uma pipeta de 200  $\mu$ l. A fração colhida foi diluída pelo menos 6 vezes com 0,9% de NaCl ou R10 para reduzir a densidade da solução. A fração colhida foi então centrifugada a 250g durante 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi aspirado completamente, e 10 ml de R10 foram adicionados ao pelete celular para ressuspender o pelete celular. A mistura foi ainda centrifugada a 250 g durante 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi novamente aspirado. Foram adicionados 2 ml de R10 pré-aquecidos a 37°C com 100 UI/ml de IL-2 ao pelete celular e o pelete celular foi

ressuspensão suavemente. O número da célula foi determinado após a coloração com Trypan Blue, e esta amostra de PBMC estava pronta para experiências posteriores.

### **Purificação de células T**

[0509] As células T humanas foram purificadas a partir de PBMCs usando o kit de isolamento de células T de Miltenyi Pan (Cat # 130-096-535), seguindo o protocolo do fabricante conforme descrito abaixo. O número de célula foi primeiro determinado e a suspensão celular foi centrifugada a 300 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi então aspirado completamente, e os peletes celulares foram ressuspensos em 40 µl de tampão por  $10^7$  células totais. 10 µl de coquetel de biotina-anticorpo Pan T Cell foi adicionado por  $10^7$  células totais, misturado completamente e incubado por cerca de 5 minutos no refrigerador (2~8°C). 30 µl de tampão foi então adicionado por  $10^7$  células. Adicionaram-se 20 µl de Cocktail MicroBead de Pan T Cell por  $10^7$  células. A mistura de suspensão de células foi bem misturada e incubada durante mais 10 minutos no refrigerador (2~8°C). É necessário um mínimo de 500 µl para a separação magnética. Para a separação magnética, uma coluna LS foi colocada no campo magnético de um separador MACS adequado. A coluna foi preparada lavando com 3 ml de tampão. A suspensão celular foi então aplicada na coluna, e coletou-se fluxo através de células não marcadas, o que representou as frações de células T enriquecidas. As células T adicionais foram recolhidas lavando a coluna com 3 ml de tampão e coletando células não marcadas que passam. Essas células não marcadas representaram novamente as células T enriquecidas, e foram combinadas com o fluxo da etapa anterior. As células T enriquecidas agrupadas foram então centrifugadas e novamente suspensas em R10 + 100 UI/ml de IL-2.

[0510] As células T preparadas foram subsequentemente pré-ativadas por 48-96 horas com kit de ativação/expansão de células T humanas (Miltenyi #130-091-441) de acordo com o protocolo do fabricante em que as partículas de MACSiBead anti-CD3/CD28 foram adicionadas em uma razão de grânulo para célula de 1:2.

### **Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

[0511] As células T pré-ativadas foram transduzidas com estoque de lentivírus na presença de 7 µg/ml de polibreno com centrifugação a 1200 g, 32°C durante 1,5 h. As células transduzidas foram então transferidas para a incubadora de cultura celular para expressão de transgene em condições adequadas.

**[0512]** No dia 3 ou no dia 7 pós-transdução, as células T transduzidas foram colhidas e coincubadas com células tumorais numa razão de células efetoras (CAR-T) para células alvo de 20:1 durante 20 horas. As células alvo foram linhagem de células de mieloma múltiplo humano RPMI8226.Luc, células da linhagem celular humana K562.BCMA.Luc que expressam recombinantemente BCMA, K562. CD19. Linhagem celular Luc que expressa de forma recombinante CD19, ou células da linhagem celular de glioblastoma humano U87MG.Luc. Todas as linhagens celulares foram engenheiradas internamente para expressar a luciferase do pirilampo. Para testar a citotoxicidade de CAR-T em células tumorais, os reagentes de ensaio de luciferase luminescente ONE-GLO™ (Promega#E6110) foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante e adicionados às células cocultivadas para detectar a atividade de luciferase restante no poço. Uma vez que a luciferase é expressa apenas nas células alvo, a atividade de luciferase restante no poço se correlaciona diretamente com o número de células alvo viáveis no poço. A atividade de luciferase máxima foi obtida pela adição de meios de cultura a células alvo na ausência de células efetoras. A atividade mínima de luciferase foi determinada pela adição de Triton X-100 numa concentração final de 1% no momento em que os ensaios de citotoxicidade foram iniciados. A citotoxicidade específica foi calculada pela fórmula: % de Citotoxicidade específica =  $100\% * (1 - (RLU_{\text{sample}} - RLU_{\text{min}}) / (RLU_{\text{max}} - RLU_{\text{min}}))$ .

**[0513]** CAR exemplificativos monovalentes que direcionam BCMA (CD269) foram selecionados e testados no ensaio de citotoxicidade. Como mostrado na FIG. 1A, entre um primeiro grupo de CARs BCMA monovalentes testados, os clones selecionados exibiram diferentes níveis de citotoxicidade contra células da linhagem celular de mieloma múltiplo RPMI8226.Luc, com mais que 60% de CAR-Ts baseados em V<sub>H</sub> H mostrando > 50% de citotoxicidade contra células RPMI8226.Luc. O CAR-T baseado nos clones 269A37346, 269A37348, 269A37353 e 269A37355 foram selecionados para testes adicionais. Em particular, o CAR-T baseado nos clones 269A37346, 269A37348, 267A37353 e 269A37355 exibiu potente citotoxicidade contra a linhagem celular RPMI8226.Luc de células de mieloma múltiplo com mais que 20% a 30% em morte celular de RPMI8226.Luc por tratamento com CAR-T em comparação com as células T de controle não transduzidas (UnT). No entanto, tal aumento de citotoxicidade não ocorreu contra as células U87MG.Luc de linhagem celular de glioblastoma humano (ver FIG. 1B). Não foram detectados efeitos significativos de citotoxicidade contra U87MG.Luc por estas

células T-CAR monovalentes baseadas em V<sub>H</sub>H em comparação com controles UnT. A observação acima indicou que alguns destes clones podem ser específicos para o alvo e potentes contra células positivas para BCMA.

[0514] Um segundo grupo de CARs BCMA monovalentes exemplificativos foi avaliado para citotoxicidade *in vitro*. O GSS005, um CAR compreendendo um scFv anti-BMCA, serviu como um controle positivo. O GSI026, um CAR compreendendo um scFv anti-EGFRvIII, serviu como controle negativo. Conforme mostrado nas FIGs. 2A-2B, os clones selecionados exibiram diferentes níveis de citotoxicidade contra as células de mieloma múltiplo RPMI8226.Luc e BCMA sobre-expressando a linhagem celular estável K562.BCMA.Luc. Nenhum clone mostrou citotoxicidade potente contra a linhagem celular negativa BCMA K562.CD19.Luc (FIG. 2C). Entre estes clones, os CAR-T baseados em 269B005S, 269B028S, 269B030S, 269B054S, 269B060S, 269B069S, 269B093S, 269B094S, 269B104S, 269B109S, 269B110S e 269B129S foram mais potentes de acordo com os dados de citotoxicidade.

#### **Liberação de IFN $\gamma$**

[0515] Além disso, os sobrenadantes dos ensaios de cocultura *in vitro* foram coletados para avaliar a liberação de citocinas induzidas por CAR, *por exemplo*, liberação de interferon gama (*isto é*, IFN $\gamma$ ). Como mostrado na FIG. 3, as células T expressando CARs BCMA monovalentes selecionadas liberaram altos níveis de IFN $\gamma$  ao cocultivar com células alvo expressando BCMA K562.BCMA.Luc. CAR-Ts não específicos, como GSI026, ou células T não transferidas (UnT) não induziram liberação de IFN $\gamma$  na cocultura. Os dados de liberação de citocinas são consistentes com os dados de citotoxicidade *in vitro*,

#### **Exemplo 3. Preparação de receptores de antígeno quimérico multivalente de BCMA exemplificativos**

[0516] CARs baseados em V<sub>H</sub>H multivalentes podem ser construídos pela clonagem de uma sequência de ácido nucleico que codifica múltiplas cópias de um V<sub>H</sub>H, ou múltiplos V<sub>H</sub>Hs diferentes fundidos entre si através de ligantes peptídicos num vetor de espinha dorsal do domínio de sinal CAR. Exemplos de construtos de CAR BCMA multivalentes são mostrados na Tabela 5. Estes construtos foram preparados por fusão de 2-3 V<sub>H</sub>Hs anti-BCMA por ligantes peptídicos de glicina-serina seguidos pela síntese direta desta

sequência de fusão em combinação com uma sequência de ácido nucleico de peptídeo de sinal Kozak-CD8 $\alpha$ , e clonagem na espinha dorsal de CAR PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373 através de sítios de restrição EcoRI e SpeI. Os construtos de CAR BCMA monovalentes também foram clonados na mesma espinha dorsal de CAR PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373 para servir como controles (*por exemplo*, GSI5011, GSI5019, e GSI5020, Tabela 4).

[0517] Os vetores lentivirais que transportam genes de CAR foram empacotados e titulados com protocolos como descrito no Exemplo 2. Usando os protocolos descritos no Exemplo 2, foram preparadas PBMC humanas a partir de sangue periférico de voluntários para o isolamento adicional de células T primárias humanas usando kits de isolamento de células PanT de Miltenyi. As células T purificadas foram pré-ativadas e expandidas utilizando microgrânulos Miltenyi anti-CD3/CD28 como descrito no Exemplo 2. As células T pré-ativadas foram então transduzidas com estoque de lentivírus na presença de 7  $\mu$ g/ml de polibreno por centrifugação a 1200 g, 32°C durante 1,5 h. As células transduzidas foram então transferidas para a incubadora de cultura celular para expressão de transgene em condições adequadas.

#### **Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

[0518] No dia 3 pós-transdução, as células T transduzidas foram colhidas e coincubadas com células tumorais. Para ensaiar a citotoxicidade de CAR-T em células tumorais, foram adicionados reagentes de ensaio de luciferase luminescente ONE-GLO™ às células cocultivadas e a citotoxicidade específica para cada CAR-T foi medida como descrito no Exemplo 2.

[0519] Em uma primeira experiência, o CAR BCMA monovalente (GSI5011), o CAR BCMA bivalente (GSI5014), e o CAR BCMA trivalente (GSI5015) expressando células T foram cocultivados com células RPMI8226.Luc numa razão efetor para alvo de 20:1 durante 20 horas. Todos os três construtos de CAR compreendem domínios VHH anti- BCMA do clone 269A37346. Como mostrado na FIG. 4A, a porcentagem específica de lise de células RPMI8226.Luc foram 63,25  $\pm$  2,64% por células T-CAR expressando GSI5011, 61,04  $\pm$  2,75% por células T-CAR expressando GSI5014 e 59,57  $\pm$  2,64% por células T-CAR expressando GSI5015, em comparação com 0,05%  $\pm$  2,33% por células T de controle não transduzidas (UnT). Os CARs BCMA testados possuindo diferentes modalidades de ligação ao antígeno tinham potente atividade antitumoral contra células positivas para BCMA.



**[0520]** Numa segunda experiência, CARs BCMA bivalentes exemplificativos (GSI5021-GSI5026) possuindo duas frações de ligação de BCMA diferentes 269A37353 e 269A37917 foram testados. Células T engenheiradas expressando cada CAR BCMA bivalente foram cocultivadas com células RPMI8226.Luc numa razão efetor para alvo de 20:1 durante 20 horas. Os CARs BCMA monovalentes, GSI5019 e GSI5020 também foram testados para comparação. Como mostrado na FIG. 4B, a porcentagem específica de lise de células RPMI8226.Luc foram  $88,21 \pm 1,29\%$  por células T-CAR expressando GSI5019,  $93,84 \pm 1,13\%$  por células T-CAR expressando GSI5020,  $71,45 \pm 1,79\%$  por células T-CAR expressando GSI5021,  $99,80 \pm 0,45\%$  por células T-CAR expressando GSI5022,  $97,46 \pm 0,50\%$  por células T-CAR expressando GSI5023,  $81,29 \pm 1,27\%$  por células T-CAR expressando GSI5024,  $93,50 \pm 0,47\%$  por células T-CAR expressando GSI5025,  $87,83 \pm 0,23\%$  por células T-CAR expressando GSI5026, respectivamente, em comparação com  $13,49\% \pm 1,75\%$  por células T de controle não transduzidas (UnT). Também, como representado na FIG. 4C, a porcentagem específica de lise da linhagem celular U87MG.Luc de BCMA foi  $2,84 \pm 7,41\%$  por células T-CAR expressando GSI5019,  $15,50 \pm 2,24\%$  por células T-CAR expressando GSI5020,  $6,74 \pm 3,37\%$  por células T-CAR expressando GSI5021,  $8,03 \pm 2,36\%$  por células T-CAR expressando GSI5022,  $9,00 \pm 1,88\%$  por células T-CAR expressando GSI5023,  $17,03 \pm 2,27\%$  por células T-CAR expressando GSI5024,  $16,81 \pm 1,98\%$  por células T-CAR expressando GSI5025,  $-11,55 \pm 5,43\%$  por células T-CAR expressando GSI5026, em comparação com  $12,49\% \pm 3,79\%$  por células T de controle não transduzidas (UnT). Os dados sugerem que os CARs bivalentes com diferentes modalidades de ligação ao antígeno possuíam uma atividade antitumoral potente contra células positivas de BCMA, mas não contra células negativas para BCMA.

**[0521]** Em uma terceira experiência, CARs BCMA bivalentes exemplificativos (*isto é*, BCAR001-BCAR008) tendo duas frações diferentes de ligação ao BCMA foram construídos, e as células T-CAR engenheiradas expressando os CARs BCMA bivalentes foram preparadas a partir de células T primárias obtidas a partir do doador paciente R/R MM #13. Linhagens de células que expressam luciferase de pirilampo desenvolvidas internamente, incluindo RPMI8226 (linhagem celular humana do mieloma múltiplo), A549 (linhagem celular de câncer de pulmão humano), U87-MG (linhagem celular de glioblastoma humano) e Raji (linhagem celular de linfoma humano de Burkitt) foram



utilizadas como células alvo e cocultivadas com cada grupo de células T transduzidas lado a lado (com razão de células efectoras:alvo de 20:1 ou 5:1) durante 20 horas em um incubador celular a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Após a conclusão da cocultura, as atividades de luciferase remanescentes (unidade de luz relativa, RLU) foram testadas com kit de ensaio de luciferase luminescente ONE-GLO™ (Promega) para avaliar a citotoxicidade de cada CAR-T. Conforme mostrado nas FIGs. 5A-5E, os CAR-Ts BCMA bivalentes tinham citotoxicidade dependente da dose contra células RPMI8226.Luc, K562.BCMA.Luc e Raji.Luc, mas pouca citotoxicidade contra células A549.Luc e U87-MG. Luc negativas para BCMA. Dados na FIG. 5F demonstram que a citotoxicidade das células T-CAR BCMA bivalentes contra células tumorais são específicas de BCMA, uma vez que as células T-CAR não eram citotóxicas contra células K562. C38. Luc que eram CD38<sup>+</sup>/BCMA<sup>-</sup>. K562.BCMA.Luc tratadas com células T-CAR BCAR001-BCAR008 mostraram apenas atividades limitadas de Luciferase residual (*isto é*, células viáveis) em comparação com células alvo tratadas com UnT (2,88 ± 0,45%, 12,84 ± 1,67%, 2,22 ± 0,56%, 1,77 ± 0,14%, 2,59 ± 0,28%, 6,58 ± 1,19%, 2,47 ± 0,20%, 6,61 ± 1,47 % para o BCAR001-BCAR008, respectivamente, em comparação com o UnT de 100 ± 3,95%, média ± erro padrão). Estes resultados demonstram uma citotoxicidade potente das células T-CAR BCMA bivalentes contra células K562.BCMA.Luc. As células T-CAR BCAR001-BCAR008 não apresentaram citotoxicidade significativa contra células K562. CD38. Luc como não foi detectada uma diminuição significativa na atividade da luciferase em comparação com as células alvo tratadas com UnT (111,82 ± 5,11%, 111,72 ± 3,43%, 104,74 ± 0,24%, 95,04 ± 2,70%, 93,93 ± 7,23%, 97,72 ± 1,86%, 111,90 ± 2,01%, 108,33 ± 4,05%, para BCAR001-BCAR008, respectivamente, em comparação com UnT de 100 ± 6,58%, média ± erro padrão). Estes dados sugerem que a citotoxicidade do CAR-T BCMA bivalente é dependente de BCMA.

### **Liberação de IFN $\gamma$**

[0522] Além disso, sobrenadantes de ensaios de cocultura *in vitro* foram coletados para avaliar a liberação de citocinas induzidas por CAR (*por exemplo*, liberação de interferon gama, IFN $\gamma$ ). Conforme mostrado nas FIGs. 6A-6B, a liberação de IFN $\gamma$  nos ensaios de cocultura foi dependente de CAR e específica de BCMA, o que é consistente com os dados de citotoxicidade *in vitro* (Tabela 6).

**TABELA 6. Liberação de IFN gama em ensaios de cocultura por CAR-T BCMA bivalente**

	RPMI8226.Lu		A549.Luc		K562. CD38. Luc		Raji.Luc	
	Média, pg/ml	s. e.	Média, pg/ml	s. e.	Média, pg/ml	s. e.	Média, pg/ml	s. e.
BCAR00	1097,2							
1	3	61,87	89,18	42,19	135,81	5,87	795,87	7,29
BCAR00	4651,2							
2	2	1,13	503,63	130,73	361,87	49,68	3613,30	34,04
BCAR00	3569,8	108,1						
3	4	9	243,82	1,31	265,08	3,24	3348,66	49,80
BCAR00	3077,4	110,8						
4	1	2	161,70	12,97	128,50	17,08	2931,11	120,3
BCAR00	2850,3							
5	4	20,16	170,90	8,27	141,20	17,54	2976,27	67,22
BCAR00	2023,7							
6	1	37,61	223,96	6,21	215,00	17,87	1588,54	77,96
BCAR00	1912,9							
7	8	2,28	239,43	1,93	289,72	1,94	1472,87	49,76
BCAR00	1798,9							
8	0	76,85	258,71	19,39	171,89	6,51	1526,93	66,70
UnT	281,75	20,55	143,70	10,46	85,65	1,98	328,61	6,69

**Números de cópia de genes CAR integrados**

[0523] Os números de cópia de genes CAR integrados para cada grupo de célula T transduzido foi determinado por um ensaio de PCR semiquantitativo (q-PCR). Resumidamente, o DNA genômico de cada grupo de CAR-T foi preparado com Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). A concentração de DNA genômico foi determinada por Nanodrop, e a amostra de DNA genômico de 10ng foi processada para um ensaio de q-PCR padronizado com SYBR Green Realtime PCR Master mix plus (Toyobo) no instrumento ABI #7300 q-PCR usando iniciadores específicos de CAR (iniciador para

frente 137P2F (SEQ ID NO:398:5'-GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTAT-3'; e iniciador reverso 137P2R, SEQ ID NO:399:5'- TCTTCTTCTTCTGGAAATCGGCA-3'). O número de cópia relativa de cada gene de CAR integrado foi calculado com base em uma curva padrão estabelecida usando plasmídeo contendo sequências alvo.

