República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718644-4 A2

* B R P I 0 7 1 8 6 4 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 13/11/2007
(43) Data da Publicação: 26/11/2013
(RPI 2238)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/18
A61K 39/395
A61K 47/48
A61K 51/10
A61P 35/00
A61P 37/04
C07K 16/18
C07K 16/30
C07K 16/46
C12P 21/08
G01N 33/574
G01N 33/577

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, ANTICORPOS HUMANIZADO E QUIMÉRICO DO ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, LINHA DE CÉLULA HIBRIDOMA ISOLADA, MÉTODO PARA INICIAR A CITOTOXIDEZ INDUZIDA POR ANTICORPO DE CÉLULAS CANCEROSAS EM UMA AMOSTRA DE TECIDO SELECIONADA DE UM TUMOR HUMANO, CDMAB DO ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU SEU CDMAB E USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL OU SEU CDMAB, SOZINHO OU EM CONJUÇÃO COM PELO MENOS UM AGENTE QUIMIOTERAPÊUTICO, E COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 13/11/2006 US 60/865,476

(73) Titular(es): Arius Research INC.

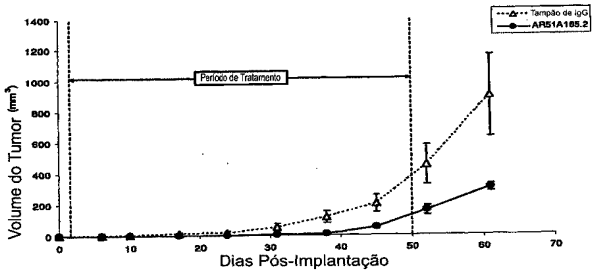
(72) Inventor(es): David S. F. Young , Helen P. Findlay, Lisa M. Cechetto, Susan E. Hahn

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007002027 de 13/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/058379de 22/05/2008

(57) Resumo:



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, ANTICORPOS HUMANIZADO E QUIMÉRICO DO ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, LINHA DE CÉLULA HIBRIDOMA ISOLADA, MÉTODO PARA INICIAR A CITOTOXIDEZ INDUZIDA POR ANTICORPO DE CÉLULAS CANCEROSAS EM UMA AMOSTRA DE TECIDO SELECIONADA DE UM TUMOR HUMANO, CDMAB DO ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, CDMAB DO ANTICORPO HUMANIZADO E QUIMÉRICO, ANTICORPO ISOLADO OU SEU CDMAB E USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL OU SEU CDMAB, SOZINHO OU EM CONJUNÇÃO COM PELO MENOS UM AGENTE QUIMIOTERAPÊUTICO, E COMPOSIÇÃO"**.

DECLARAÇÃO DE ACORDO DE PESQUISA COOPERATIVA

A presente invenção, conforme definido pelas reivindicações aqui, neste requerimento de Patente, foi realizada pelas partes para um Acordo de Pesquisa Conjunta (*Joint Research Agreement*, "Acordo") entre Arius Research Inc. and Takeda Pharmaceutical Company Limited, em consequência de atividades empreendidas dentro do âmbito daquele Acordo. O Acordo estava em efeito antes da data da invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presenet invenção refere-se ao isolamento e à produção de anticorpos modificando doenças cancerosas (CDMAB) e ao uso destes CDMAB em processos terapêuticos e diagnósticos, opcionalmente em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos. A invenção adicionalmente refere-se a provas de ligação as quais utilizam o CDMAB da presente invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Anticorpos Monodonais como Terapia do Câncer: Cada indivíduo que se apresenta com câncer é único e tem um câncer que é tão diferente de outros cânceres quanto a identidade destas pessoas. Apesar disso, a terapia corrente trata todos os pacientes com o mesmo tipo de câncer, no mesmo estágio, do mesmo modo. No mínimo 30 por cento destes pacientes não terão sucesso com a primeira linha de terapia, deste modo levando a cursos de tratamento adicionais e à aumentada probabilidade de fracasso do tratamento, metástases, e finalmente, morte. Uma abordagem superior ao tratamento seria a customização da terapia para o indivíduo em particular. A única terapia corrente a qual se presta a customização é cirurgia. Quimioterapia e tratamento de

radiação não podem ser talhados para o paciente, e a cirurgia por si só, na maioria dos casos é inadequada para produzir curas.

Com o advento de anticorpos monoclonais, a possibilidade de desenvolver métodos para terapia customizada se tornou mais realista uma vez que cada anticorpo pode ser dirigido para um único epitopo. Além disso, é possível produzir uma combinação de anticorpos que são dirigidos para a constelação de epitopos que definem unicamente tumor de um indivíduo em particular.

Tendo reconhecido que uma significativa diferença entre células cancerosas e normais é que as células cancerosas contêm antígenos que são específicos para células transformadas, a comunidade científica tem mantido há muito tempo que os anticorpos monoclonais podem ser designados para ter por alvo especificamente células transformadas ligando especificamente a estes antígenos cancerígenos; deste modo dando origem à cresnça de que anticorpos monoclonais podem servir como "Balas Mágicas" para eliminar células cancerígenas. No entanto, é agora amplamente reconhecido que nenhum anticorpo monoclonal pode servir em todos os casos de câncer, e que anticorpos monoclonais podem ser dispostos, como uma classe, como tratamentos do câncer alvo. Foi mostrado que anticorpos monoclonais isolados de acordo com os ensinamentos da invenção presentemente revelada modificam o processo de doenças cancerosas em uma maneira a qual é benéfica para o paciente, por exemplo, reduzindo a carga tumoral, e serão referidos variadamente aqui, neste requerimento de Patente, como anticorpos modificando doenças cancerosas (CDMAB) ou anticorpos "anti-câncer".

Atualmente, o paciente com câncer geralmente tem poucas opções de tratamento. A abordagem organizada para terapia do câncer tem produzido melhoras nas taxas globais de sobrevida e morbidez. No entanto, para o indivíduo em particular, estas estatísticas aprimoradas não se correlacionam necessariamente com uma melhora em sua situação pessoal.