[0524] Como mostrado na Tabela 7, um elevado número de cópias do vetor CAR foi integrado no genoma das células T em cada preparação de CAR-T.

**TABELA 7. Números de cópia de integração do genoma.**

Células T-CAR construtos	com	Cópias/ng gDNA
GSI5019		35091,6
GSI5020		27627,2
GSI5021		24926,8
GSI5022		26393,6
GSI5023		32376,3
GSI5024		39319,8
GSI5025		22269,3
GSI5026		34790,4
UnT		26,6

**Exemplo 4. Mapeamento de epítomos e ligação de epítomos diferenciais de dois domínios V<sub>H</sub>H em LCAR-B38M**

[0525] Os epítomos dos quatro domínios V<sub>H</sub>H anti-BCMA foram mapeados. Um BCMA CAR bivalente exemplificativo contendo dois domínios V<sub>H</sub>H anti-BCMA diferentes que se ligam especificamente a diferentes epítomos de BCMA foi construído. CAR bivalente/biepítomo compreendendo V<sub>H</sub>H1 e V<sub>H</sub>H2, denominado CAR LCAR-B38M, é um CAR BCMA multivalente listado na Tabela 5.

**Ensaio de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR)**

[0526] Cada uma das quatro sequências V<sub>H</sub>H anti-BCMA exemplificativas foi clonada num vetor contendo uma sequência de fragmento de IgG1 Fc humana (hIgG1Fc) para facilitar a expressão recombinante de V<sub>H</sub>H-hIgG1Fc BCMA. Proteínas recombinantes foram obtidas e purificadas para ensaios de SPR.

[0527] A afinidade de cada V<sub>H</sub>H-hIgG1Fc para BCMA foi determinada por SPR usando um sistema analítico BIACORE® 2000 (GE Healthcare). Resumidamente, cada proteína V<sub>H</sub>H-hIgG1Fc foi covalentemente acoplado a um chip sensor CM5(s) usando 4 µg/ml de V<sub>H</sub>H-hIgG1Fc. A proteína recombinante BCMA-His (ACRO Biosystems, Cat #BCA-H522y) foi diluída em série em tampão de execução (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 a 0,05%, pH 7,4) e injetada a uma taxa de fluxo de 10 µl/min seguido de dissociação. As constantes de taxa de associação e dissociação foram determinadas usando o método de software de avaliação BIACORE® 2000 versão 3.0 (Langmuir binding, local fit, modelo de ligação 1:1). As afinidades de ligação dos quatro V<sub>H</sub>H-hIgG1Fcs são mostradas na Tabela 8.

**TABELA 8. Afinidades de ligação de V<sub>H</sub>H-hIgG1Fcs para proteína BCMA-His humana.**

Ligando	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
V <sub>H</sub> H1-hIgG1Fc	5,5E +04	<1,0E-05*	<1,8E-10*
V <sub>H</sub> H2-hIgG1Fc	1,9E+06	1,5E-02	7,8E-09
V <sub>H</sub> H3-hIgG1Fc	3,4E +04	1,7E-04	5,1E-09
V <sub>H</sub> H4-hIgG1Fc	2,1E +06	9,4E-04	4,6E-10

#### Ligação de proteínas V<sub>H</sub>H-His recombinantes para células-alvo

[0528] Proteínas V<sub>H</sub>H-His anti-BCMA recombinantes foram construídas pela fusão da sequência V<sub>H</sub>H anti-BCMA a uma sequência peptídica sinal de albumina humana (N'-MKWVTFISLLFLFSSAYS-C'; SEQ ID NO:386) no N-terminal, e uma etiqueta 6xHis (N'-GSGHHHHHHH-C'; SEQ ID NO:387) no C-terminal. Os códons foram ainda otimizados para expressão ideal em células hospedeiras de mamíferos. As sequências nucleotídicas obtidas foram então clonadas em um vetor de expressão de mamíferos pTT5 através dos sítios de restrição 5'-XbaI e 3'-HindIII para proporcionar plasmídeos, pTT5-LAB001 (para V<sub>H</sub>H1), pTT5-LAB002 (para V<sub>H</sub>H2) e pTT5-LAB003 (para V<sub>H</sub>H1xV<sub>H</sub>H2).

[0529] De forma a obter proteínas V<sub>H</sub>H BCMA recombinante, as células HEK293T foram transfectadas transitoriamente com os plasmídeos. Resumidamente, 5x10<sup>6</sup> células HEK293T foram semeadas em placas de cultura de células de 10 cm um dia antes da transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas com cada plasmídeo usando Reagente LIPOFECTAMINE™ 2000 (Thermofisher Scientific, No. Cat. :11668-019)

seguindo o manual do fabricante. Quatro dias após a transfecção, o sobrenadante foi colhido e os níveis de expressão dos anticorpos foram detectados por ELISA usando a etiqueta HRP anti-His (Biolegend, No. Cat. :652504). Os níveis de expressão de LAB001, LAB002 e LAB003 foram de 109,31 ng/ml, 152,48 ng/ml e 396,62 ng/ml, respectivamente.

**[0530]** As afinidades de ligação de proteínas V<sub>H</sub>H-His LAB001, LAB002 e LAB003 anti-BCMA foram determinadas utilizando ensaios baseados em células. Resumidamente, as proteínas V<sub>H</sub>H-His anti-BCMA diluídas em série foram incubadas com  $1 \times 10^5$  células alvo (ou células K562.BCMA.Luc ou K562. CD38. Luc, que eram linhagens celulares desenvolvidas internamente expressando estavelmente BCMA ou CD39 respectivamente) a 4°C durante 2 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300g por 10min e o sobrenadante foi descartado. Os peletes celulares foram ressuspensos com DPBS. Os peletes celulares foram lavados, centrifugados e o sobrenadante foi descartado por mais 2 vezes. Em seguida, os peletes celulares foram posteriormente ressuspensos com o anticorpo de detecção (Anticorpo de etiqueta THE<sup>TM</sup> His [FITC], GenScript Cat:A01620) contendo tampões por 45min a 4 °C durante 2 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300g por 10min e o sobrenadante foi descartado. Os peletes celulares foram lavados, centrifugados e o sobrenadante foi descartado por mais 2 vezes. As afinidades de ligação de LAB001, LAB002 e LAB003 às células K562.BCMA.Luc ou K562. CD38. Luc foram determinadas usando um citômetro de fluxo ATTUNE. <sup>TM</sup> Nxt. Os dados foram ajustados pelo GraphPad PRISM<sup>TM</sup> versão 6. 0 usando um “One site - Specific binding with Hill slope”.

**[0531]** Como mostrado na FIG. 7A-7C, LAB001, LAB002 e LAB003 ligam-se especificamente às células K562.BCMA.Luc de uma maneira dependente da dose. As afinidades de ligação são 0,079 nM, 0,035 nM e 0,0047 nM, respectivamente. Nenhum dos anticorpos mostrou ligação significativa à linhagem celular negativa para BCMA K562. CD38. Luc. Além disso, o LAB003 (V<sub>H</sub>H1xV<sub>H</sub>H2) mostrou afinidade de ligação significativamente maior (0,0047nM) do que LAB001 (V<sub>H</sub>H1) ou LAB002 (V<sub>H</sub>H2).

### **Ligação de epítipo**

**[0532]** BCMA (NP\_001183, UniProt #Q02223) é uma proteína transmembranar de 184 aminoácidos de comprimento. O BCMA humano consiste num domínio extracelular (ECD, resíduo amino número 1-54), um domínio transmembranar (TM, resíduo amino número

55-77) e um domínio citoplasmático (CD, resíduo amino número 78-184). Adicionalmente, a análise da sequência sugere que o BCMA não possui peptídeo de sinal reconhecível no seu N-terminal (Laabi Y et al. (1992) EMBO J 11:3897–3904; Laabi Y et al. (1994) Nucleic Acids Res 22:1147–1154; Gras M P (1995) Int Immunol 7:1093–1106; Hong-Bing Shu and Holly Johnson (2000):Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10. 1073).

[0533] Como também ilustrado pelo banco de dados on-line UniProt (worldwide web. uniprot. org/uniprot/Q02223), 3 ligações dissulfeto (Cys-Cys) estão localizadas no ECD do BCMA, que estão nas posições 8 ↔ 21, 24 ↔ 37 e 28 ↔ 41 (Tabela 9). A estrutura secundária do ECD BCMA do N-terminal ao C-terminal consiste numa cadeia beta (aa12-15), uma curva (aa16-19), uma cadeia beta (aa20-23), uma hélice (aa 24 -27), uma cadeia beta (aa30-32), uma hélice (aa35 - 37), uma curva (aa38-40) e uma curva (aa42-44). Uma estrutura do ECD BCMA é mostrada na FIG. 8A, que é replicado a partir da estrutura do banco de dados do PDB em todo o mundo web. ebi. ac. uk/pdbe/entrada/pdb/2kn1/.

**TABELA 9. Sequências de proteínas do BCMA humano.**

Posição(ões)	Descrição	Comprimento	Sequência AA
1 – 54	Domínio extracelular	54	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIP CQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTN SVKGTNA (SEQ ID NO:395)
55 – 77	Domínio transmembrana r	23	ILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLL (SEQ ID NO:396)
78 – 184	Domínio citoplasmático	107	RKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMA NIDLEKSRTGDEIILPRGLETVVEE CTCEDCIKSKPKVDSDFHCFPLPAM EEGATILVTTKTNDYCKSLPAALS ATEIEKSISAR (SEQ ID NO:397)

[0534] Os peptídeos de epítipo BCMA (269EP001-269EP007) foram concebidos como mostrado na FIG. 8B e TABELA 10, e sintetizados quimicamente e biotinizados no N-terminal. As afinidades de ligação de V<sub>H</sub>H1-hIgG1Fc ou V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc foram determinadas usando ELISA. Resumidamente, os peptídeos descritos acima foram

revestidos em placa MAXISORP™ de ELISA a 1 µM durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBST (adicionar 0,5% de TWEEN-20) duas vezes, seguido por bloqueio de placas com BSA a 0,5% à temperatura ambiente durante 1 h. As placas foram então lavadas com PBST duas vezes, seguido pela adição de V<sub>H</sub>H1-hIgG1Fc ou V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc diluídos em série a 10 nM em triplicado, depois incubadas a 4 °C por 2h. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBST frio, após o que anti-Lhama-HRP de cabra (1:1500, Bethyl Lab # A160) foi adicionado a cada poço e posteriormente incubado à temperatura ambiente durante 1 h. As placas foram então lavadas durante 4 vezes com PBST e os substratos TMB foram adicionados a cada poço e incubados à temperatura ambiente durante 10-30 min. As placas foram então lidas em leitor de microplacas TECAN® 10M com absorvância a 450nm.

**TABELA 10. Sequências peptídicas de epítipo de BCMA.**

Epítipo	Posições	Sequência de resíduos de aminoácidos	Comprimento
269EP001	1-10	MLQMAGQCSQ (SEQ ID NO:388)	10
269EP002	8-21	CSQNEYFDSLLHAC (SEQ ID NO:389)	14
269EP003	11-23	NEYFDSLLHACIP (SEQ ID NO:390)	13
269EP004	20-30	ACIPCQLRCSS (SEQ ID NO:391)	11
269EP005	24-42	CQLRCSSNTPPLTCQRYCN (SEQ ID NO:392)	19
269EP006	36-43	LTCQRYCNAS (SEQ ID NO:393)	10
269EP007	43-54	ASVTNSVKGTNA (SEQ ID NO:394)	12

[0535] Como mostrado na FIG. 9A, V<sub>H</sub>H1 mostrou ligação mais forte ao peptídeo 269EP005 seguido pelo peptídeo 269EP004. No entanto, a ligação de V<sub>H</sub>H1 a 269EP003 e 269EP006 foi relativamente fraca em comparação com 269EP005 e 269EP004. V<sub>H</sub>H1 tende a ligar um epítipo localizado no peptídeo 269EP005 (*isto é*, aminoácido 24-36 de BCMA ECD), que contém as estruturas secundárias de uma hélice (aa24-27), uma cadeia beta (aa30-32) e uma hélice (aa35 – 37).

[0536] Como mostrado na FIG. 9B, V<sub>H</sub>H2 mostrou ligação mais forte ao peptídeo 269EP002 seguido pelo peptídeo 269EP003. No entanto, a ligação de V<sub>H</sub>H1 a 269EP001 e 269EP004 foi relativamente fraca em comparação com 269EP002 e 269EP003. Enquanto a



primeira cadeia beta (aa12-15) e a cadeia beta (aa20-23) do ECD BCMA estão localizadas principalmente na sequência abrangida por 269EP002 (aa8-21) e 269EP003 (aa11-23), V<sub>H</sub>H2 tende a ligar-se a um epítipo localizado nas duas primeiras cadeias beta.

#### **Ensaio de ligação competitiva**

**[0537]** A ligação de epítipo diferencial de V<sub>H</sub>H1 e V<sub>H</sub>H2 foi ainda validada por um ensaio de ligação competitiva à base de células. Uma linhagem celular de CHO estável, sobre-expressando BCMA humano (“CHO-BCMA”) foi usada no ensaio.

**[0538]** Resumidamente,  $0,5 \times 10^6$  células CHO-BCMA foram pré-incubadas com 12,5 ng/ml de LAB001 (que contém etiqueta 6xHis no C-terminal) a 4 °C por 0,5h em duplicado. Então o anticorpo V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc recombinante diluído em série foi adicionado a cada poço da placa e incubado a 4 °C por mais 1h. Após a incubação, as células foram lavadas com 500µl de DPBS e centrifugadas a 300g por 10min. Os peletes celulares foram ressuspensos com DPBS contendo etiqueta FITC anti-His (1:200, GenScript Cat:A16020), em seguida, as células foram lavadas com 500µl de DPBS e centrifugadas a 300g por 10min. Os peletes celulares foram ressuspensos com DPBS, e foram então submetidos à análise FACS em um citômetro de fluxo ATTUNE™ Nxt. Como um controle de ensaio, o V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc diluído em série foi diretamente incubado com células CHO-BCMA sem a presença de LAB001 seguindo procedimentos idênticos como acima lado-a-lado. Anticorpo de cabra anti-IgG humana (específico de Fc)-FITC (Sigma Aldrich Cat: F9512) foi utilizado para detectar a ligação de V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc às células CHO-BCMA. Como mostrado na FIG. 10, o V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc sozinho liga-se ao CHO-BCMA de uma maneira dependente da dose. No entanto, o V<sub>H</sub>H2-hIgG1Fc não foi capaz de competir com a ligação de V<sub>H</sub>H1-His a células CHO-BCMA, que indica diferentes sítios de ligação de V<sub>H</sub>H1 e V<sub>H</sub>H2 no BCMA.

#### **Exemplo 5. Eficácia *in vivo* de CAR-T LCAR-B38M em camundongos xenoenxertados**

**[0539]** A eficácia antitumoral *in vivo* de células CAR-T LCAR-B38M foi avaliada em modelo de camundongo NCG (NOD-Prkdc<sup>em26Cd52</sup>Il2rg<sup>em26Cd22</sup>/NjuCr1) com um xenoenxerto de tumor de mieloma múltiplo. O CAR LCAR-B38M é um CAR BCMA bivalente com dois domínios V<sub>H</sub>H anti-BCMA que direcionam diferentes epítipos de BCMA.

**[0540]** O modelo de camundongo NCG foi criado pela edição sequencial de CRISPR/Cas9 dos locos *Prkdc* e *Il2rg* no camundongo NOD/Nju, proporcionando um camundongo coisogênico ao NOD/Nju. O camundongo NOD/Nju transporta uma mutação no gene *Sirpa* (*SIRP  $\alpha$* ) que permite o enxerto de células-tronco hematopoiéticas estranhas. O nocaute de *Prkdc* gera um fenótipo do tipo SCID sem a formação apropriada de células T e células B. O nocaute do gene *Il2rg* exacerba ainda mais o fenótipo do tipo SCID, enquanto adicionalmente resulta em uma diminuição da produção de células NK. Assim, o camundongo NCG é uma cepa de camundongo de imunodeficiência tripla que é mais imunocomprometida do que as cepas de camundongo imunodeficiente normalmente utilizadas, incluindo SCID e camundongos nus.

**[0541]** *Prkdc* e *Il2rg* fazem parte da família de genes SCID (imunodeficiência severa combinada) que afetam a maturação e a formação de células T, células B, células NK e, em menor grau, células dendríticas. *Prkdc* codifica a subunidade catalítica da enzima proteína quinase dependente de DNA, que é necessária para a recombinação V(D)J, um processo necessário para propagar a diversidade de anticorpos em células T e B em maturação. *Il2rg* codifica a subunidade gama comum encontrada em IL-2 e múltiplos receptores de IL (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21), que são necessários para induzir a sinalização mediada por citocinas para maturação de linfócitos imaturos (*por exemplo*, células T, B e NK) e outros leucócitos.