Portanto, se fosse proposta uma metodologia a qual possibilitasse ao clínico tratar cada tumor independentemente de outros pacientes na mesma coorte, isto permitiria a abordagem única de adequar a terapia a somente aquela pessoa. Um curso de terapia similar, idealmente, aumentaria a taxa de curas, e produziria melhores resultados, deste modo satisfazendo uma necessidade há muito tempo reconhecida.

Historicamente, o uso de anticorpos policlonais tem sido usado

com sucesso limitado no tratamento de cânceres humanos. Linfomas e leucemias têm sido tratadas com plasma humano, mas houve poucas respostas ou remissão prolongada. Além disso, houve uma falta de reprodutibilidade e não houve benefício adicional comparado à quimioterapia. Tumores sólidos tais como cânceres de mama, melanomas e carcinomas de células renais também têm sido tratados com sangue humano, soro de chimpanzé, plasma humano e soro de cavalo com resultados correspondentemente imprevisíveis e ineficazes.

Houve muitas provas clínicas de anticorpos monoclonais para tumores sólidos. Nos anos 1980s houve no mínimo quatro provas clínicas para câncer de mama humano as quais produziram somente um respondedor entre no mínimo 47 pacientes usando anticorpos contra antígenos específic ou baseados em seletividade tecidual. Somente em 1998 que houve um experimento clínico bem sucessido usando um anticorpo anti-Her2/neu humanizado (Herceptin®) em combinação com CISPLATIN. Neste experimento 37 pacientes foram avaliados para respostas de quais em torno de um quarto tiveram uma taxa de resposta parcial e um quarto adicional teve progressão de doença menor ou estável. O tempo médio para progressão entre os respondedores foi de 8,4 meses com duração de resposta média de 5,3 meses.

Herceptin® foi aprovado em 1998 para uso de primeira linha em combinação com Taxol®. Resultados de estudos clínicos mostraram um aumento no tempo médio para progressão da doença para aqueles que receberam terapia de anticorpos mais Taxol® (6,9 meses) em comparação com o trupo que receveu Taxol® somente (3,0 meses). Houve também um ligeiro aumento na sobrevida média; 22 versus 18 meses para o ramo de tratamento com Herceptin® mais Taxol® versus o ramo de tratamento com Taxol® somente. Além disso, houve um aumento no número de tanto respondedores completos (8 versus 2 por cento) quanto parciais (34 versus 15 por cento) no grupo de combinação de anticorpo mais Taxol® em comparação com Taxol® somente. No entanto, tratamento com Herceptin® e Taxol® levou a uma maior incidência de cardiotoxicidade em comparação com

tratamento com Taxol® somente (13 versus 1 por cento respectivamente). Além disso, terapia com Herceptin® foi somente eficaz para pacientes que supexpressam (conforme determinado através de imunohistoquímica (IHC) análise) o receptor do fator do crescimento epidermal humano 2 (Her2/neu), um receptor, o qual atualmente não tem função conhecida ou ligante biologicamente importante; aproximadamente 25 por cento de pacientes que têm câncer de mama metastático. Portanto, ainda há uma grande necessidade não satisfeita da parte de pacientes com câncer de mama. Mesmo aqueles que podem se beneficiar de tratamento com Herceptin® ainda necessitariam de quimioterapia e consequentemente ainda teriam de lidar com, no mínimo em algum grau, os efeitos colaterais deste tipo de tratamento.

As provas clínicas investigando câncer colorretal envolvem anticorpos contra tanto glicoproteína quanto alvos glicolipídicos. Anticorpos tais como 17- 1A, o qual tem alguma especificidade para adenocarcinomas, foram submetidos a provas clínicas Fase 2 em mais de 60 pacientes com somente 1 paciente tendo uma reação parcial. Em outras provas, o uso de 17-1A produziu somente 1 reação completa e 2 reações menores entre 52 pacientes em protocolos usando ciclofosfamida adicional. Até o momento, provas clínicas fase III de 17-1A não demonstraram aprimorada eficácia como terapia adjuvante para câncer de cólon estágio III. O uso de um anticorpo monoclonal murino humanizado inicialmente aprovado para estudo por imagens também não produziu regressão tumoral. Somente recentemente houve quaisquer resultados positivos de estudos clínicos de câncer colorretal com o uso de anticorpos monoclonais. Em 2004, ERBITUX® foi aprovado para a segunda linha de tratamento de pacientes com câncer colorretal metastático expressando EGFR que são refratários a quimioterapia à base de irinotecan. Os resultados de tanto um estudo clínico Fase II de dois ramos quanto de um estudo de único ramo mostraram que ERBITUX® em combinação com irinotecan teve uma taxa de resposta de 23 e 15 por cento respectivamente um tempo médio para progressão da doença de 4,1 e 6,5 meses respectivamente. Os resultados do mesmo estudo clínico Fase II de dois ramos e outro estudo de único ramo mostraram que tratamento com ERBI-

TUX® somente resultou em uma taxa de resposta de 11 e 9 por cento respectivamente com um tempo médio para progressão da doença de 1,5 e 4,2 meses respectivamente.

Consequentemente tanto na Suíça quanto nos Estados Unidos, tratamento com ERBITUX® em combinação com irinotecan, e nos Estados Unidos, tratamento com ERBITUX® somente, foi aprovado como um tratamento de segunda linha de pacientes com câncer de cólon que falharam na terapia com irinotecan de primeira linha. Portanto, como Herceptin®, tratamento na Suíça somente é aprovado como uma combinação de anticorpo monoclonal e quimioterapia. Além disso, tanto na Suíça quanto nos Estados Unidos o tratamento somente é aprovado para pacientes como uma terapia de segunda linha. Além disso, em 2004, AVASTIN® foi aprovado para uso em combinação com quimioterapia à base de 5-fluorouracila intravenoso como um tratamento de primeira linha de câncer colorretal metastático. Os resultados de estudo clínicos Fase III demonstraram um prolongamento na sobrevida média de pacientes tratados com AVASTIN® mais 5-fluorouracila comparados com pacientes tratados com 5-fluourouracila somente (20 meses versus 16 meses respectivamente). No entanto, novamente como Herceptin® e ERBITUX®, o tratamento somente é aprovado como uma combinação de anticorpo monoclonal e quimioterapia.