**[0542]** As células T-CAR LCAR-B38M foram preparadas utilizando células T de vários doadores para rastrear a fonte de células T que produz CAR-T com a maior eficácia de matar as células RPMI8226.Luc *in vitro* (FIG. 11). Com base nos resultados da FIG. 11, as células T-CAR LCAR-B38M foram preparadas utilizando células T do doador selecionado para ensaios em animais *in vivo*. A FIG. 12A mostra citotoxicidade *in vitro* dependente da dose deste lote de células T-CAR LCAR-B38M. Para criar o xenoenxerto tumoral, os camundongos NCG foram injetados intravenosamente com células RPMI8226.Luc. 14 dias mais tarde, os camundongos enxertados com tumor foram tratados com as células T-CAR LCAR-B38M ou células T não transduzidas, seguido de imageamento de bioluminescência *in vivo* (BLI).

**[0543]** Conforme mostrado nas FIGs. 12B-12C, as células T-CAR LCAR-B38M foram eficientes para erradicar as células tumorais RPMI8226.Luc enxertadas em camundongos NCG e resgatar os camundongos, enquanto a maioria dos camundongos no grupo de

controle (UnT) morreu dentro de 4 semanas. Curiosamente, durante a autópsia, numerosos tumores metastáticos foram observados no fígado de todos os camundongos no grupo UnT. Essa observação foi ainda validada pela avaliação de atividades de luciferase *ex vivo* das amostras de tumor (FIGs. 12D-12E). Em contraste, os camundongos tratados com CAR-T LCAR-B38M não tiveram tumores metastáticos nos fígados. Em resumo, o estudo *in vivo* demonstra a potência das células T-CAR LCAR-B38M na erradicação de células de mieloma múltiplo, *por exemplo*, RPMI8226.Luc) de camundongos NCG.

#### **Exemplo 6. Estudo de segurança do tratamento com CAR-T LCAR-B38M em primatas não humanos**

[0544] A segurança *in vivo* das células T-CAR LCAR-B38M foi avaliada num modelo de macaco cynomolgus. Obteve-se PBMC de amostras de sangue periférico de dois macacos (NHP #120117 e NHP #120545, ambos machos, cerca de 4 kg) e preparou-se por centrifugação em gradiente de densidade. Células T de macaco Cynomolgus foram isoladas de PBMC usando Kit de Isolamento de Célula T Pan de primata não humano (Miltenyi#130-091-993) de acordo com o manual do fabricante. As células T de macaco preparadas foram pré-ativadas com o Kit de Ativação/Expansão de Células T de primata não humano (Miltenyi #130-092-919), IL-2 humana e soro de macaco autólogo durante 3 dias. Posteriormente, as células T pré-ativadas foram transduzidas com o lentivírus LCAR- B38M, seguido de expansão por 10 dias adicionais.

[0545] 3 dias antes da infusão das células autólogas CAR-T, os macacos foram pré- tratados com Ciclofosfamida na dose de 22mg/kg de peso corporal por infusão intravenosa. No dia da infusão autóloga, as células foram descongeladas num banho de água a 37°C por agitação suave e imediatamente infundidas intravenosamente nos animais dentro de 5 minutos. O macaco NHP #120117 foi infundido com  $5 \times 10^6$ /kg de células T-CAR e o macaco NHP #120545 foi infundido com  $4 \times 10^7$ /kg de células T-CAR.

[0546] Os macacos foram monitorizados após a administração de células T quanto a febre, dificuldade respiratória, alteração do apetite, diarreia e perda de peso. Amostras de sangue pré e pós-administração foram obtidas e examinadas quanto ao nível de hemograma, níveis séricos e citocinas. Conforme mostrado nas FIGs. 13A-13F, as células T-CAR não apresentaram toxicidade significativa nos macacos.

**Exemplo 7. Um estudo clínico de CAR-T LCAR-B38M em pacientes humanos com mieloma múltiplo refratário/recidivado**

[0547] Um estudo clínico de fase 1/2, aberto, multicêntrico, de braço único, foi conduzido para determinar a segurança e a eficácia das células T-CAR LCAR-B38M no tratamento de pacientes humanos diagnosticados com mieloma múltiplo refratário ou recidivado (“r/r MM”). Informações sobre o ensaio clínico podem ser encontradas em worldwide web.clinicaltrials.gov, com o identificador NCT03090659.

[0548] No estudo, pacientes refratários/recidivados com mieloma múltiplo foram tratados com células T-CAR LCAR-B38M derivadas de células T autólogas dos pacientes. Uma dose total de  $0,5 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal foi administrada a cada paciente por injeção intravenosa em três doses divididas (20%, 30% e 50%, respectivamente) pela duração de uma semana (*por exemplo*, nos dias 0, 2 e 6). Durante os dias 1-30 do estudo, os pacientes foram monitorados quanto a eventos adversos, e amostras de pacientes foram obtidas para avaliação laboratorial. Todos os pacientes são acompanhados por pelo menos 36 meses após a administração da CAR-T.

[0549] O resultado primário do estudo mede a ocorrência de eventos adversos relacionados ao tratamento conforme avaliado pelos Critérios de Terminologia Comum para Eventos Adversos (CTCAE) v4. 0 dentro de 1-30 dias após a injeção das células T- CAR LCAR-B38M. O resultado secundário avalia respostas antimieloma induzidas por CAR-T, *por exemplo*, determinando níveis aberrantes de imunoglobulina no soro e número de células de mieloma múltiplo na medula óssea dos pacientes antes e após a administração das células T-CAR LCAR-B38M. Os objetivos de eficácia do estudo incluem a proporção patológica de resposta completa, 3 anos de sobrevida livre de doença, 3 anos de sobrevida livre de progressão.

[0550] Pacientes entre 18 e 75 anos são elegíveis para o estudo se:(1) o paciente tiver um diagnóstico prévio confirmado de mieloma múltiplo ativo, conforme definido pelos critérios atualizados do IMWG; (2) A expressão de BCMA límpida for detectada em células plasmáticas malignas de medula óssea ou de um plasmocitoma por citometria de fluxo ou imuno-histoquímica; e (3) o paciente tiver mieloma múltiplo refratário, conforme definido pelo fato de ter recebido pelo menos três regimes de tratamento prévios, incluindo o bortezomibe, ou de outra forma identificado por médicos clínicos; ou o paciente tiver

mieloma múltiplo recidivado conforme definido nas diretrizes de prática clínica NCCN em Oncology:Multiple Myeloma (2016 V2).

**[0551]** Os seguintes pacientes são excluídos do estudo:(1) mulheres em idade fértil ou que estão grávidas ou amamentando; (2) pacientes que têm alguma infecção ativa e não controlada: hepatite B, hepatite C, HIV ou outras infecções virais e bacterianas fatais; (3) pacientes que receberam terapia com esteroide corticosteroide sistêmico superior a 5 mg/dia de prednisona ou dose equivalente de outro corticosteroide não são permitidos dentro de 2 semanas antes da leucaférese necessária ou do início do regime de quimioterapia de condicionamento; (4) pacientes com alguma doença intercorrente descontrolada ou distúrbio médico sério e descontrolado; (5) pacientes com metástases do SNC ou envolvimento sintomático do SNC (incluindo neuropatias cranianas ou lesões de massa e compressão da medula espinhal); (6) pacientes com histórico de transplante de células-tronco alogênicas, que têm doença aguda ativa ou crônica do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), ou necessitam de medicamentos imunossupressores para GVHD, no prazo de 6 meses após a inscrição; ou (7) pacientes com doenças de pele autoimunes ativas, tais como psoríase ou outras doenças autoimunes ativas, tais como artrite reumatoide.

**[0552]** Em uma análise interina, em maio de 2017, 35 pacientes com mieloma múltiplo recidivado ou resistente ao tratamento (refratário) receberam tratamento com CAR-T LCAR-B38M. Os primeiros sinais de eficácia do tratamento surgiram já aos 10 dias após a injeção inicial das células T-CAR. No geral, a taxa de resposta objetiva foi de 100% e 33 de 35 (94%) pacientes tiveram uma remissão clínica evidente de mieloma (resposta completa ou resposta parcial muito boa) dentro de dois meses após o recebimento das células T-CAR.

**[0553]** No momento da análise, 19 pacientes foram acompanhados por mais de quatro meses, um tempo pré-estabelecido para avaliação completa da eficácia pelos critérios de consenso do International Myeloma Working Group (IMWG). Um paciente atingiu resposta parcial e quatro pacientes obtiveram critérios de remissão parcial muito bons (VgPR) em eficácia. Nenhum paciente que atingiu o critério de resposta completa rigorosa ("sCR") recaiu. Cinco pacientes que foram acompanhados por mais de um ano (12-14 meses) permaneceram no status de CRS e estavam livres de doença residual mínima (*isto é*, nenhuma célula cancerígena detectável na medula óssea).

[0554] A síndrome de liberação de citocinas (CRS) é um efeito colateral comum e potencialmente perigoso da terapia de células CAR T. Apenas CRS transitória foi experiência em 85% dos 35 pacientes. Os sintomas da CRS incluem febre, pressão arterial baixa, dificuldade de respirar e problemas com múltiplos órgãos. Na maioria dos pacientes, os sintomas da CRS eram leves e controláveis. Apenas dois pacientes apresentaram CRS grave (grau 3), mas recuperaram-se ao receber tocilizumabe (um tratamento redutor de inflamação comumente usado para o manejo da CRS em ensaios clínicos de terapia com células T-CAR). Nenhum paciente apresentou efeitos colaterais neurológicos, outra complicação comum e grave da terapia com células T-CAR.

[0555] Os dados provisórios de ensaios clínicos demonstram a eficácia e a segurança potentes do tratamento com CAR-T LCAR-B38M em pacientes com mieloma múltiplo refratário/recidivado.

[0556] Em um estudo clínico piloto, 3 pacientes foram tratados com células T autólogas expressando um CAR BCMA monovalente, isto é, células T-CAR LCAR-B27S. O CAR LCAR-B27S (um CAR BCMA monovalente listado na Tabela 4) tem um domínio de ligação ao antígeno contendo um único fragmento V<sub>HH</sub> que reconhece um único epítipo da molécula de BCMA. Este domínio V<sub>HH</sub> é idêntico ao segundo domínio V<sub>HH</sub> do CAR biepítipo/bivalente LCAR-B38M.

[0557] Num ensaio de citotoxicidade in vitro, as células T-CAR LCAR-B27S foram preparadas a partir de três pacientes com mieloma múltiplo, respectivamente, e as células T-CAR LCAR-B38M foram também preparadas respectivamente a partir dos mesmos três pacientes com mieloma múltiplo como controle. Ambas as células T-CAR foram cocultivadas com células RPMI8226.Luc numa razão efetor para alvo (razão E/T) de 20:1 e 5:1 durante 20 horas. Como mostrado na FIG. 14A, as células T-CAR foram preparadas utilizando células T do paciente A. A porcentagem de células viáveis remanescentes, avaliada pela atividade remanescente da luciferase nas células RPMI8226.Luc, foi de  $3,97 \pm 0,75\%$  para LCAR-B38M e  $3,17 \pm 0,57\%$  para LCAR-B27S, quando a razão E/T foi de 20:1. No entanto, quando a razão E/T foi de 5:1, LCAR-B38M apresentou maiores potências de morte de células RPMI8226.Luc em comparação com LCAR-B27S ( $33,37 \pm 0,75\%$  de células viáveis restantes para LCAR-B38M,  $68,60 \pm 1,60\%$  para LCAR- B27S). Como mostrado na FIG. 14B, as células T-CAR foram preparadas utilizando células T do paciente B. A porcentagem de células viáveis remanescentes, avaliada pela atividade



remanescente da luciferase nas células RPMI8226.Luc, foi de  $4,45 \pm 0,57\%$  para LCAR-B38M e  $9,32 \pm 1,16\%$  para LCAR-B27S, quando a razão E/T foi de 20:1. No entanto, quando a razão E/T foi de 5:1, LCAR-B38M apresentou novamente maiores potências de morte de células RPMI8226.Luc em comparação com LCAR-B27S ( $40,92 \pm 3,00\%$  de células viáveis restantes para LCAR-B38M,  $84,05 \pm 1,56\%$  para LCAR-B27S). Como mostrado na FIG. 14C, células T-CAR foram preparadas usando células T do paciente C. A porcentagem de células viáveis restantes, avaliada pela atividade remanescente de luciferase em células RPMI8226.Luc, foi de  $2,56 \pm 0,88\%$  para LCAR-B38M e  $10,12 \pm 1,83\%$  para LCAR-B27S, quando a razão E/T foi de 20:1. No entanto, quando a razão E/T foi de 5:1, LCAR-B38M mostrou novamente maiores potências de matar células RPMI8226.Luc em comparação com LCAR-B27S ( $29,99 \pm 3,13\%$  de células viáveis restantes para LCAR-B38M,  $100,93 \pm 9,25\%$  para LCAR-B27S).

**[0558]** No estudo clínico piloto, 3 pacientes foram tratados com as células T-CAR LCAR-B27S, nas quais todos os protocolos de pré-condicionamento, injeção e acompanhamento foram idênticos aos do estudo clínico com o CAR LCAR-B38M bivalente. Uma dose total de  $3 \times 10^6$  células/kg (paciente A),  $5 \times 10^6$  células/kg (paciente B) e  $7 \times 10^6$  células/kg (paciente C) por peso corporal de células T-CAR modificadas autólogas LCAR-B27S foram administradas a cada paciente, respectivamente, por injeção intravenosa em três doses divididas (20%, 30% e 50% respectivamente) ao longo de uma semana (*por exemplo*, nos dias 0, 2 e 6). Durante os dias 1-30 do estudo, os pacientes foram monitorados quanto a eventos adversos, e amostras de pacientes foram obtidas para avaliação laboratorial. Todos os pacientes foram acompanhados por pelo menos 36 meses após a administração de CAR-T.

**[0559]** 2 pacientes entre os três pacientes atingiram uma resposta parcial muito boa (VgPR), mas ambos os pacientes tiveram recaída dentro de 6 meses após a infusão da CAR-T. O terceiro paciente não apresentou resposta clínica. O estudo piloto com LCAR-B27S foi conseqüentemente terminado pelo IRB sem mais inscrições de pacientes.

**[0560]** A taxa de resposta objetiva, a taxa de remissão completa e a taxa de recaída deste estudo com CAR BCMA monovalente piloto (LCAR-B27S) e o estudo de CAR BCMA bivalente (CAR-T LCAR-B38M) são mostrados na Tabela 11 abaixo. O CAR-T BCMA bivalente apresentou eficácia clínica superior em comparação ao CAR-T BCMA monovalente.



**TABELA 11: Dados clínicos comparáveis de terapias com CAR-T BCM monovalentes e bivalentes/biepítopo**

Agente	N	Dose (células/kg)	Ensaio clínico	Taxa de Reposta Objetiva (ORR)	Taxa de Remissão Completa (CR)	Taxa de recaída (> 6 meses)
CAR-T BCMA Monovalente (LCAR-B27S)	3	3, 5, 7 × 10 <sup>6</sup> respectivamente	Estudo piloto	67%	0%	67%
CAR-T BCMA Bivalente/Biepítopo (LCAR-B38M)	35	0,3 × 10 <sup>6</sup> - 5,6 × 10 <sup>6</sup> (mediana = 2,9 × 10 <sup>6</sup> )	NCT03090659	100%	57,1%	7,5%

## REIVINDICAÇÕES

1. Receptor de antígeno quimérico multivalente (CAR), caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo compreendendo:
  - (a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo pelo menos duas porções de ligação ao BCMA;
  - (b) um domínio transmembranar; e
  - (c) um domínio de sinalização intracelular.
2. CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno extracelular compreende uma primeira fração de ligação anti-BCMA e uma segunda fração de ligação ao BCMA.
3. CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que uma ou mais da primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA.
4. CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA é um primeiro sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um segundo sdAb anti-BCMA.
5. CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é derivada de um anticorpo humano.
6. CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA é um sdAb anti-BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA é um ligando de polipeptídeo de BCMA.
7. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA ligam-se especificamente ao mesmo epítipo no BCMA.
8. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA se ligam especificamente a epítipos diferentes em BCMA.
9. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA e/ou a segunda fração de ligação ao BCMA liga-se especificamente a um epítipo em

BCMA derivado de uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs:388-394.

10. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 9, caracterizado pelo fato de que o sdAb anti-BCMA compreende qualquer um dos seguintes:

- (1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77;
- (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:78;
- (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79;
- (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:80;
- (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:81;
- (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82;
- (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:83;
- (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:84;
- (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:85;

- (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:86;
- (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:87;
- (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:88;
- (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:89;
- (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:52 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:90;
- (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:91;
- (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:92;
- (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93;
- (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:94;
- (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:95;

- (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:96;
- (21) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:97;
- (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:98;
- (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:99;
- (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100;
- (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:101;
- (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:102;
- (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:103;
- (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:104;
- (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:105;

- (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:106;
  - (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:107;
  - (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:108;
  - (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109;
  - (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:110;
  - (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:111;
  - (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:112;
  - (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:113;
- ou
- (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:114.
11. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 10, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA está localizada no N-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA.

12. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 10, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA está localizada no C-terminal da segunda fração de ligação ao BCMA.
13. CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 12, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação ao BCMA e a segunda fração de ligação ao BCMA são fundidas entre si através de um ligante peptídico.
14. CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o ligante peptídico não tem mais que cerca de 50 aminoácidos de comprimento.
15. Anticorpo de domínio único anti-BCMA (sdAb), caracterizado pelo fato de que compreende qualquer um dos seguintes:
  - (1) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:39; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77;
  - (2) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:40; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:78;
  - (3) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:41; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79;
  - (4) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:80;
  - (5) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:5; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:43; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:81;
  - (6) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:44; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82;
  - (7) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:7; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:83;



- (8) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:84;
- (9) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:85;
- (10) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:48; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:86;
- (11) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:49; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:87;
- (12) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:50; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:88;
- (13) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:51; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:89;
- (14) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:52 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:90;
- (15) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:53; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:91;
- (16) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:54; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:92;
- (17) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:17; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93;

- (18) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:56; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:94;
- (19) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:57; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:95;
- (20) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:96;
- (21) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:21; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:59; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:97;
- (22) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:22; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:98;
- (23) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:23; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:99;
- (24) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:24; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100;
- (25) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:101;
- (26) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:26; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:102;
- (27) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:27; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:65; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:103;

- (28) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:66; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:104;
  - (29) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:29; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:105;
  - (30) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:30; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:68; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:106;
  - (31) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:107;
  - (32) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:32; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:70; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:108;
  - (33) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:33; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109;
  - (34) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:34; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:72; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:110;
  - (35) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:35; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:111;
  - (36) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:36; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:74; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:112;
  - (37) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:75; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:113;
- ou

- (38) uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:38; uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:76; e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:114.
16. sdAb anti-BCMA, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o sdAb anti-BCMA compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:115-152.
17. Anticorpo anti-BCMA, caracterizado pelo fato de que compete com o sdAb anti-BCMA como definido na reivindicação 15 ou 16.
18. Anticorpo anti-BCMA, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-BCMA é um sdAb.
19. sdAb anti-BCMA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15, 16 e 18, caracterizado pelo fato de que o sdAb anti-BCMA é um anticorpo camelídeo.
20. sdAb anti-BCMA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15, 16 e 18, caracterizado pelo fato de que o sdAb anti-BCMA é um anticorpo quimérico.
21. sdAb anti-BCMA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15, 16 e 18 a 20, caracterizado pelo fato de que o sdAb anti-BCMA é um fragmento V<sub>H</sub>H.
22. Receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo um polipeptídeo compreendendo:
- (a) um domínio de ligação ao antígeno extracelular compreendendo o sdAb anti-BCMA de qualquer uma das reivindicações 15 a 16 e 18 a 21;
  - (b) um domínio transmembranar; e
  - (c) um domínio de sinalização intracelular.
23. CAR, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação de antígeno extracelular compreende pelo menos dois sdAbs anti-BCMA.
24. CAR ou CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e 23 a 23, caracterizado pelo fato de que o domínio transmembranar é derivado de uma molécula selecionada do grupo que consiste em CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1.
25. CAR ou CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o domínio transmembranar é derivado de CD8 $\alpha$  ou CD28.
26. CAR ou CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e 22 a 25, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular

compreende um domínio de sinalização intracelular primário de uma célula efetora imune.

27. CAR ou CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o domínio transmembranar é derivado de CD3 $\alpha$ .
28. CAR ou CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e 22 a 27, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador.
29. CAR ou CAR multivalente, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulador é derivado de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 e combinações dos mesmos.
30. CAR ou CAR multivalente, de acordo com reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulador compreende um domínio citoplasmático de CD28 e/ou um domínio citoplasmático de CD137.
31. CAR ou CAR multivalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e 22 a 30, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um domínio de dobradiça localizado entre o C-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular e o N-terminal do domínio transmembranar.
32. CAR ou CAR multivalente, de acordo com reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o domínio transmembranar é derivado de CD8 $\alpha$ .
33. CAR ou CAR multivalente, de acordo com qualquer umas das reivindicações 1 a 14 e 22 a 32, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um peptídeo de sinal localizado no N-terminal do polipeptídeo.
34. CAR ou CAR multivalente, de acordo com reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de sinal é derivado de CD8 $\alpha$ .
35. Receptor de antígeno quimérico compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:216-256 e 298-335.
36. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica o CAR ou CAR multivalente como definido em qualquer uma das modalidades 1 a 14 e 22 a 35.

37. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 36.
38. Célula efetora imune engenheirada, caracterizada pelo fato de que compreende o CAR ou CAR multivalente como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e 22 a 35, o ácido nucleico isolado como definido na reivindicação 36 ou o vetor como definido na reivindicação 37.
39. Célula efetora imune engenheirada, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que a célula efetora imune é uma célula T.
40. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a célula efetora imune engenheirada da reivindicação 39 ou o sdAb de BCMA de qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e um transportador farmacêuticamente aceitável.
41. Método de tratamento de câncer num indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica como definida na reivindicação 40.
42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o câncer é mieloma múltiplo.
43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que câncer é mieloma múltiplo refratário ou recidivado.

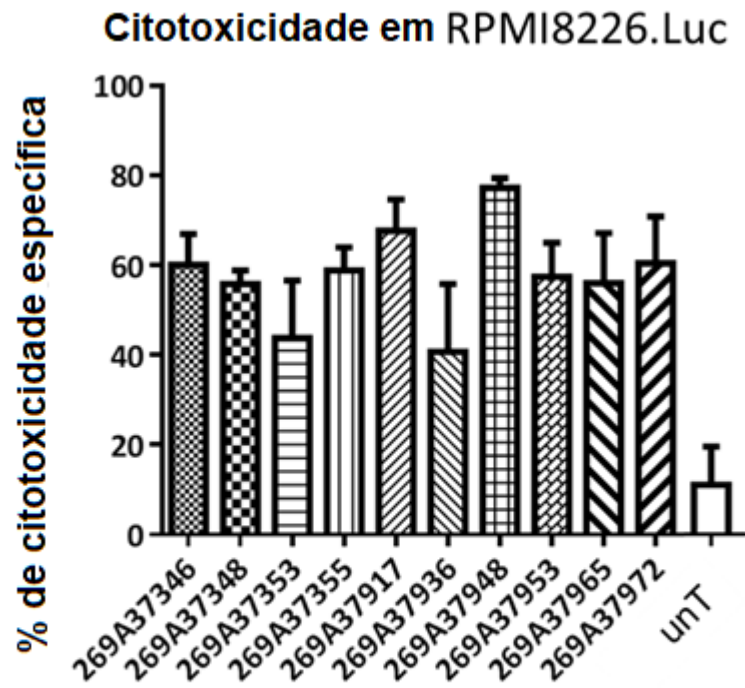


FIG. 1A

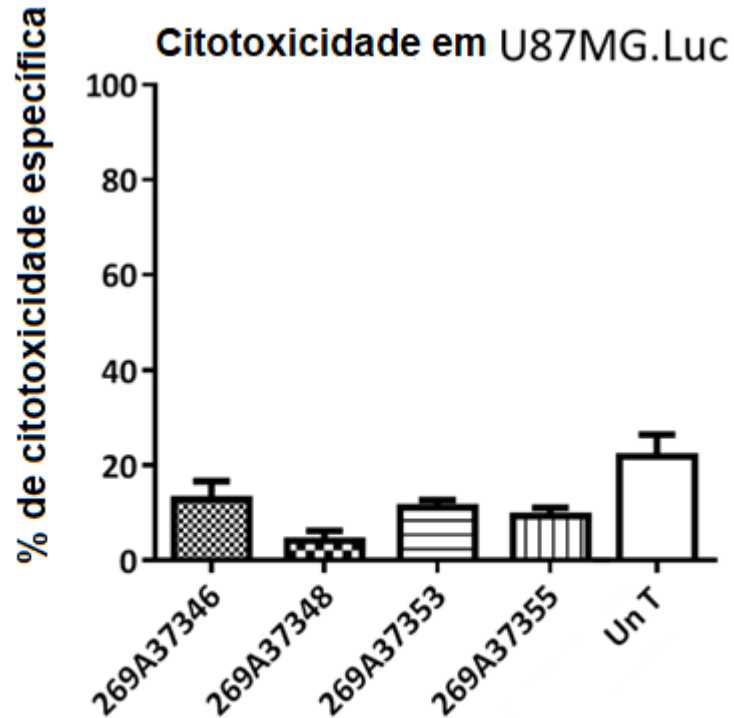


FIG. 1B



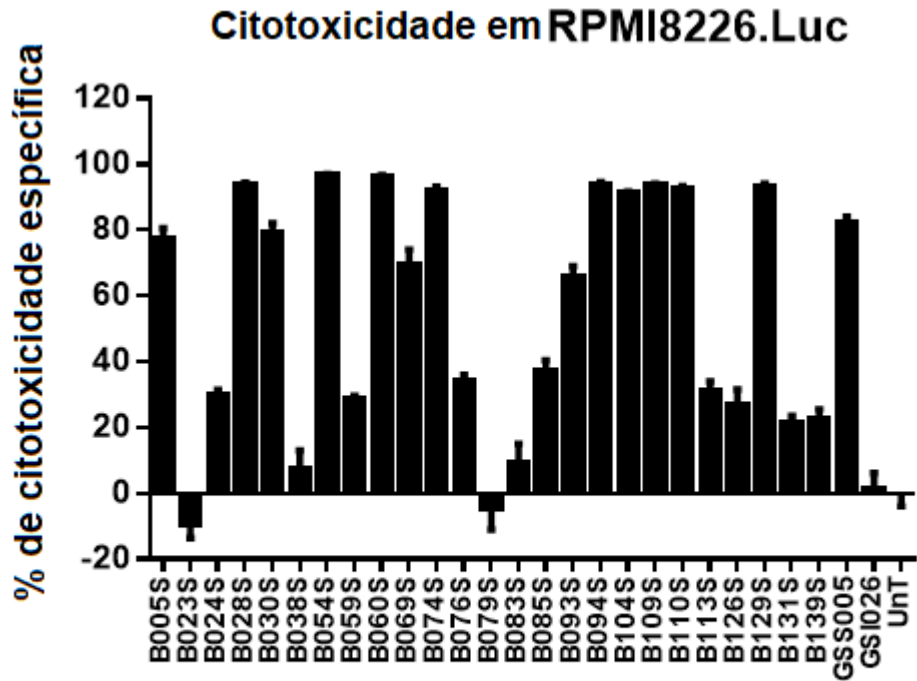


FIG. 2A

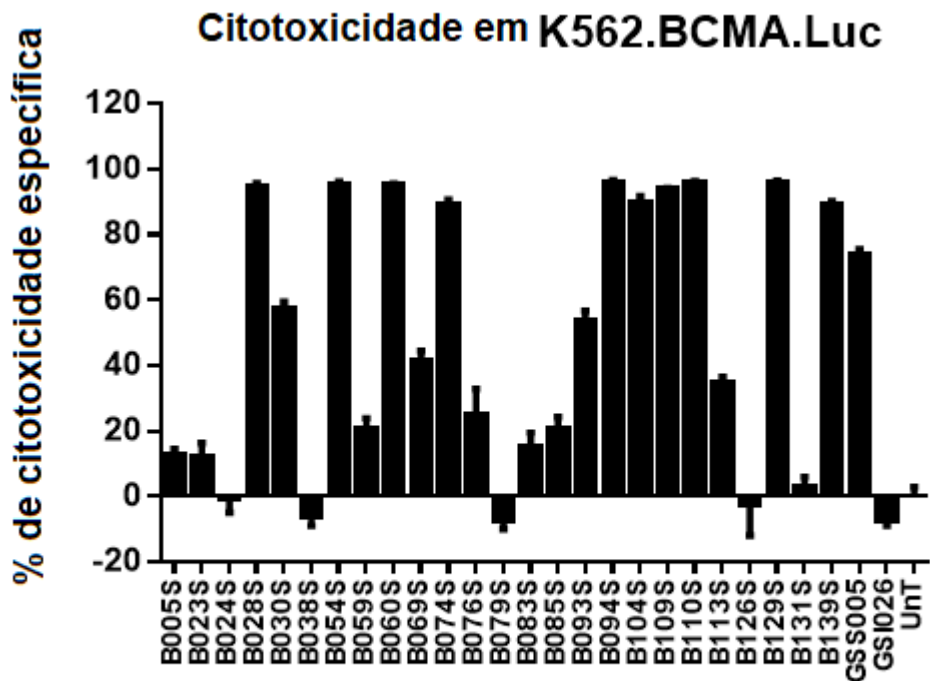


FIG. 2B

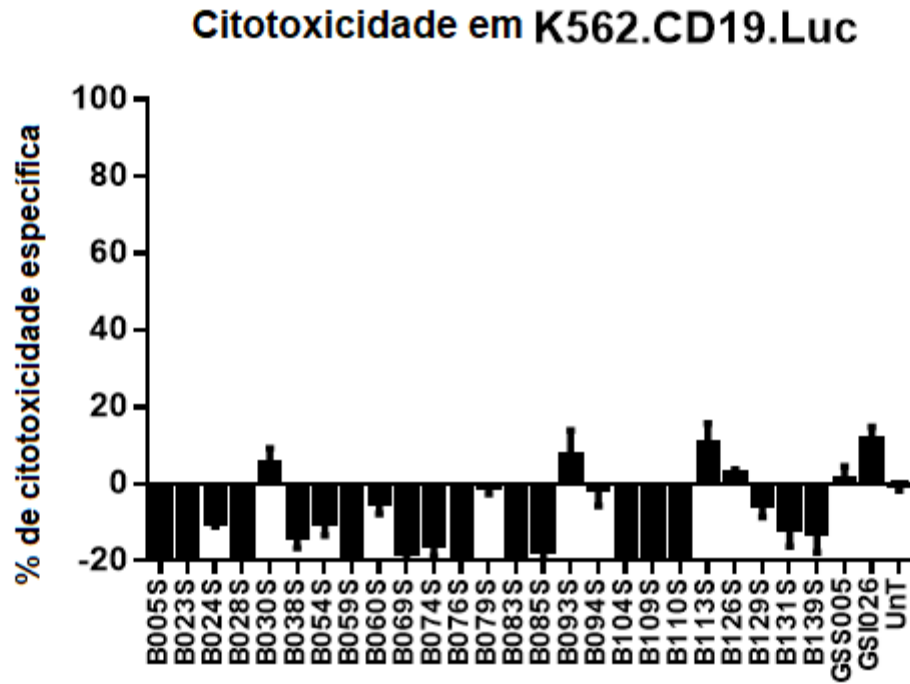


FIG. 2C

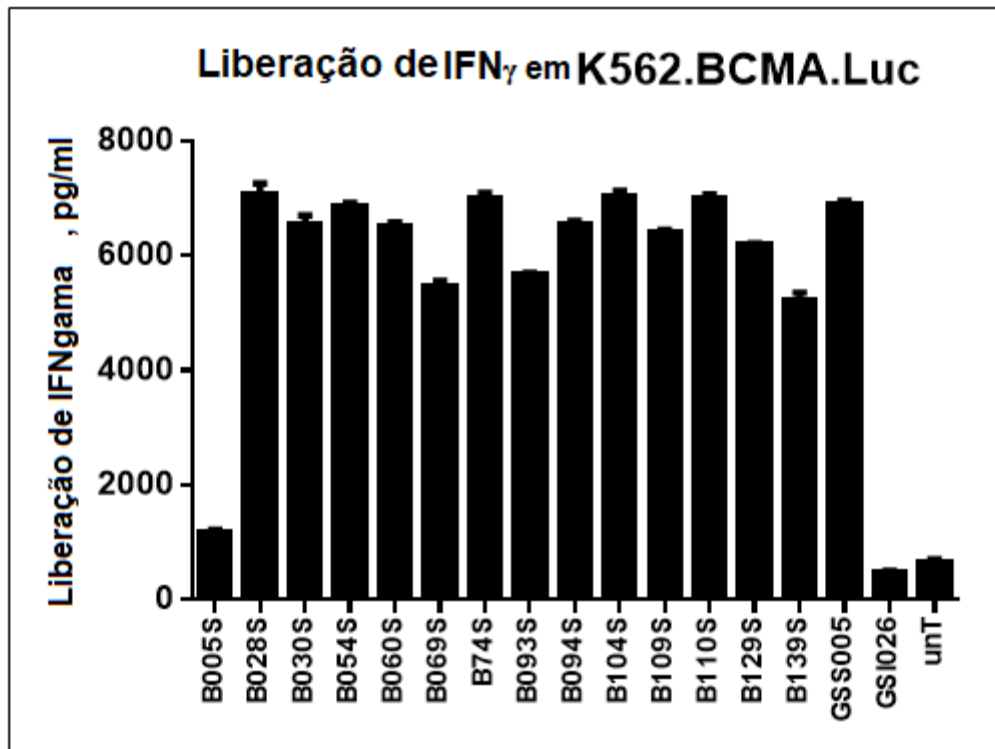
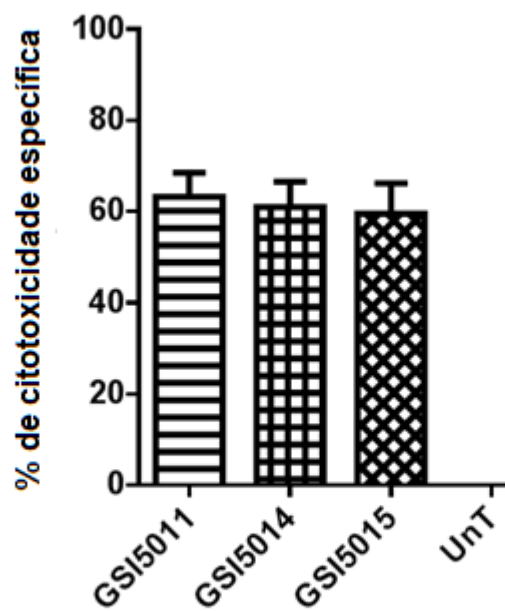
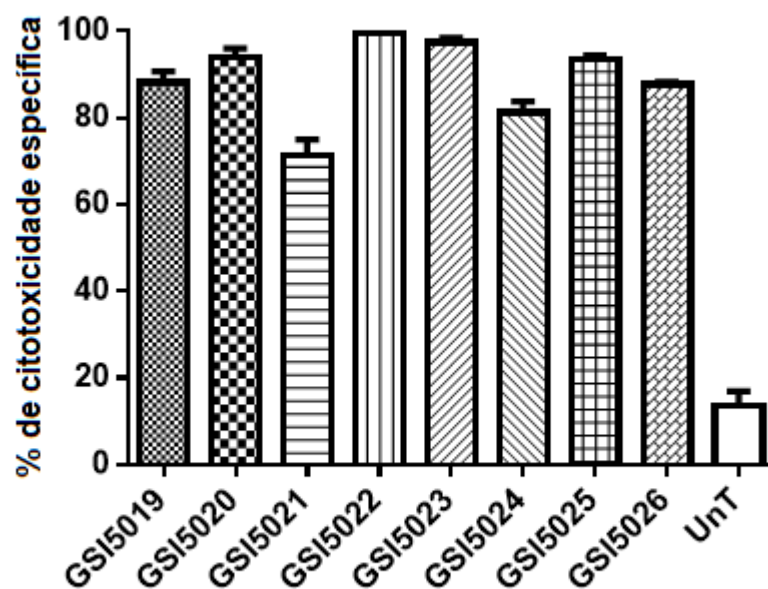