Também continua a ter resultados pobres para câncer pulmonar, cerebral, de ovário, pancreático, de próstata, e de estômago. Os resultados recentes mais promissores para câncer pulmonar de células não pequenas vêm de uma prova clínica Fase II onde o tratamento envolveu um anticorpo monoclonal (SGN-15; dox-BR96, anti-Sialyl-LeX) conjugado ao fármaco de morte celular doxorubicina em combinação com o agente quimioterápico TAXOTERE®. TAXOTERE® é a única quimioterapia aprovada pela agência de regulamentação de fármacos e alimentos dos Estados Unidos (FDA) para o tratamento de segunda linha de câncer pulmonar. Dados iniciais indicam uma sobrevida global aumentada comparada com TAXOTERE® somente. Dos 62 pacientes que foram recrutados para o estudo, dois terços receberam SGN-15 e, combinação com TAXOTERE® ao passo que o um terço

restante recebeu TAXOTERE® somente. Para os pacientes recebendo SGN-15 em combinação com TAXOTERE®, a sobrevida global média foi de 7,3 meses em comparação com 5,9 meses para os pacientes recebendo TAXOTERE® somente. A sobrevida global em 1 ano e 18 meses foi de 29 e 18 por cento respectivamente para os pacientes recebendo SNG- 15 mais TAXOTERE® comparada com 24 e 8 por cento respectivamente para os pacientes recebendo TAXOTERE® somente. Adicionalmente estão planejadas provas clínicas.

Pré-clinicamente, tem havido algum sucesso limitado no uso de anticorpos monoclonais para melanoma. Muito poucos destes anticorpos têm atingido provas clínicas e até o momento nenhum foi aprovado ou demonstrou resultados favoráveis em provas clínicas Fase III.

A descoberta de novos fármacos para tratar doença é dificultada pela falta de identificação de alvos relevantes entre os produtos de 30.000 genes conhecidos que contribuiriam para patogênese da doença. Em pesquisa oncológica, alvos de fármacos potenciais são frequentemente selecionados simplesmente devido ao fato de que são superexpressados em células tumorais. Alvos identificados deste modo são então triados para interação com uma multitude de compostos. No caso de terapias de anticorpos potenciais, estes compostos candidatos são geralmente derivados de métodos tradicionais de geração de anticorpo monoclonal de acordo com os princípios fundamentais estabelecidos por Kohler e Milstein (1975, Nature, 256, 495-497, Kohler and Milstein). Células de baço são coletadas de camundongos imunizados com antígeno (por exemplo, células inteiras, frações de células, antígeno purificado) e fundidas com parceiros de hibridoma imortalizado. Os hibridomas resultantes são triados e selecionados para secreção de anticorpos os quais ligam mais avidamente ao alvo. Muitos anticorpos terapêuticos e diagnósticos dirigidos contra células cancerígenas, incluindo Herceptin® e RITUXIMAB, têm sido produzidos usando estes métodos e selecionados com base em sua afinidade. As falhas nesta estratégia são duplas. Em primeiro lugar, a escolha de alvos apropriados para ligação de anticorpos terapêuticos ou diagnósticos é limitada pela escassez do conhecimento de

processos carcinogênicos específicos do tecido circunjacente e os métodos simplistas resultantes, tais como seleção por superexpressão, pelos quais estes alvos são identificados. Em segundo lugar, a hipótese de que a molécula de fármaco que liga ao receptor com a maior afinidade geralmente tem a maior probabilidade para iniciar ou inibir um sinal pode não ser sempre o caso.

Apesar de algum progresso com o tratamento de câncer de mama e de cólon, a identificação e o desenvolvimento de terapias de anticorpos eficazes, quer como agentes únicos ou como co-tratamentos, tem sido inadequada para todos os tipos de câncer.

Patentes Anteriores:

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.750.102 revela um processo em que células do tumor de um paciente são transfectadas com genes MHC os quais podem ser clonados a partir de células ou tecido do paciente. Estas células transfectadas são então usadas para vacinar o paciente.

A Patente dos Estados Unidos Nº 4.861.581 revela um processo compreendendo as etapas de obter anticorpos monoclonais que são específicos para um componente celular interno de células neoplásicas e normais do mamífero mas não a componentes externos, etiquetar o anticorpo monoclonal, contactar o anticorpo etiquetado com tecido de um mamífero que recebeu terapia para matar células neoplásicas, e determinar a eficácia da terapia medindo a ligação do anticorpo etiquetado ao componente celular interno das células neoplásicas degenerativas. Ao preparar anticorpos dirigidos para antígenos intracelulares humanos, o detentor da Patente reconhece que células malignas representam uma fonte conveniente de similares antígenos.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.171.665 proporciona um novo anticorpo e um método para sua produção. Especificamente, a Patente ensina a formação de um anticorpo monoclonal o qual tem a propriedade de ligar fortemente a um antígeno de proteína associado com tumores humanos, por exemplo, os do cólon e do pulmão, enquanto ligando a células normais em um grau muito menor.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.484.596 proporciona um método de terapia contra câncer compreendendo remover cirurgicamente tecido tumoral de um paciente com câncer humano, tratar o tecido tumoral para obter células tumorais, irradiando as células tumorais para serem viáveis mas não-tumorigênicas, e usando estas células para preparar uma vacina para o paciente capaz de inibir a recorrência do tumor primário ao mesmo tempo que simultaneamente inibindo metástases. A Patente ensina o desenvolvimento de anticorpos monoclonais os quais são reativos com antígenos da superfície de células tumorais. Conforme determinado na coluna 4, linhas 45 e seguintes, os detentores da Patente utilizam células tumorais autóctonas no desenvolvimento de anticorpos monoclonais expressando imunoterapia ativa específica em neoplasia humana.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.693.763 ensina um antígeno de glicoproteína característico de carcinomas humanos e não dependente do tecido epitelial de origem.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.783.186 é dirigida a anticorpos Anti-Her2 os quais induzem apoptose em células expressando Her2, linhagens de células de hibridoma produzindo os anticorpos, métodos para tratar câncer usando os anticorpos e composições farmacêuticas incluindo os referidos anticorpos.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.849.876 descreve novas linhagens de células de hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais para antígenos de mucina purificados a partir de fontes de tecido tumoral e não-tumoral.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.869.268 é dirigida a um método para gerar um linfócito humano produzindo um anticorpo específico para um antígeni desejado, um método para produzir um anticorpo monoclonal, bem como anticorpos monoclonais produzidos pelo método. A Patente é particularmente dirigida à produção de um anticorpo monoclonal anti-HD humano útil para o diagnóstico e tratamento de cânceres.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.869.045 refere-se a anticorpos, fragmentos de anticorpos, conjugados de anticorpos e imunotoxinas de