FIG. 3

**Citotoxicidade em RPMI8226-Luc****FIG. 4A****Citotoxicidade em RPMI8226.Luc****FIG. 4B**

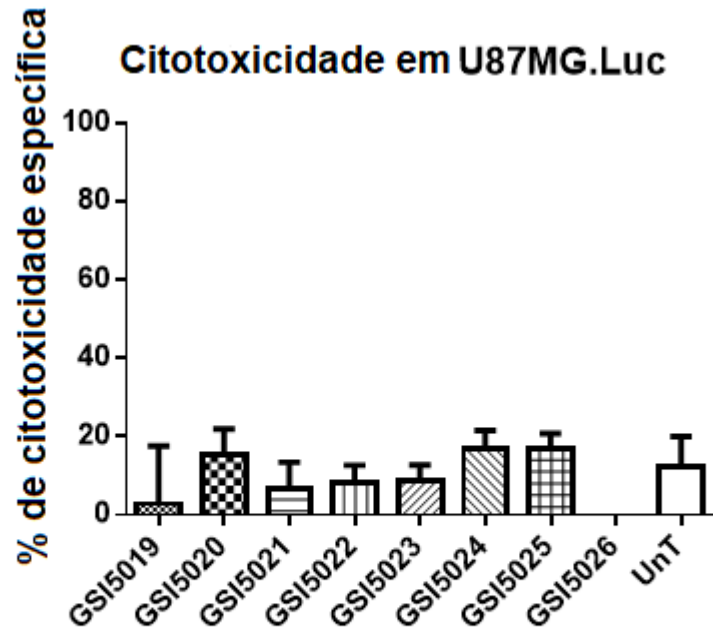


FIG.4C

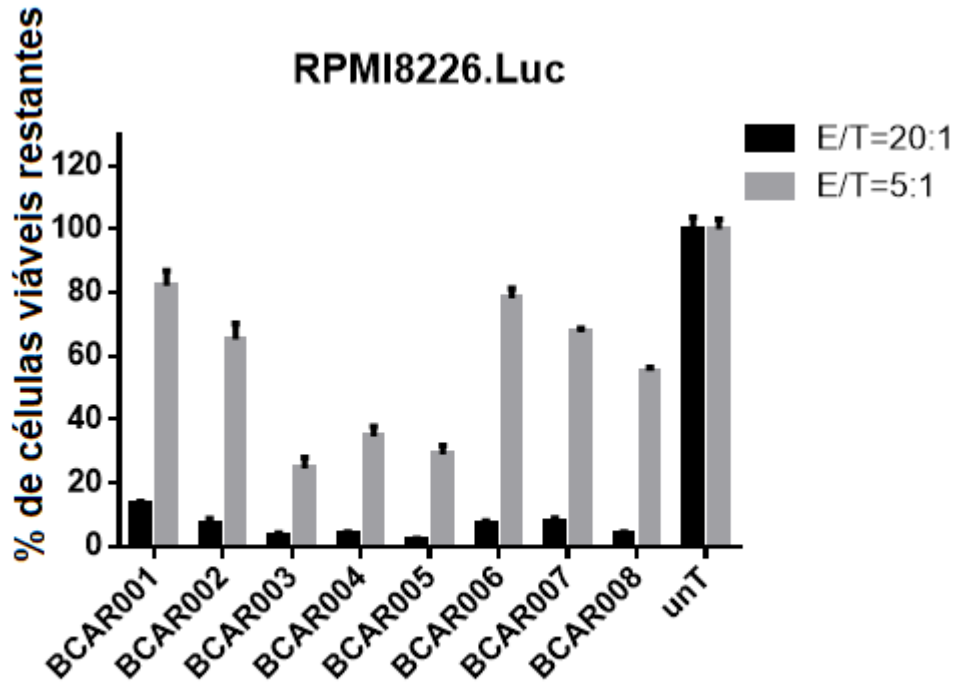


FIG. 5A

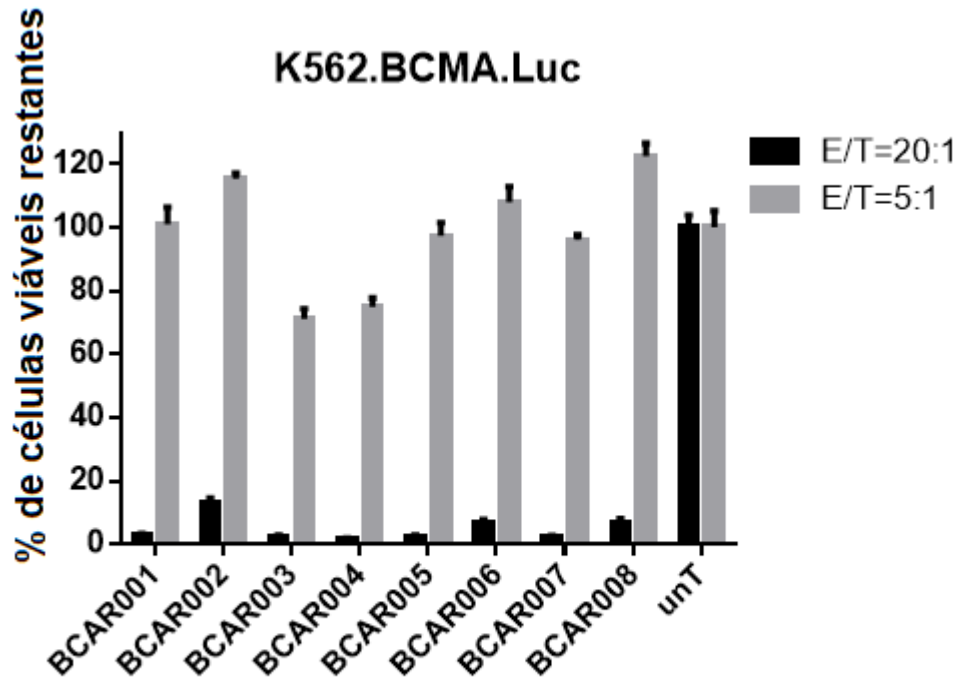


FIG. 5B

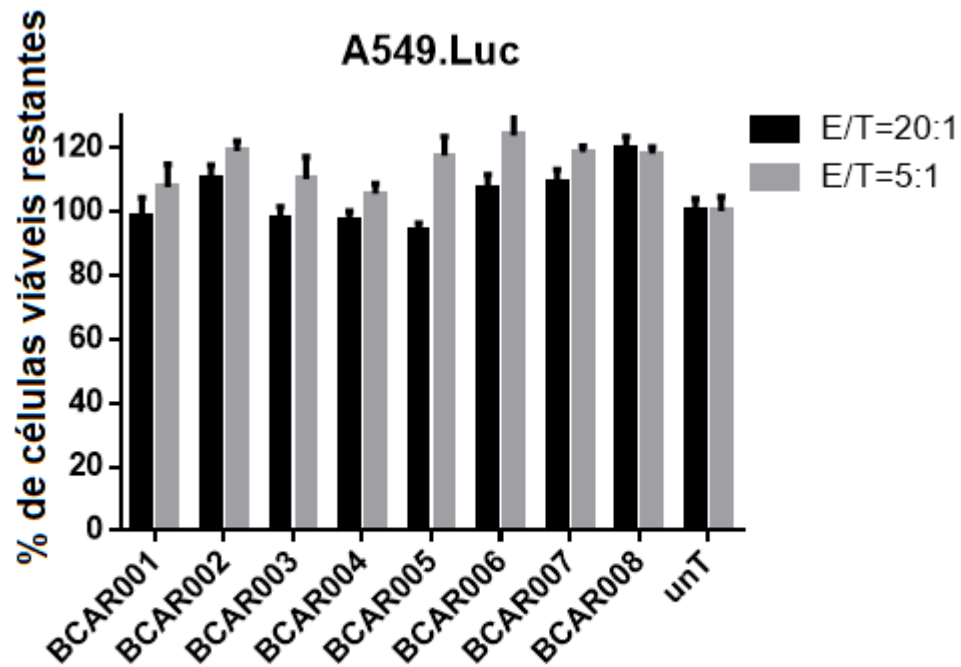


FIG. 5C

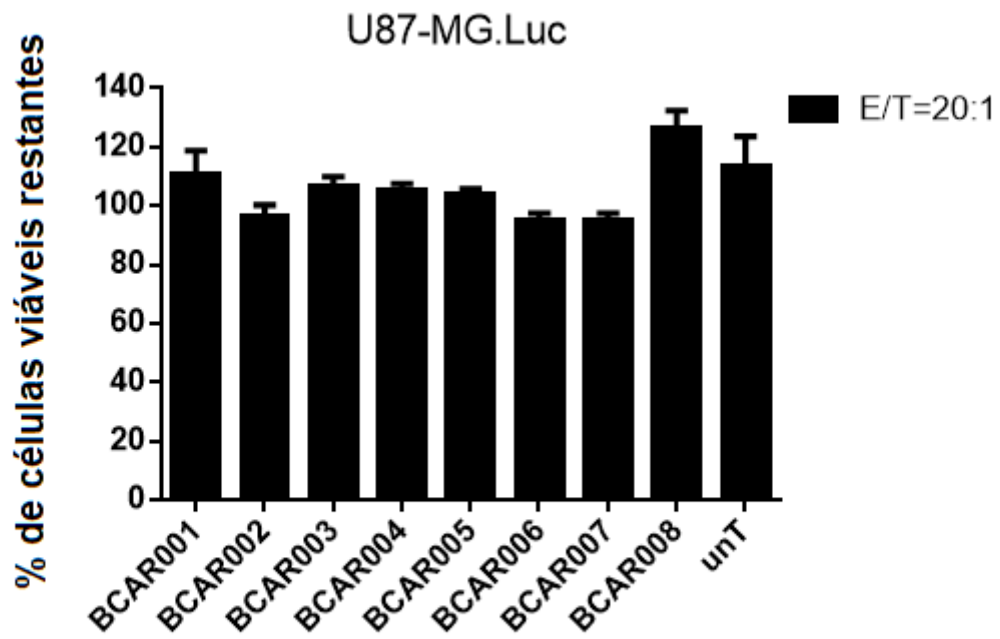


FIG. 5D

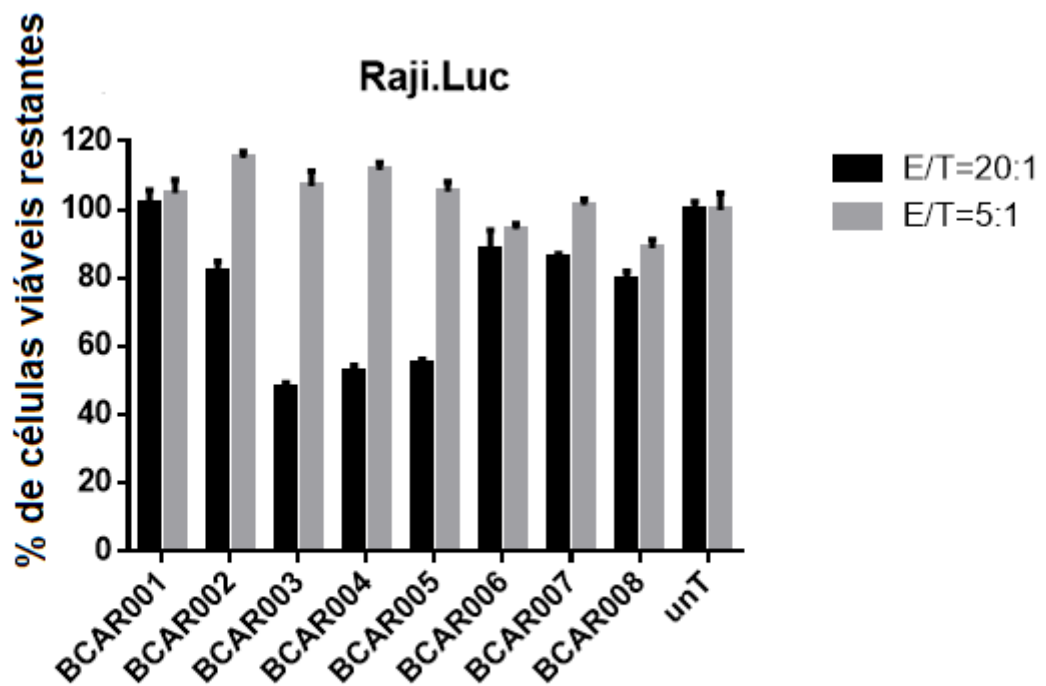


FIG. 5E

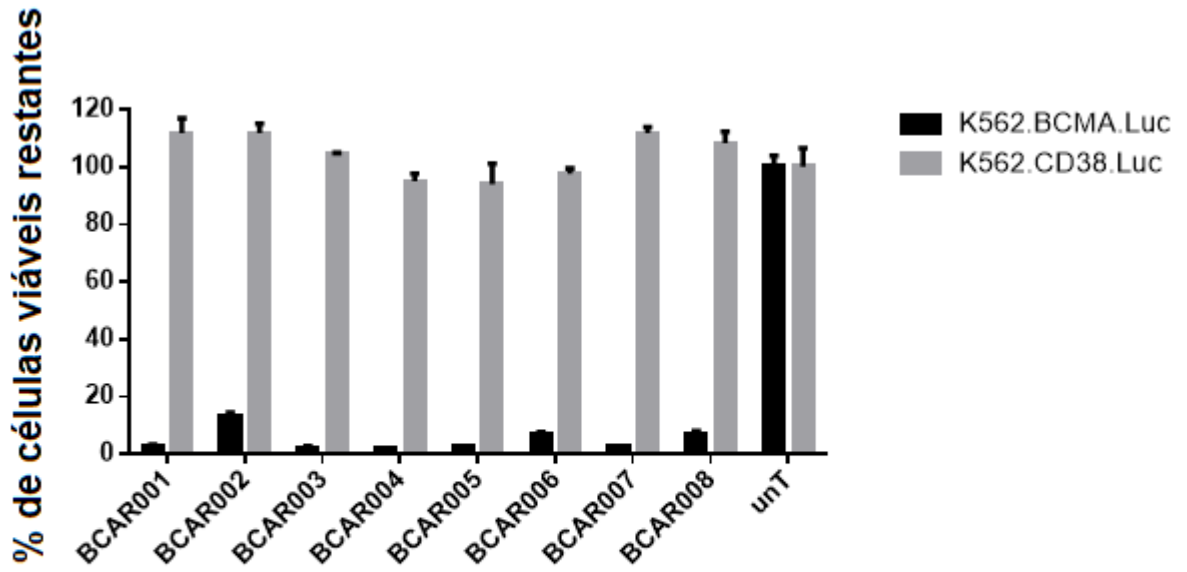


FIG. 5F

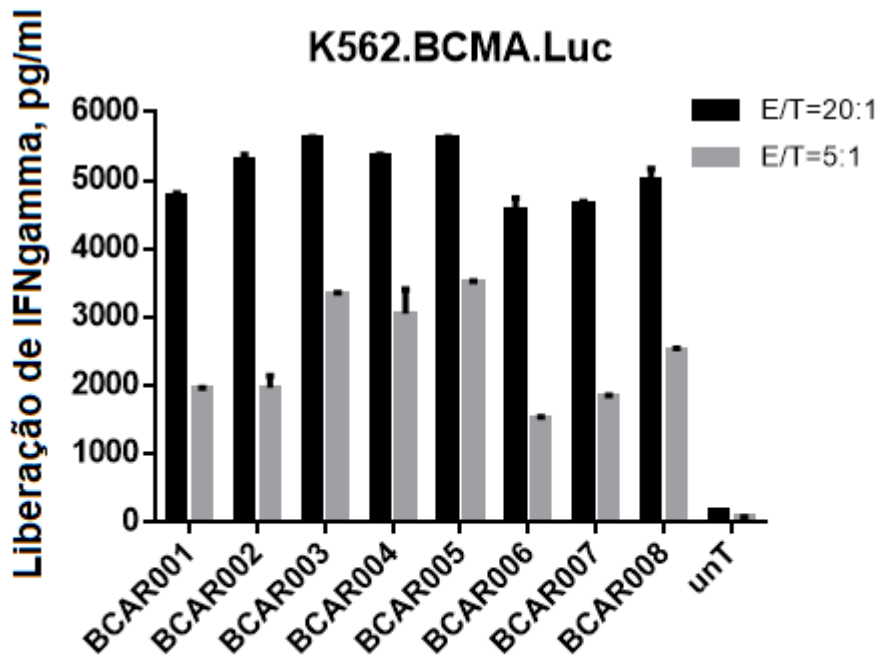


FIG. 6A



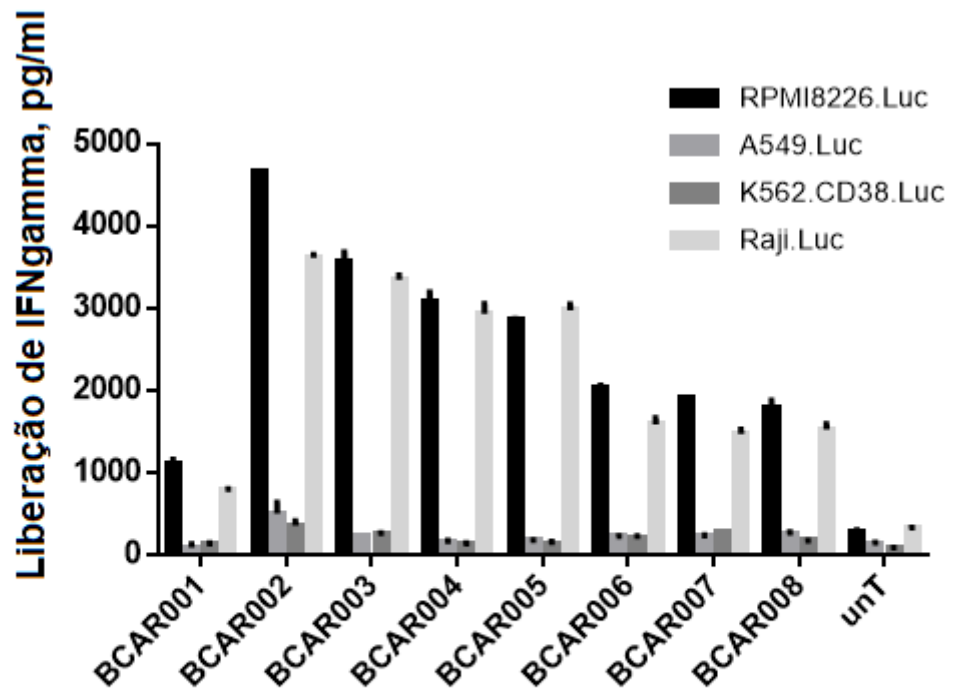


FIG. 6B

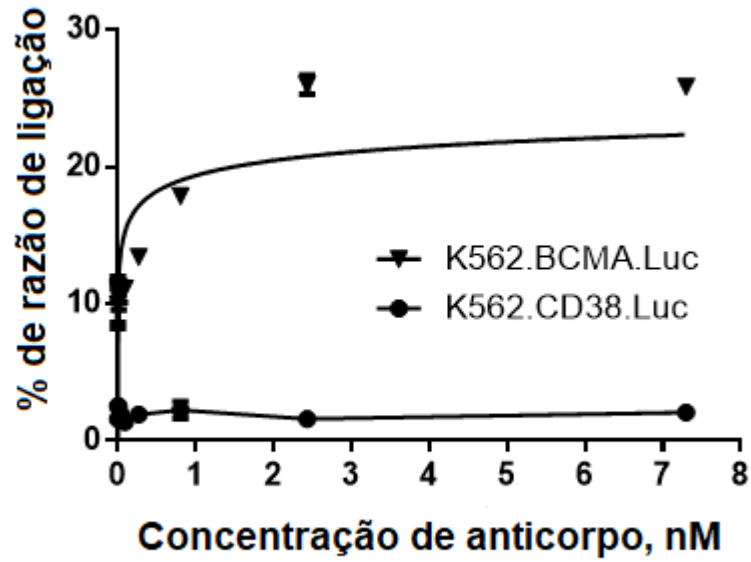
**Ligação de LAB001 em células alvo**

FIG. 7A

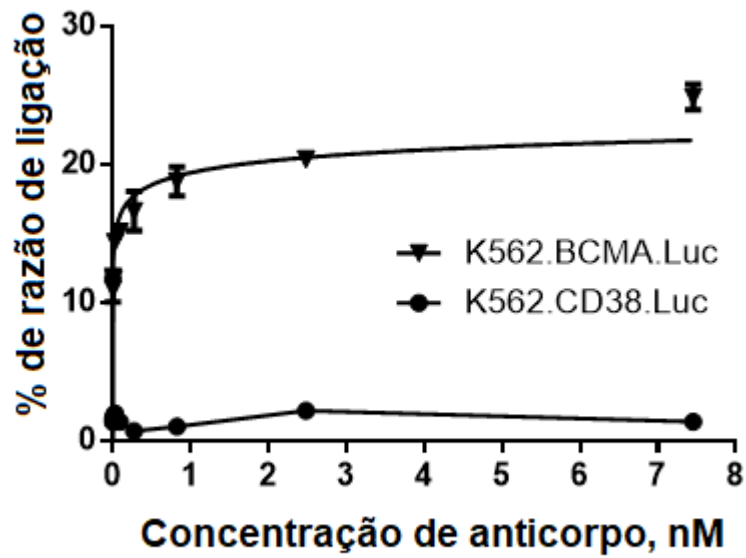
**Ligação de LAB002 em células alvo**

FIG. 7B

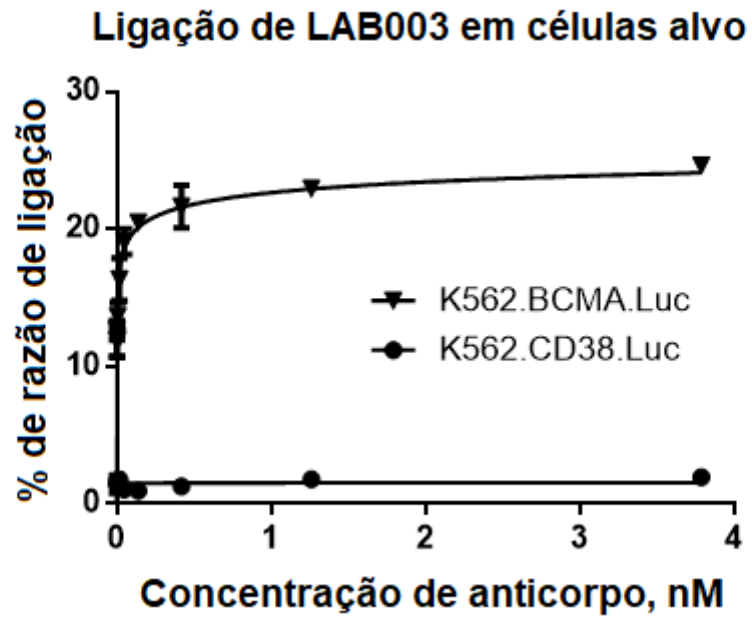


FIG. 7C

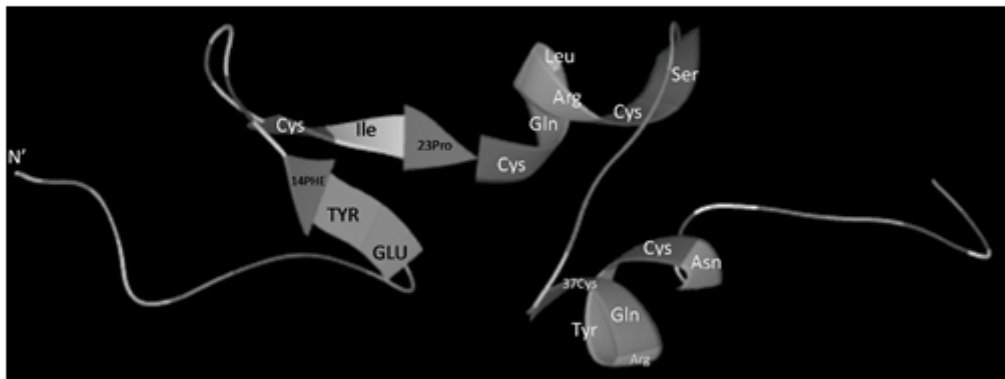
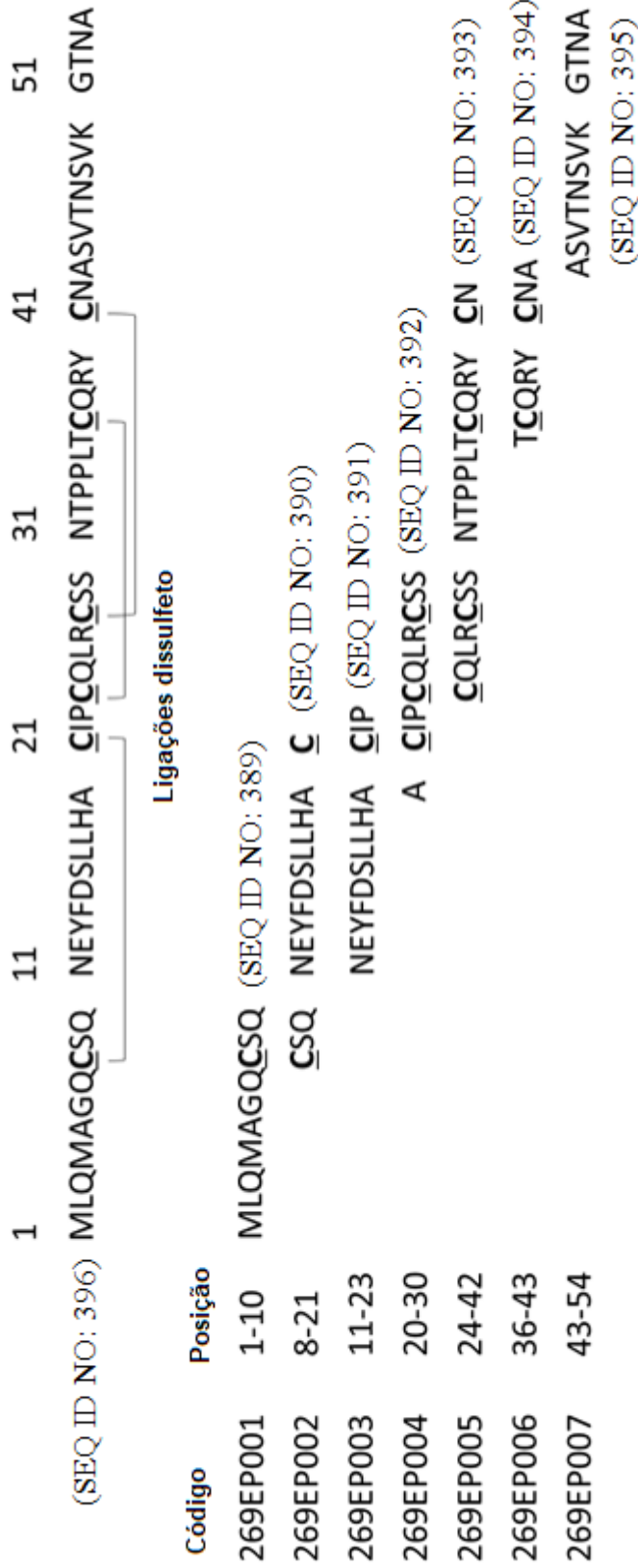