cadeia única reativas com células de carcinoma humano.

O mecanismo pelo qual estes anticorpos funcionam é duplo, em que as moléculas são reativas com antígenos da membrana celular presentes sobre a superfície de carcinomas humanos, e adicionalmente em que os anticorpos têm a capacidade de internalizar dentro das células de carcinoma, subsequente a ligação, tornando-os especialmente úteis para formar conjugados de anticorpo-fármaco e de anticorpo-toxina. Em sua forma não modificada os anticorpos também manifestam propriedades citotóxicas em concentrações específicas.

A Patente dos Estados Unidos Nº 5.780.033 revela o uso de autoanticorpos para terapia e profilaxia de tumores. No entanto, este anticorpo é um autoanticorpo antinuclear de um mamífero amadurecido. Neste caso, diz-se que o autoanticorpo é um tipo de anticorpo natural encontrado no sistema imune. Como o autoanticorpo se origina de "um mamífero amadurecido", não há necessidade de que o autoanticorpo realmente se origine do paciente sendo tratado. Além disso a Patente revela autoanticorpo antinuclear natural e monoclonal de um mamífero amadurecido, e uma linhagem de células de hibridoma produzindo um autoanticorpo antinuclear monoclonal.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Este requerimento utiliza metodologia para produzir anticorpos anticancerígenos paciente-específicos ensinados na Patente dos Estados Unidos Nº 6.180.357 para isolar linhagens de células de hibridoma as quais codificam para anticorpos monoclonais modificando doenças cancerosas. Estes anticorpos podem ser produzidos especificamente para um tumor e portanto tornam possível a customização da terapia do câncer. Dentro do contexto deste requerimento, anticorpos anticancerígenos tendo quer propriedades de destruição celular (citotóxicas) ou de inibição do crescimento celular (citostáticsa) serão referidos nas partes que se seguem como citotóxicos. Estes anticorpos podem ser usados no auxílio do estagiamento e diagnóstico de um câncer, e podem ser usados para tratar metástases tumorais. Estes anticorpos também podem ser usados para a prevenção de câncer por

meio de tratamento profilático. Diferentemente de anticorpos produzidos de acordo com paradigmas de descoberta de fármacos tradicionais, anticorpos produzidos deste modo podem ter por alvo moléculas e caminhos não mostrados previamente como sendo integrais para o crescimento e/ou sobrevida de tecido maligno. Além disso, as afinidades de ligação destes anticorpos são adequadas para os requisitos para iniciação dos eventos citotóxicos que podem não ser suscetíveis a interações de afinidade mais fortes. Além disso, está dentro do âmbito desta invenção conjugar modalidades quimioterápicas de rotina, por exemplo, radionuclídeos, com o CDMAB da presente invenção, deste modo focalizando o uso dos referidos quimioterápicos. O CDMAB também pode ser conjugado a toxinas, porções citotóxicas, enzimas, por exemplo, enzimas conjugadas a biotina, ou células hematógenas, deste modo formando um conjugado de anticorpos.

A perspectiva de tratamento anti-câncer individualizado produzirá uma alteração no modo em que um paciente é tratado. Um cenário clínico provável é que uma amostra tumoral é obtida no momento da apresentação, e depositada. A partir desta amostra, o tumor pode ser classificado a partir de um painel de anticorpos modificando doenças cancerosas preexistentes. O paciente será convencionalmente estagiado mas os anticorpos disponíveis podem ser úteis em estagiamento adicional do paciente. O paciente pode ser tratado imediatamente com os anticorpos existentes, e um painel de anticorpos específicos para o tumor pode ser produzido quer usando os métodos resumidos aqui, neste requerimento de Patente, ou através do uso de bibliotecas de display de fago em combinação com os métodos de triagem revelados aqui, neste requerimento de Patente. Todos os anticorpos produzidos serão adicionados à biblioteca de anticorpos anticancerígenos uma vez que há uma possibilidade de que outros tumores possam portar alguns dos mesmos epitopos que aquele que está sendo tratado. Os anticorpos produzidos de acordo com este método podem ser úteis para tratar doença cancerosa em qualquer número de pacientes que tenham cânceres que ligam a estes anticorpos.

Além de anticorpos anticancerígenos, o paciente pode escolher

receber as terapias atualmente recomendadas como parte de um regime multi-modal de tratamento. O fato de que os anticorpos isolados através da presente metodologia são relativamente não-tóxicos para células não cancerosas permite que sejam usadas combinações de anticorpos em altas doses, quer somente, ou em combinação com terapia convencional. O alto índice terapêutico também permitirá retratamento em uma curta escala de tempo que reduziria a probabilidade de surgimento de células resistentes a tratamento.