FIG. 8A



**FIG. 8B**

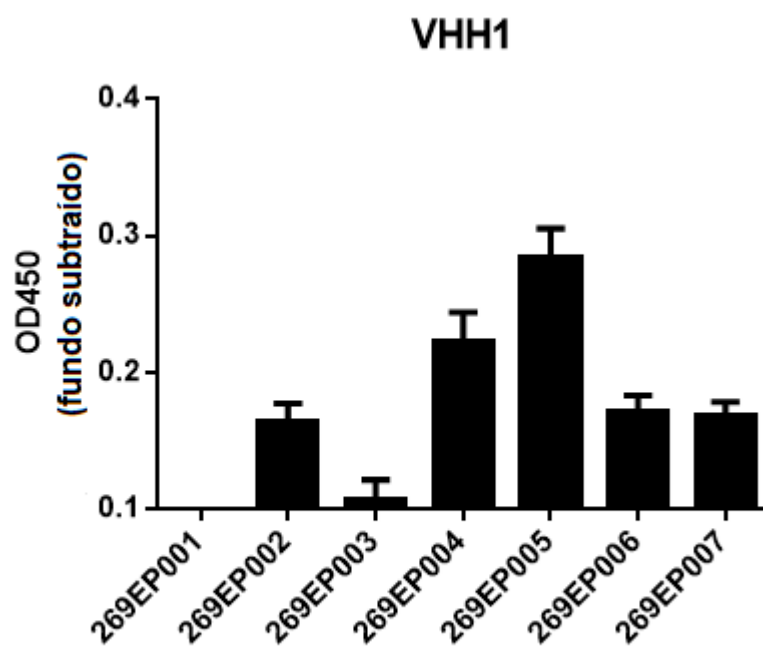


FIG. 9A

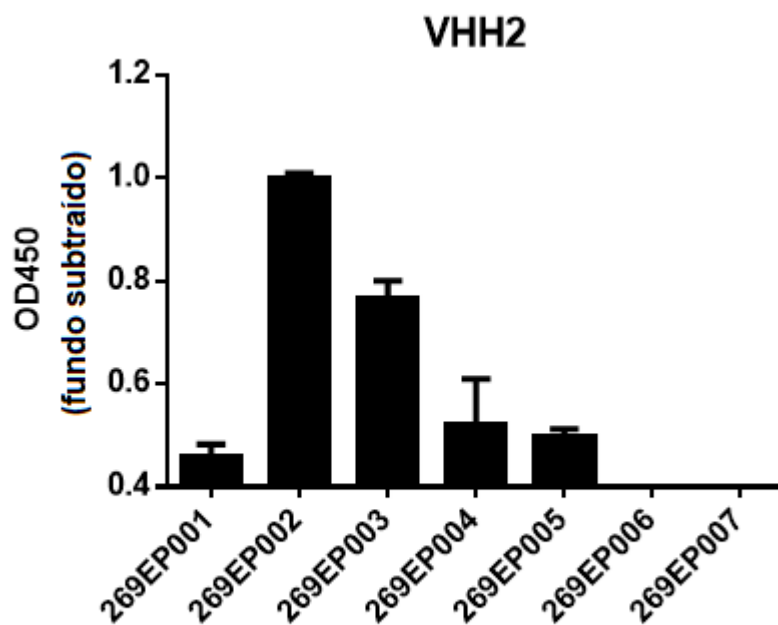


FIG. 9B

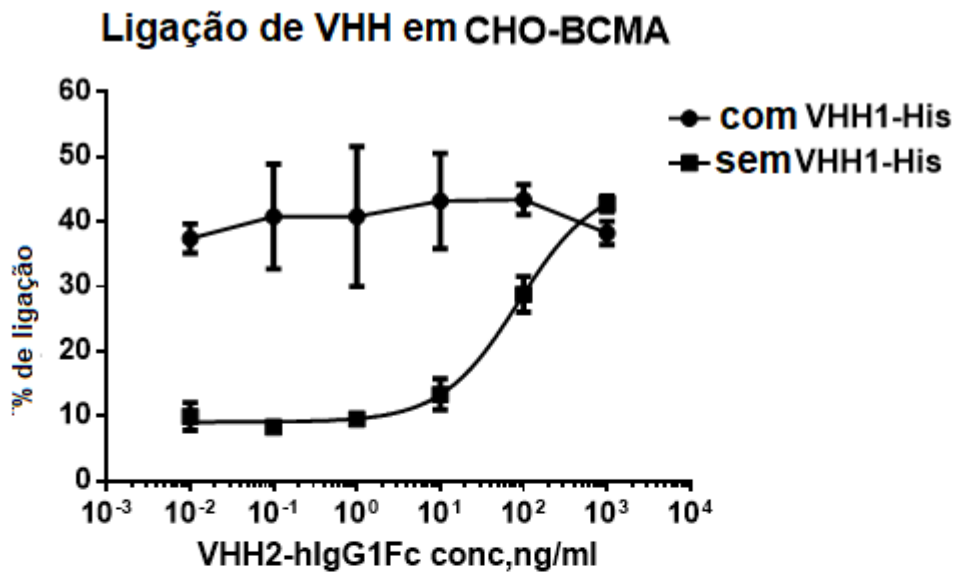


FIG. 10

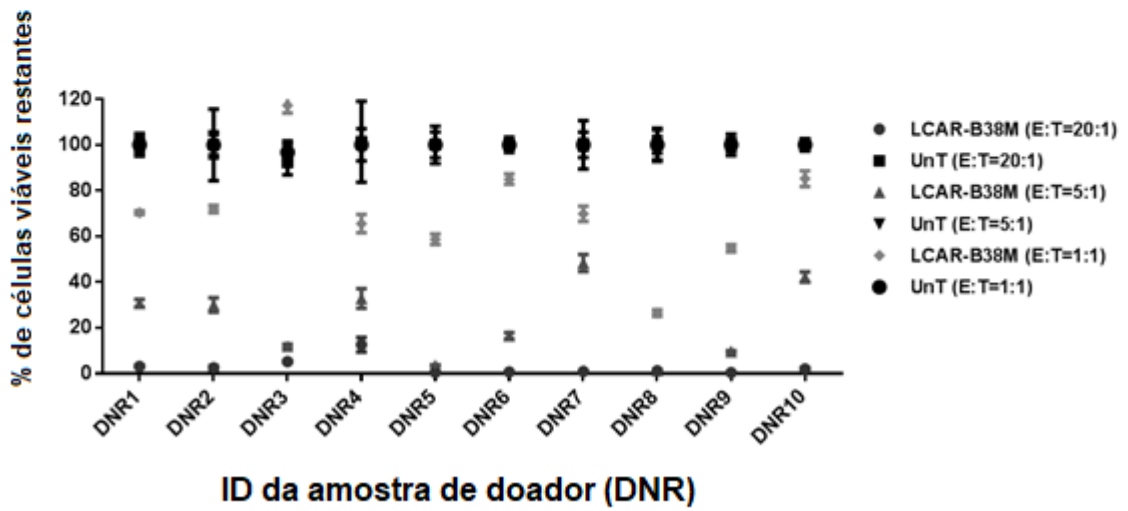


FIG. 11

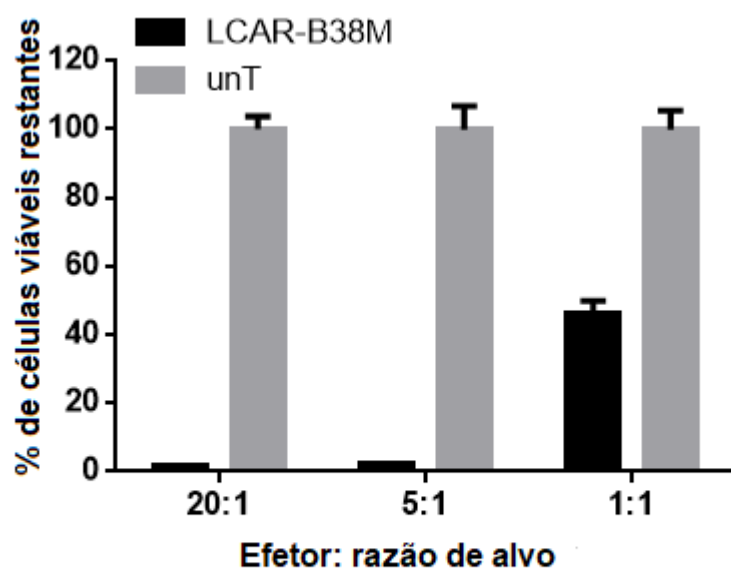


FIG. 12A

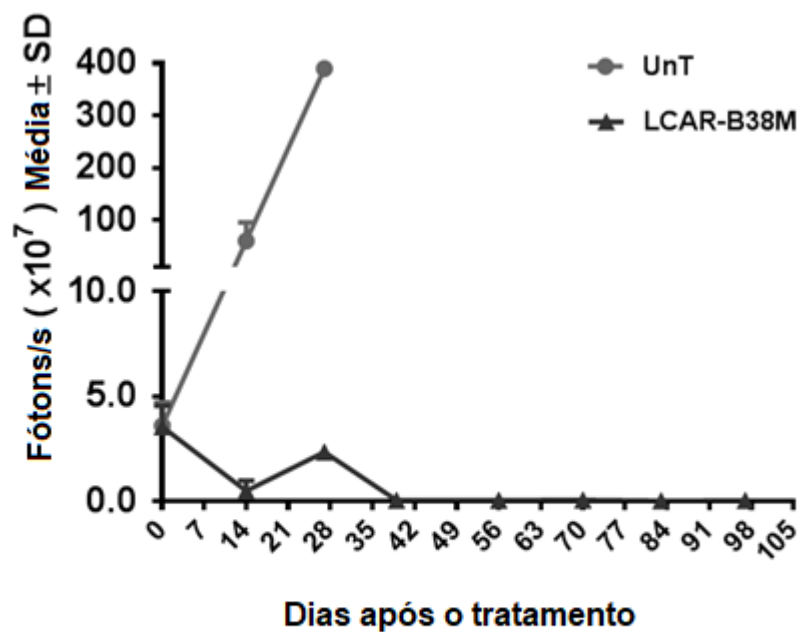


FIG. 12B



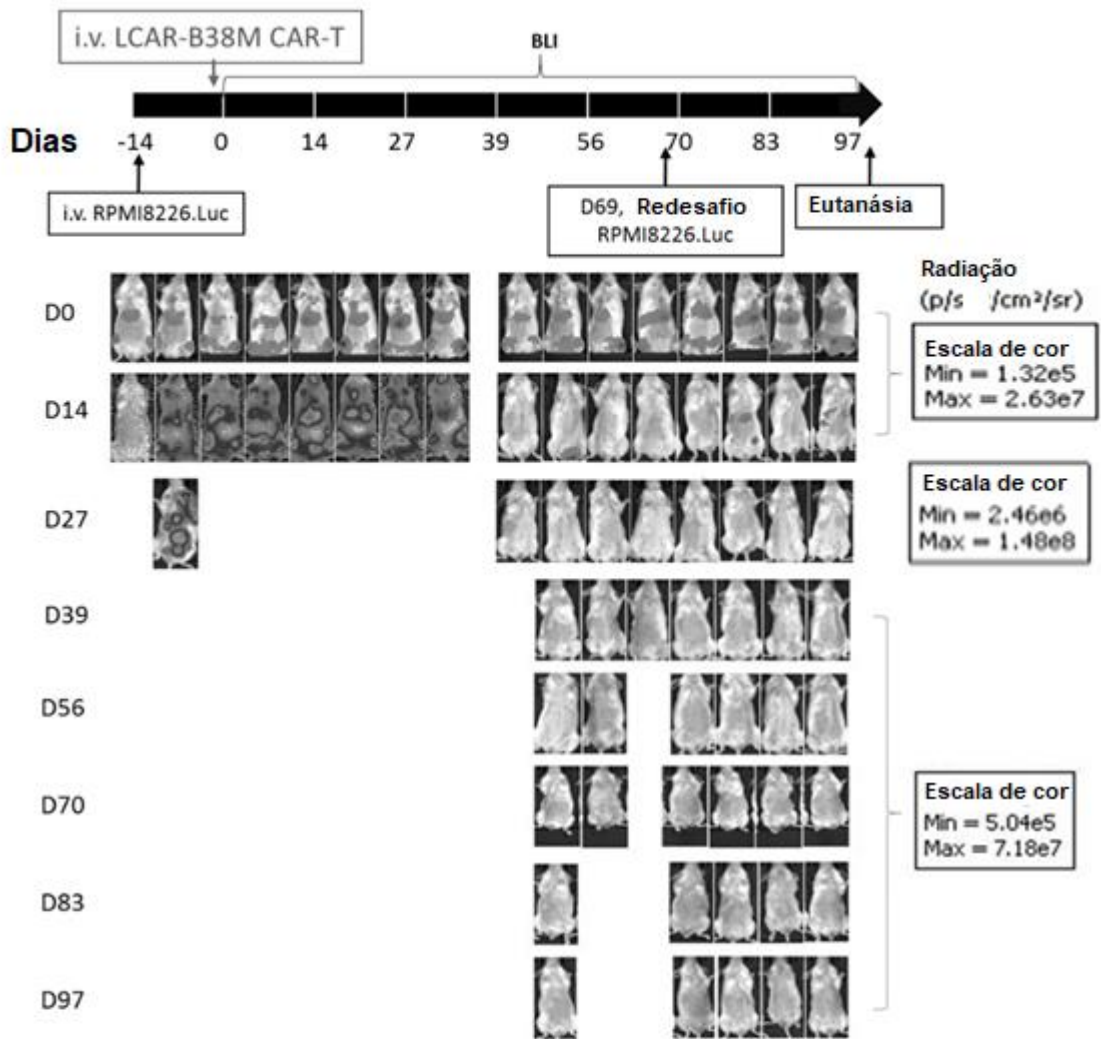


FIG. 12C

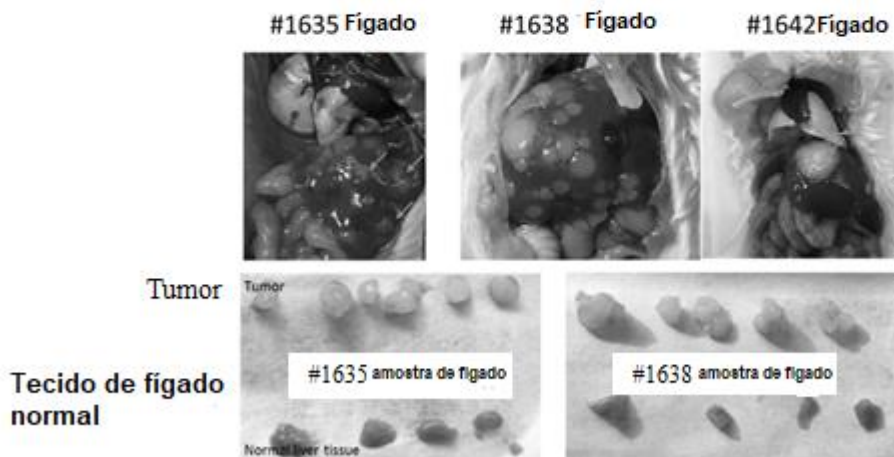


FIG. 12D

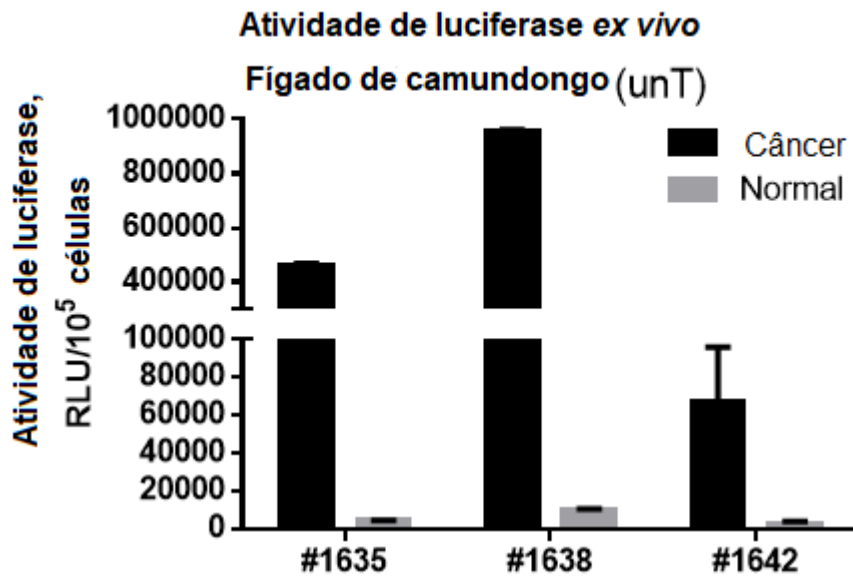


FIG. 12E

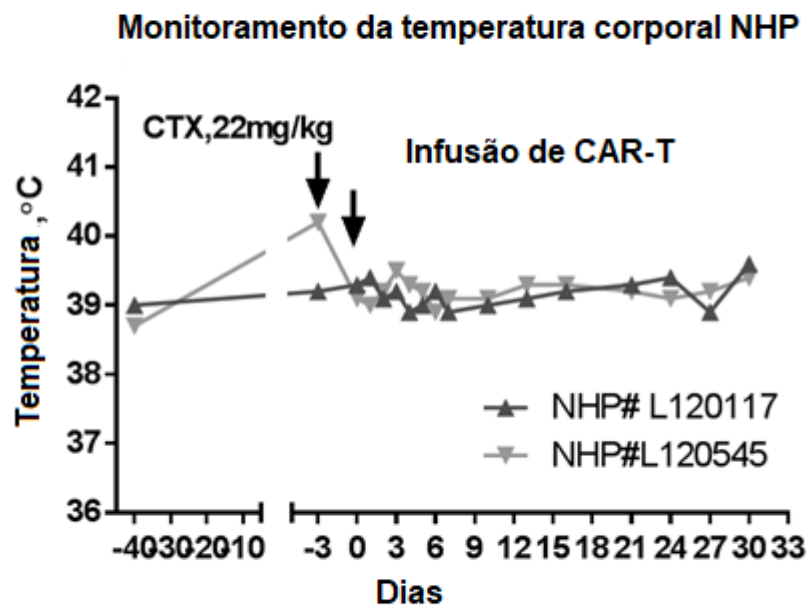
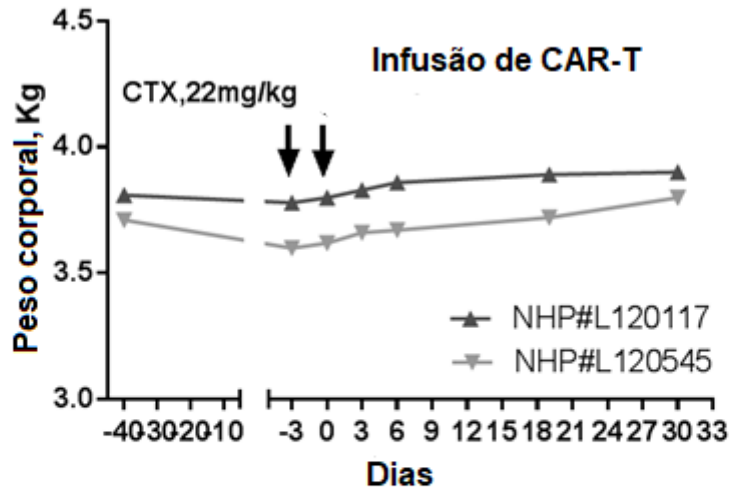
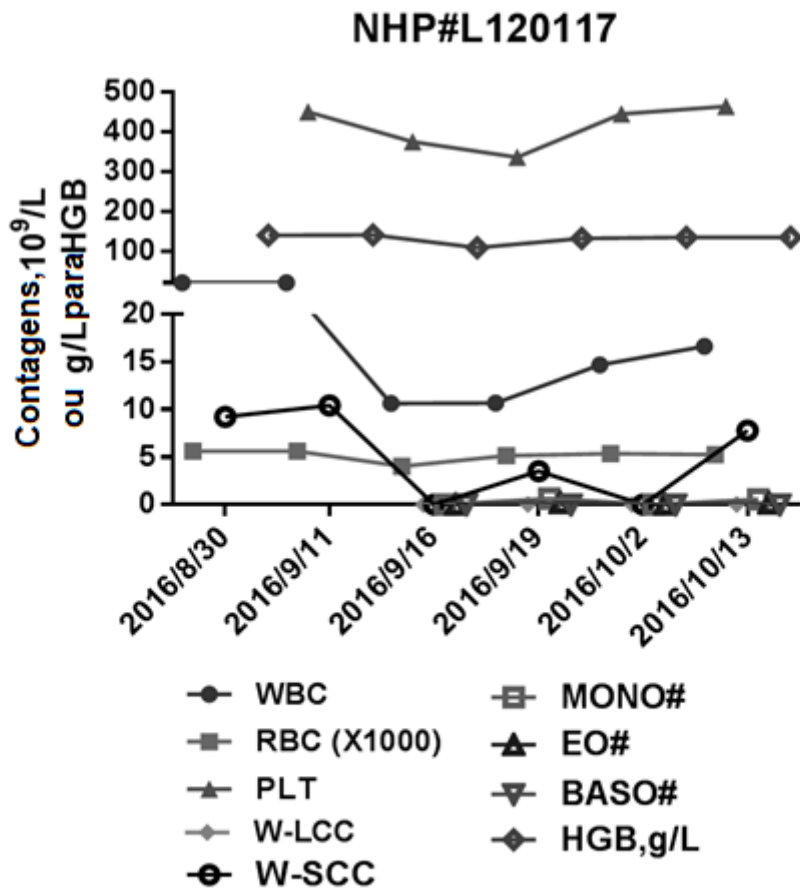