Se o paciente for refratário ao curso inicial de terapi ou desenvolver metástases, o processo de produção de anticorpos específicos para o tumor pode ser repetido para retratamento. Além disso, os anticorpos anticancerígenos podem ser conjugados a hemácias obtidas daquele paciente e reinfundidas para tratamento de metástases. Tem havido poucos tratamentos eficazes para câncer metastático e metástases geralmente prognosticam um resultado pobre resultando em morte. No entanto, cânceres metastáticos são geralmente bem vascularizados e a liberação de anticorpos anticancerígenos por hemácias pode ter o efeito de concentrar os anticorpos no sítio do tumor. Mesmo antes das metástases, a maioria das células cancerígenas são dependentes do suprimento de sangue do hospedeiro para sua sobrevida e um anticorpo anticancerígeno conjugado a hemácias pode ser eficaz contra tumores in situ também. Alternativamente, os anticorpos podem ser conjugados a outras células hematógenas, por exemplo, linfócitos, macrófagos, monócitos, células assassinas naturais, e etc.

Há cinco classes de anticorpos e cada uma é associada a uma função que é conferida por sua cadeia pesada. Imagina-se que geralmente a destruição de células cancerígenas por anticorpos nus é mediada ou através de citotoxicidade celular dependente de anticorpos ou através de citotoxicidade dependente do complemento. Por exemplo, anticorpos IgM e IgG2a murinos podem ativar o complemento humano ligando o componente C-I do sistema do complemento deste modo ativando o caminho clássico de ativação do complemento o qual pode levar a lise tumoral. Para anticorpos humanos os anticorpos de ativação do complemento mais eficazes são geral-

mente IgM e IgGI. Anticorpos murinos do isótipo IgG2a e IgG3 são eficazes no recrutamento de células citotóxicas que têm receptores de Fc os quais levaarão a morte celular por monócitos, macrófagos, granulócitos e alguns linfócitos. Anticorpos humanos tanto do isótipo IgGI quanto IgG3 mediam ADCC.

Outro mecanismo possível de destruição de câncer mediada por anticorpos pode ser através do uso de anticorpos que funcionam catalisando a hidrólise de várias ligações químicas na membrana celular e suas glicoproteínas ou seus glicolipídeos associados, denominados anticorpos catalíticos.

Há três mecanismos adicionais de destruição de células cancerígenas mediadas por anticorpos. O primeiro é o uso de anticorpos como uma vacina para induzir o corpo a produzir uma reação imune contra o antígeno putativo que reside sobre a célula cancerígena. O segundo é o uso de anticorpos para atingir receptores do crescimento e interferir com sua função ou para regular para baixo o receptor de modo que sua função seja perdida de modo eficaz. O terceiro é o efeito de similares anticorpos sobre ligação direta de porções da superfície celular que pode levar a morte celular direta, tal como ligação de receptores de morte tais como TRAIL RI ou TRAIL R2, ou moléculas de integrina tais como alfa V beta 3 e similares.

A utilidade clínica de um fármaco contra câncer se baseia no benefício do fármaco sob um perfil de risco aceitável para o paciente. Na terapia do câncer a sobrevida geralmente tem sido o benefício posterior mais buscado, no entanto há uma série de outros benefícios reconhecidos de modo geral além de prolongar a vida. Estes outros benefícios, onde o tratamento não afeta de modo adverso a sobrevida, incluem alívio de sintomas, proteção contra eventos adversos, prolongamento no tempo para recorrência ou sobrevida livre de doença, e prolongamento no tempo para progressão. Estes critérios são aceitos de modo geral e organismos reguladores tais como a agência F.D.A. dos Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*) aprovam fármacos que produzem estes benefícios (Hirschfeld et al. Critical Reviews in Oncology/Hematolgy 42:137-143 2002). Além destes critérios é reconhecido de modo geral que há outros desfechos que podem anunciar

estes tipos de benefícios. Em parte, o processo de aprovação acelerado concedido pela agência F.D.A. dos Estados Unidos admite que há substitutos que provevelmente prognosticarão benefício para o paciente. Por volta do final do ano de 2003, houve dezesseis fármacos aprovados sob este processo, e destes, quatro foram submetidos a aprovação plena, isto é, estudos de seguimento demonstraram benefício direto para o paciente conforme previsto por desfechos substitutos. Um desfecho importante para determinar efeitos de fármacos em tumores sólidos é a avaliação da carga tumoral medindo a resposta ao tratamento (Therasse et at. Journal of the National Cancer Institute 92(3):205-216 2000). Os critérios clínicos (RECIST criteria) para similar avaliação foram promulgados pelo *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Working Group* (N.T.: Grupo de Trabalho sobre Critérios de Avaliação da Resposta em Tumores Sólidos), um grupo de especialistas internacionais em câncer. Fármacos com um efeito demonstrado sobre a carga tumoral, conforme mostrado por respostas objetivas de acordo com os critérios RECIST, em comparação com o grupo controle apropriado tendem a, essencialmente, produzir benefício direto para o paciente. No cenário pré-clínico a carga tumoral é geralmente mais constante para avaliar e documentar. Nestes estudos pré-clínicos podem ser traduzidos para o cenário clínico, fármacos que produzem prolongada sobrevida em modelos pré-clínicos têm a maior utilidade clínica prevista. De modo análogo à produção de respostas positivas ao tratamento clínico, fármacos que reduzem a carga tumoral no cenário pré-clínico também podem ter impacto direto significativo sobre a doença. Embora o prolongamento da sobrevida seja o resultado clínico posterior mais buscado do tratamento de câncer com fármaco, há outros benefícios que têm utilidade clínica e é evidente que a redução da carga tumoral, a qual pode se correlacionar com um atraso na progressão da doença, prolongar a sobrevida ou ambos, também pode levar a benefícios diretos e ter impacto clínico (Eckhardt et a Developmental Therapeutics: Successes and Failures of Clinical Trial Designs of Targeted Compounds; ASCO Educational Book, 39th Annual Meeting, 2003, pp. 209-219).

A presente invenção descreve o desenvolvimento e uso de

AR51A165.2 identificado por seu efeito em uma prova citotóxica e em um modelo animal de câncer humano. Esta invenção descreve reagentes que ligam especificamente a um epitopo ou epitopos presentes sobre a molécula alvo, e que também têm propriedades citotóxicas *in vitro*, como um anticorpo nu, contra células tumorais malignas mas não células normais, e as quais também mediam diretamente, como um anticorpo nu, a inibição de crescimento tumoral. Um avanço adicional é o uso de anticorpos anticancerígenos tais como este para atingir tumores expressando marcadores antigênicos cognatos para obter inibição do crescimento tumoral, e outros desfechos positivos de tratamento do câncer.

Em todos, esta invenção ensina o uso do antígeno AR51A165.2 como um alvo para um agente terapêutico, que quando administrado pode reduzir a carga tumoral de um câncer expressando o antígeno em um mamífero. Esta invenção também ensina o uso de CDMAB (AR51A165.2), e seus derivados, e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, e ligantes indutores de citotoxicidade dos mesmos, para atingir seu antígeno para reduzir a carga tumoral de um câncer expressando o antígeno em um mamífero. Além disso, esta invenção também ensina o uso de detecção do antígeno AR51A165.2 em células cancerosas que podem ser úteis para o diagnóstico, prognóstico da terapia, e prognóstico de mamíferos portando tumores que expressam este antígeno.

Por conseguinte, é um objetivo da invenção utilizar um método para produzir anticorpos modificando doenças cancerosas (CDMAB) cultivados contra células cancerosas derivadas de um indivíduo particular, ou uma ou mais linhagens de células cancerígenas particulares, cujos CDMAB são citotóxicos com respeito a células cancerígenas ao mesmo tempo que simultaneamente sendo relativamente não-tóxicos para células não-cancerosas, de modo a isolar linhagens de células de hibridoma e os anticorpos monoclonais isolados correspondentes e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos para os quais as referidas linhagens de células de hibridoma são codificadas.

É um objetivo adicional da invenção ensinar anticorpos modifi-

cando doenças cancerosas, ligantes e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos.

É um objetivo adicional da presente invenção produzir anticorpos modificando doenças cancerosas cuja citotoxicidade é mediada através de toxicidade celular dependente de anticorpos.

É ainda um objetivo adicional da presente invenção produzir anticorpos modificando doenças cancerosas cuja citotoxicidade é mediada através de toxicidade celular dependente do complemento.

É ainda um objetivo adicional da presente invenção produzir anticorpos modificando doenças cancerosas cuja citotoxicidade é uma função de sua capacidade para catalisar hidrólise de ligações químicas celulares.

Um objetivo ainda adicional da presente invenção é produzir anticorpos modificando doenças cancerosas os quais são úteis para em uma prova de ligação para diagnóstico, prognóstico, e monitoramento do câncer.

Outros objetivos e vantagens desta invenção se tornarão evidentes a partir da seguinte descrição em que são determinados, a título de ilustração e exemplo, algumas modalidades desta invenção.

BREVE DESCRIÇÃO OS DESENHOS

A figura 1 compara a percentagem de citotoxicidade e níveis de ligação do sobrenadantes do hibridoma contgra as linhagens celulares OCC-I, OVCAR-3 e CCD-27sk.

A figura 2 representa ligação de AR51A165.2 a linhagens de células de câncer e normais. Os dados são tabelados para apresentar a intensidade de fluorescência média como um aumento múltiplo acima do controle de isótipos.

A figura 3 inclui histogramas FACS representativos de AR51A165.2 e anticorpos antiEGFR dirigidos contra várias linhagens de células de câncer e não-cancerígenas.

A figura 4 demonstra o efeito de AR51A165.2 sobre o crescimento tumoral em um modelo de câncer pancreático BxPC-3 profilático. As linhas tracejadas verticais indicam o período durante o qual o anticorpo foi administrado. Os pontos de dados representam a média +/- SEM.

A figura 5 demonstra o efeito de AR51A165.2 sobre o peso corporal em um modelo de câncer pancreático BxPC-3 profilático. Os pontos de dados representam a média +/- SEM.

A figura 6 demonstra o efeito de AR51A165.2 sobre o crescimento tumoral em um modelo de câncer de mama MDA-MB-231 profilático. As linhas tracejadas verticais indicam o período durante o qual o anticorpo foi administrado. Os pontos de dados representam a média +/- SEM.

A figura 7 demonstra o efeito de AR51A165.2 sobre o peso corporal em um modelo de câncer de mama MDA-MB-231 profilático. Pontos de dados representam a média +/- SEM.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em geral, as seguinges palavras ou frases têm a definição indicada quando usadas no sumário, na descrição, nos exemplos, e nas reivindicações.

O termo "anticorpo" é usado no sentido mais amplo e cobre especificamente, por exemplo, anticorpos monoclonais únicos (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas, e neutralizantes, anticorpos de-imunizados, murinos, quimerizados ou humanizados), composições de anticorpos com especificidade poliepitópica, anticorpos de cadeia única, imunoconjugados e fragmentos de anticorpos (vide abaixo).

O termo "anticorpo monoclonal" conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto por possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em menores quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste com preparações de anticorpos policlonais as quais incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante sobre o antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos em que podem ser sintetizados não contaminados por outros anticorpos. O modifi-

cador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser considerado como requerendo produção do anticorpo por qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método do hibridoma (murino ou humano) descrito pela primeira vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), ou podem ser produzidos por meio de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos Nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos usando as técnicas descritas em Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) e Marks et al., J. MoL Biol., 222:581-597 (1991), por exemplo.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferencialmente compreendendo a região de ligação de antígeno ou variável do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de anticorpos de extensão menos de total, Fab, Fab', $F(ab')_2$, e Fv; "diacorpos"; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única; anticorpos de cadeia única, moléculas de anticorpos de único domínio, proteínas de fusão, proteínas recombinantes e anticorpos multiespecíficos formados de um ou mais fragmentos de anticorpos.

Um anticorpo "intacto" é um anticorpo o qual compreende uma região variável de ligação de antígeno bem como um domínio constante de cadeia leve (C_L) e os domínios constantes de cadeia pesada, CHI, CH2 e C_H3. Os domínios constantes podem ser de domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequência nativa humana) ou variante de sequências de aminoácidos dos mesmos. Preferencialmente, o anticorpo intacto tem uma ou mais funções efetoras.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, anticorpos intactos podem ser atribuídos a diferentes "classes". Há cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e vários destes podem ser adicionalmente divididos em "subclasses" (isótipos), por exemplo, IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os

domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são denominados α, δ, ε, γ, e μ, respectivamente. As estruturas das subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são de conhecimento geral.