FIG. 13A

**Monitoramento de peso corporal de estudo NHP**



**FIG. 13B**



**FIG. 13C**

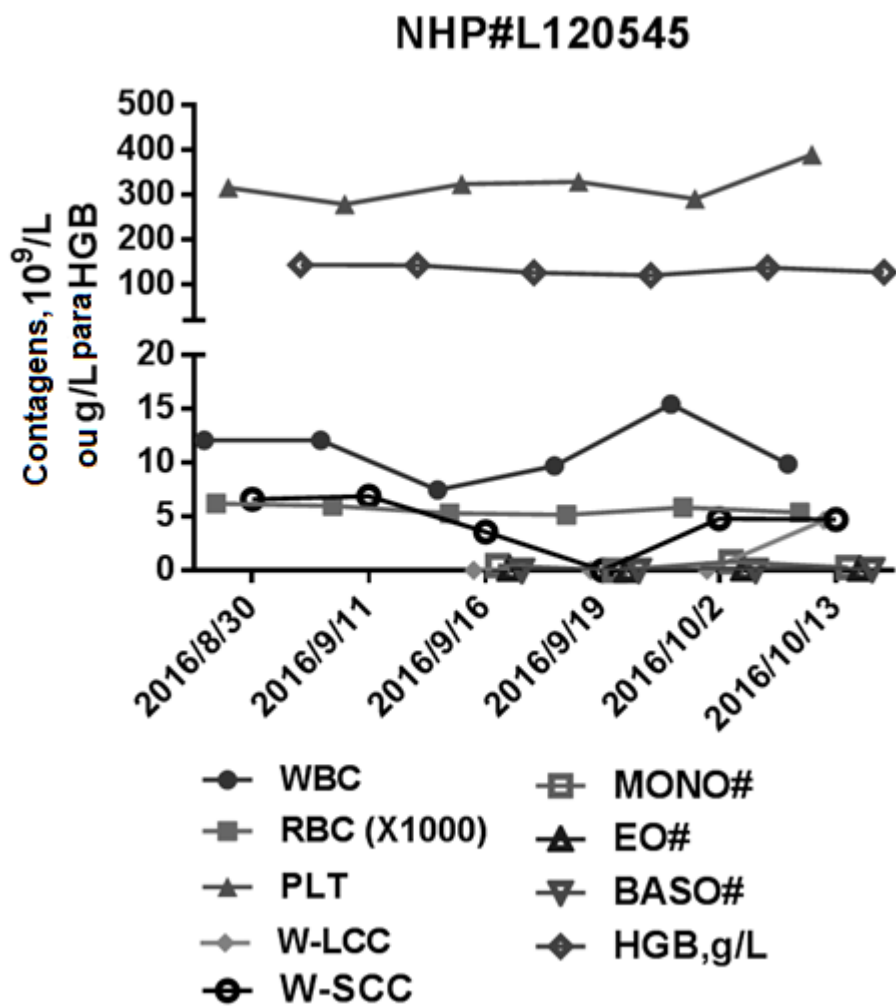


FIG. 13D

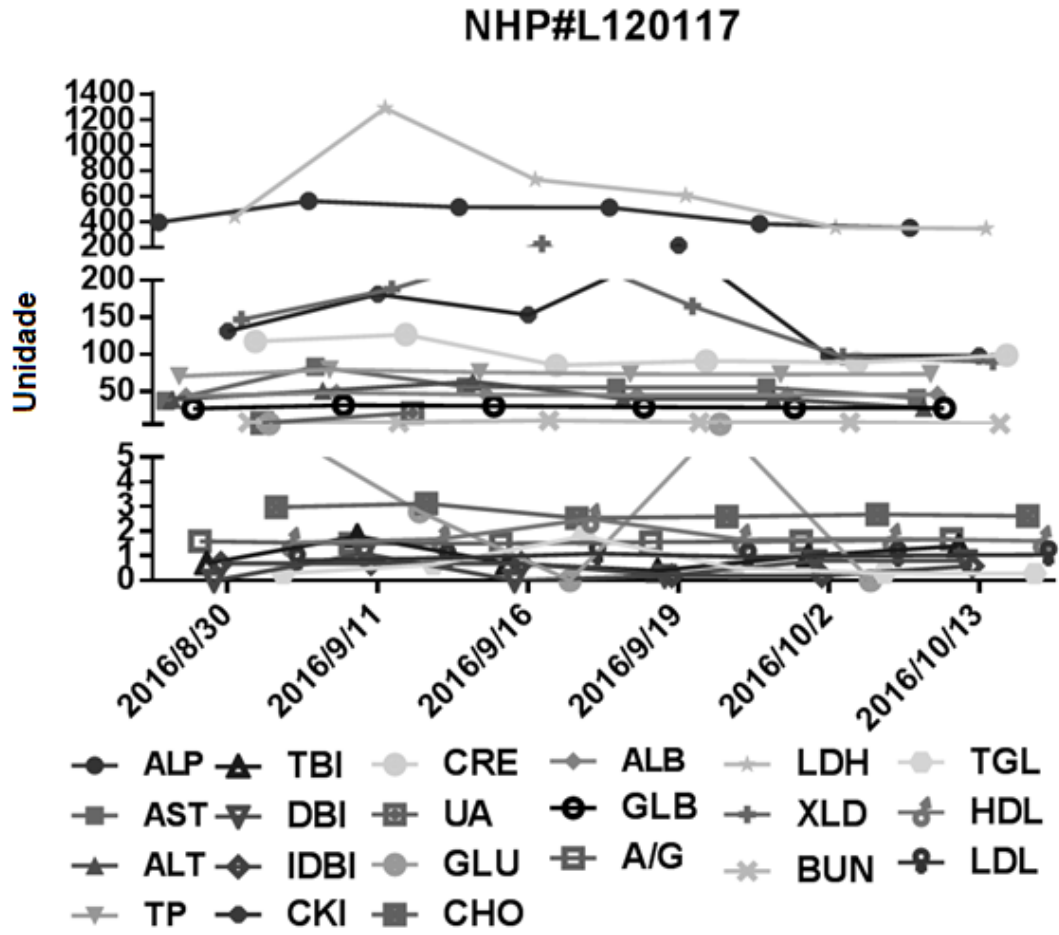


FIG. 13E

### NHP#L120545

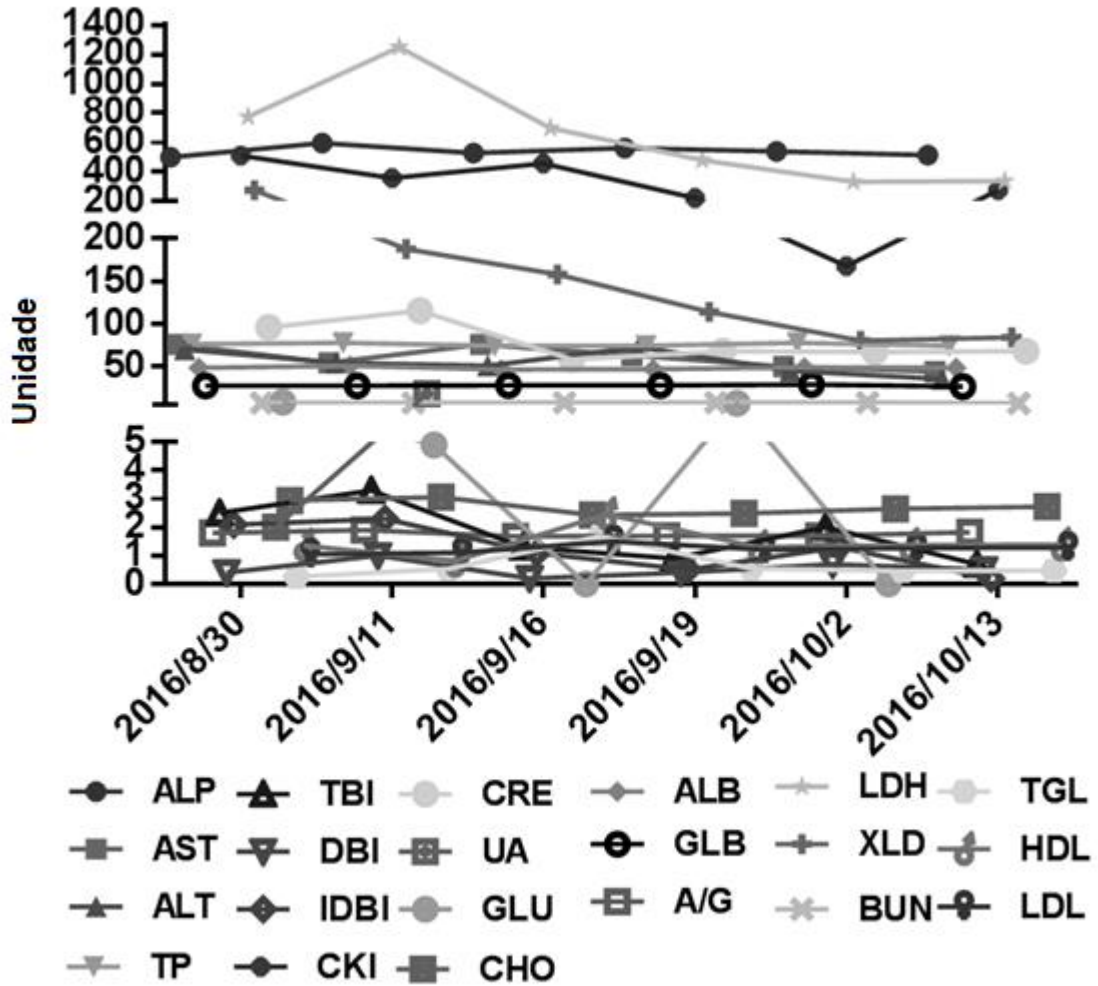


FIG. 13F

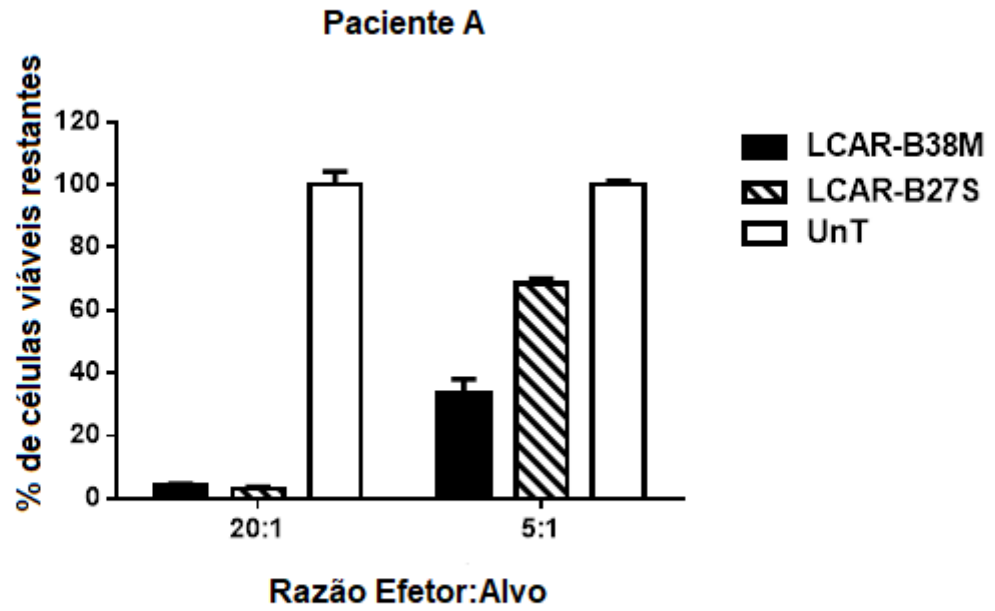


FIG. 14A

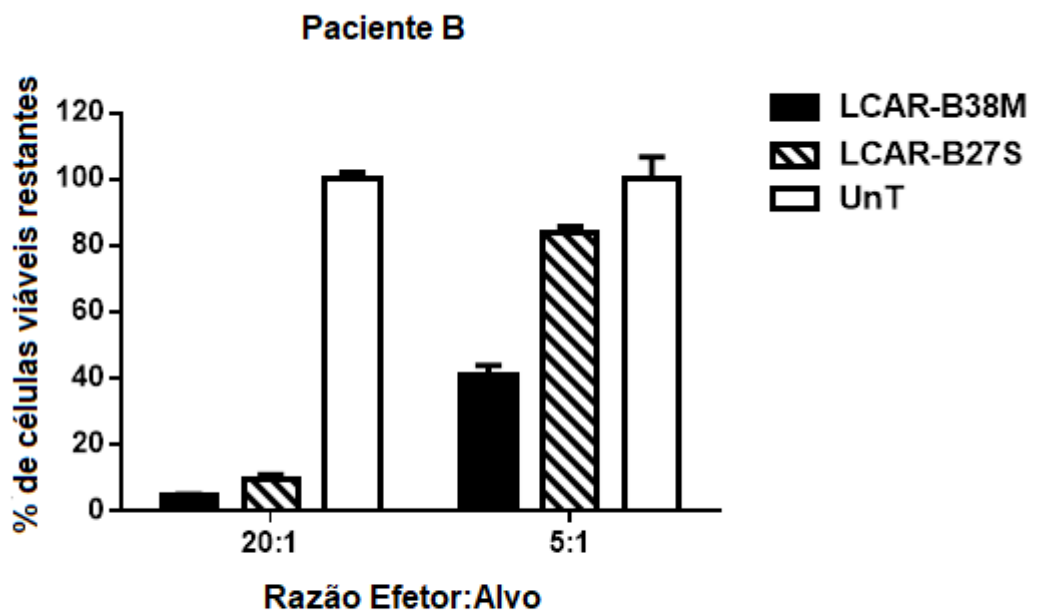


FIG. 14B



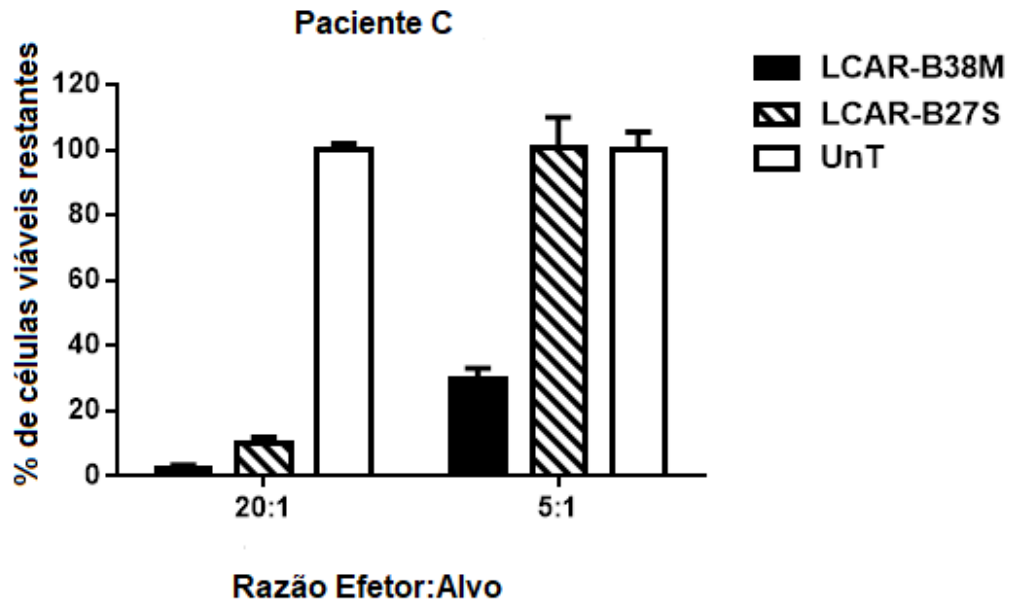


FIG. 14C

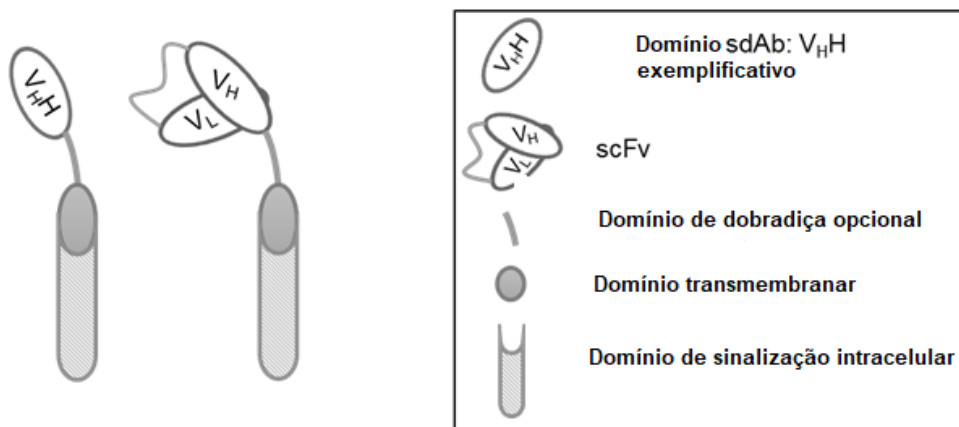


FIG. 15A

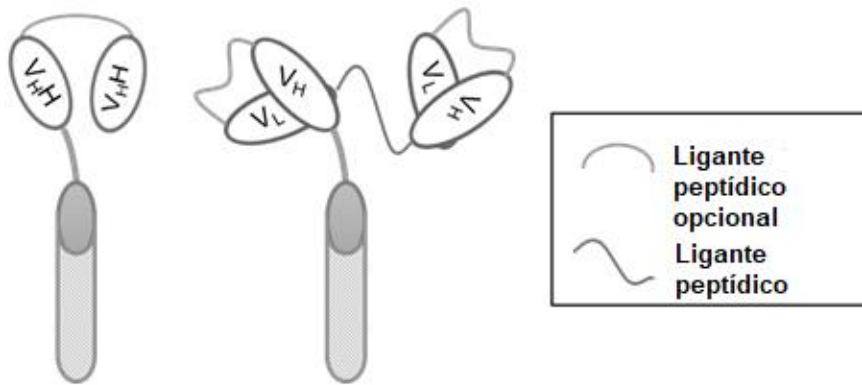


FIG. 15B

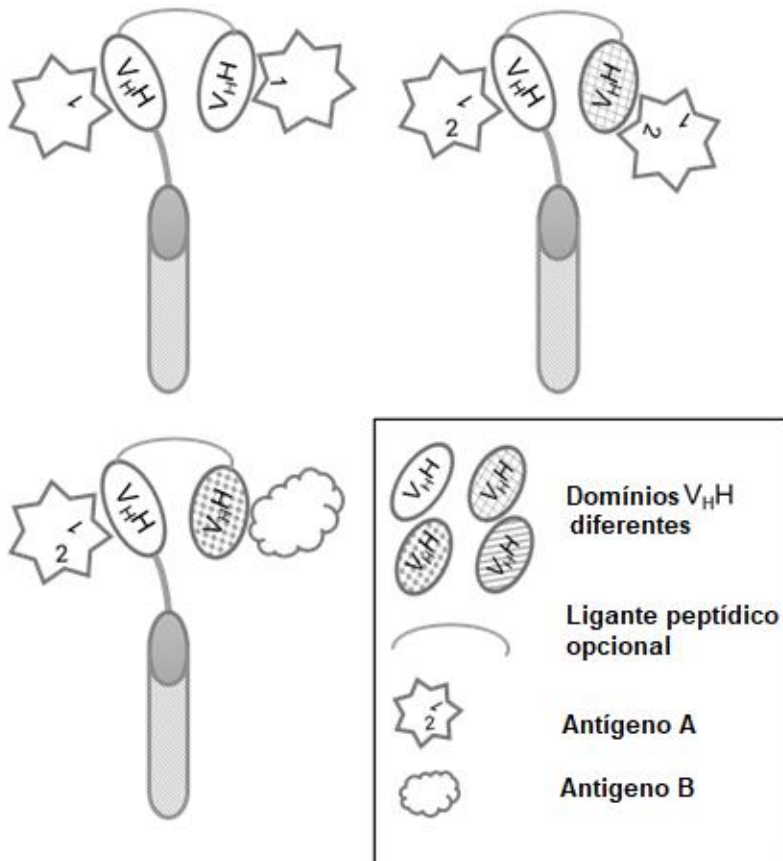
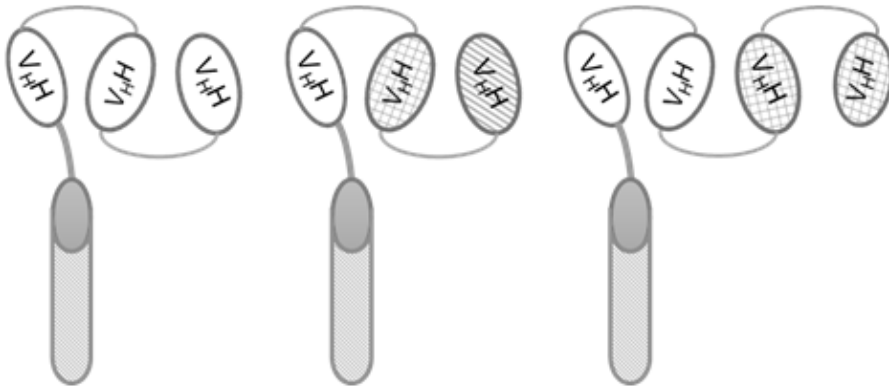
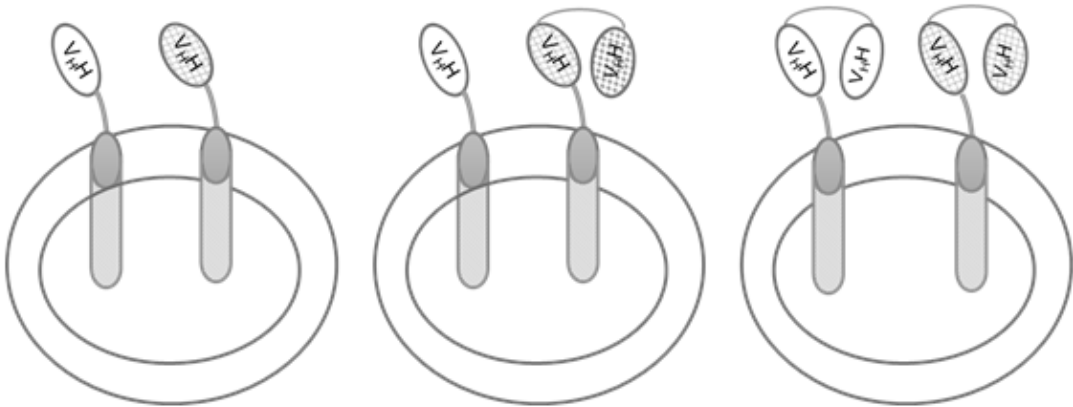


FIG. 15C



**FIG. 15D**



**FIG. 15E**

## **RESUMO**

### **RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO QUE DIRECIONAM BCMA E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS**

O presente pedido fornece anticorpos de domínio único que direcionam BCMA e receptores de antígeno quiméricos (tal como CAR monovalente e CAR multivalente incluindo CAR de biepítopo) compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-BCMA. Adicionalmente são fornecidas células efectoras imunes engenheiradas (tal como células T) que compreendem os receptores de antígenos quiméricos. Também são fornecidas composições farmacêuticas, kits e métodos de tratamento de câncer.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Doc 8 LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS -
- Data de Geração do Código: 26/02/2024
- Hora de Geração do Código: 18:53:07
- Código de Controle:
  - Campo 1: C3048607AB7F6E91
  - Campo 2: 418B8A73B690C324