Anticorpo "funções efetoras" refere-sem às atividades biológicas atribuíveis à região de Fc (uma região de Fc de sequência nativa ou região de Fc variante de sequência de aminoácidos) de um anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpos incluem ligação de Clq; citotoxicidade dependente do complemento; ligação de receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; down regulação de receptores da superfície celular (por exemplo, receptor de células B; BCR), e etc.

"Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos" e "ADCC" referem-se a uma reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores de Fc (FcRs) (por exemplo, células assassinas naturais (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado sobre uma célula alvo e subsequentemente causam lise da célula alvo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam FcγRIII somente, ao passo que monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 à página 464 de Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode ser realizada uma prova de ADCC *in vitro*, tal como a descrita na Patente dos Estados Unidos Nº 5.500.362 ou na Patente dos Estados Unidos Nº 5.821.337. Células efetoras úteis para tais provas incluem células mononucleares do sangeu periférico (PBMC) e células assassinas naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal tal como o revelado em Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

"Células efetoras" são leucócitos os quais expressam uma ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferencialmente, as células ex-

pressam no mínimo FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos os quais mediam ADCC incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com células PBMCs e células NK sendo preferenciais. As células efetoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa das mesmas, por exemplo, do sangue ou PBMCs conforme descrito aqui, neste requerimento de Patente.

Os termos "receptor de Fc" ou "FcR" são usados para descrever um receptor que liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferencial é uma FcR humana de sequência nativa. Além disso, um FcR preferencial é um o qual liga um anticorpo de IgG (um gama receptor) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII, e Fcγ RIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas unidas destes receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), os quais têm sequências de aminoácidos similares que diferem essencialmente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação à base de tirosina imunorreceptor (ITAM) em seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição FcγRIIB contém um motivo de inibição à base de tirosina imunorreceptor (ITIM) em seu domínio citoplasmático, (vide a revisão de M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcRs são revisados por Ravetch e Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al, Immunomethods 4:25-34 (1994); e de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" aqui, neste requerimento de Patente. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, o qual é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) e Kim et al., Eur. J. Immunol. 24:2429 (1994)).

"Citotoxicidade dependente do complemento" ou "CDC" refere-se à capacidade de uma molécula para lisar um alvo na presença de complemento. O caminho de ativação do complemento é iniciado por ligação do primeiro componente do sistema do complemento (Clq) a uma molécula (por

exemplo, um anticorpo) formando complexo com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento, pode ser realizada uma prova de CDC, por exemplo, conforme descrito em Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

O termo "variável" refere-se ao fato de que algumas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente em sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente por todos os domínios variáveis de anticorpos. É concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis tanto nos domínios variáveis de cadeia leve quanto nos de cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são denominadas as regiões de framework (FRs). Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve nativas cada compreendem quatro FRs, largamente adotando uma configuração de β-*sheet*, conectada por três regiões hipervariáveis, as quais formam loops conectando, e em alguns casos formando parte, da estrutura de β-*sheet*. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em íntima proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação antigênica de anticorpos (vide Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente em ligar em anticorpo a um antígeno, mas apresentam várias funções efetoras, tais como participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

O termo "região hipervariável" quando usado aqui, neste requerimento de Patente, refere-se aos resíduos aminoácidos de um anticorpo os quais são responsáveis por ligação de antígeno. A região hipervariável geralmente compreende resíduos aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (por exemplo, resíduos 24-34 (LI), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (HI), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, Na-

tional Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou os resíduos de um "loop hipervariável" (por exemplo, resíduos 2632 (LI), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (HI), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Resíduos da "região de Framework" ou "FR" são os resíduos de domínio variável diferentes dos resíduos de regiões hipervariáveis conforme definido aqui, neste requerimento de Patente. A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação de antígeno, e um fragmento "Fc" residual, cujo nime reflete sua capacidade para cristalizar prontametne. O tratamento com pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de ligação de antígeno e ainda é capaz de reticular antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo o qual contém um sítio completo de reconhecimento de antígeno e de ligação de antígeno. Esta região consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em firme associação não-covalente. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem definindo um sítio de ligação de antígeno sobre a superfície do dímero V_H-V_L. Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo somente três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em uma menor afinidade do que o sítio de ligação inteiro. O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH I) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab pela adição de uns poucos resíduos no término carbóxi do domínio CHI de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui, neste requerimento de Patente, para Fab' no qual o um ou mais resíduos cisteína dos domínios constantes portam no mínimo um grupamento tiol livre. Fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ originalmente foram produzidos como pares de

fragmentos Fab' os quais têm articulação de cisteínas entre os mesmos. Outras ligações químicas de fragmentos de anticorpos também são conhecidas.

As "cadeias leves" de anticorpos de quaisquer espécies de vertebrados podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados Kappa (K) e lâmbda (λ), com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

Fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Preferencialmente, o polipeptídeo Fv adicionalmente compreende um encadeador de polipeptídeo entre os domínios VH e V_L o qual permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv vide Pluckthun em The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer- Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio pesado variável (V_H) conectado a um domínio leve variável (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo (V_H-V_L). Usando um encadeador que é curto demais para permitir pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra chain e criar dois sítios de ligação de antígeno. Diabodies são descritos mais completamente, por exemplo, na Patente européia Nº EP 404.097; na Patente internacional Nº WO 93/11161 ; e em Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. ScL USA, 90: 6444-6448 (1993).

Um anticorpo "isolado" é um anticorpo o qual foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais os quais interfeririam com usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Anticorpo isolado inclui o anticorpo in situ dentro de células recombinantes desde que no mínimo um componente do ambiente natural do anticorpo não venha a estar presente. Ordinariamente, no entanto, o anticor-

po isolado será preparado por no mínimo uma etapa de purificação.

Um anticorpo "o qual liga" um antígeno de interesse é um anticorpo capaz de ligar aquele antígeno com suficiente afinidde de tal modo que o anticorpo seja útil como um agente terapêutico ou diagnóstico no direcionamento de uma célula expressando o antígeno. Onde o anticorpo é um anticorpo o qual liga a porção antigênica geralmente e preferencialmente ele ligará aquela porção antigênica ao invés de outros receptores, e não inclui ligação incidental tal como contacto com Fc não-específico, ou ligação a modificações pós-translacionais comuns a outros antígenos e pode ser um anticorpo o qual não tem reação cruzada significativa com outras proteínas. Métodos para a detecção de um anticorpo que liga um antígeno de interesse são de conhecimento geral na técnica e podem incluir mas não estão limitados a testes tais como FACS, ELISA celular e *Western blot*.

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, as expressões "célula", "linhagem celular", e "cultura celular" são usados de modo intercambiável, e todas estas designações incluem progênis. Deve ser entendido que toda a progênie pode não ser precisamente idêntica no conteúdo de DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. Progênies mutantes que tenham a mesma função ou atividade biológica conforme triado para na célula originalmente transformada cell são incluídas. Será evidente a partir do contexto onde se pretende designações distintas.

"Tratamento ou tratar" refere-se tanto a tratamento terapêutico quanto a medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é prevenir ou retardar (reduzir) a condição patológica ou distúrbio alvo. Aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles já com o distúrbio bem como aqueles propensos a terem o distúrbio ou aqueles nos quais o distúrbio deve ser evitado. Deste modo, o mamífero a ser tratado aqui, neste requerimento de Patente, pode ter sido diagnosticado como tendo o distúrbio ou pode ser predisposto ou suscetível ao distúrbio.

Os termos "câncer" e "canceroso" refere-sem a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por morte ou crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas

não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais particulares de similares cânceres incluem câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células escamosas epiteliais), câncer pulmonar incluindo câncer pulmonar de células pequenas, câncer pulmonar de células não-pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou estomacal incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer hepático, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer retal, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, câncer de rim ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer de tiróide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, bem como câncer de cabeça e pescoço.

Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclosfosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquila tais como bussulfan, improssulfan e pipossulfan; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridreto de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterine, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosuréias tais como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tais como aclacinomysins, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carnomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabólitos tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos do áci-

do fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6- mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgênios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostane, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor do ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; ansacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defosfamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxiuréia; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxana; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"- triclorotrietilamina; uretan; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por exemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.) e docetaxel (TAXOTERE®, Aventis, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucil; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunomicina; aminopterin; xeloda; ibandronato; CPT-II; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; esperamicinas; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima. Também são incluídos nesta definição agentes anti-hormonais que agem regulando ou inibindo a ação hormonal sobre tumores tais como anti-estrogênios incluindo por exemplo tamoxifen, raloxifeno, 4(5)-imidazóis inibidores da aromatase, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, queoxifeno, LYI 17018, onapristone, e toremifeno (Fareston); e anti-androgênios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelin; e sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima.

"Mamífero" para fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, camundongos, SCID ou camundongos nude ou cepas de camundongos, animais domésticos e de criação, e animais selvagens, de competição, ou de estimação, tais como carneiro, cães, cavalos, gatos, vacas, e etc. Preferencialmente, o mamífero aqui, neste requerimento de Patente, é humano.

"Oligonucleotídeos" são polidesoxinucleotídeos de extensão curta, de filamento único ou de filamento duplo, que são sintetizados quimicamente por meio de métodos conhecidos (tais como química de fosfotriéster, fosfito, ou fosforamidita, usando técnicas de fase sólida tal como descrito na Patente européia Nº EP 266.032, publicada em 4 de maio de 1988, ou através de desoxinucleosídeo H-fosfonato intermediários conforme descrito por Froehler et al., NucL Acids Res., 14:5399-5407, 1986. São então purificados sobre géis de poliacrilamida.

De acordo com a presente invenção, formas "humanizadas" e/ou "quiméricas" de imunoglobulinas não-humanas (por exemplo, murine) referesem a anticorpos os quais contêm imunoglobulinas quiméricas específicas, cadeias de imunoglobulinas ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab^1, $F(ab')_2$ ou outras subsequências de anticorpos de ligação de antígeno) as quais resultam na redução de uma resposta de anticorpo humano anti-camundongo (HAMA), anticorpo humano anti-quimérico (HACA) ou um anticorpo humano anti-humano (HAHA), comparado à o anticorpo original, e contêm as porções requeridas (por exemplo, CDR(s), uma ou mais regiões de ligação de antígeno, um ou mais domínios variáveis e assim por diante) derivadas da referida imunoglobulina não-humana, necessária para reproduzir o efeito desejado, ao mesmo tempo que conservando simultaneamente características de ligação as quais são comparáveis à referida imunoglobulina não-humana. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo do receptor) nas quais resíduos das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo receptor são substituídas por resíduos das CDRs de uma espécie não-humana (anticorpo do doador) tais como camundongo, rato ou coelho tendo a especificidade, a

afinidade e a capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de framework Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos FR não-humanos correspondentes. Além disso, o anticorpo humanizado pode compreender resíduos os quais não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências CDR ou FR importadas. Estas modificações são feitas para refinar e otimizar adicionalmente a performance do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de no mínimo um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não-humana e todos ou substancialmente todos os resíduos FR são os de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado otimamente também compreenderá no mínimo uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana.

Anticorpos "de-imunizados" são imunoglobulinas que são não-imunogênicas, ou menos imunogênicas, a uma dada espécie. De-imunização pode ser obtida através de alterações estruturais para o anticorpo. Pode ser empregada qualquer técnica de de-imunização de conhecimento daqueles versados na arte. Uma técnica adequada para de-imunizar anticorpos é descrita, por exemplo, na publicação de Patente internacional Nº WO 00/34317 publicada em 15 de junho de 2000.

Um anticorpo o qual induz "apoptose" é um o qual induz morte celular programada por quaisquer meios, ilustrados por mas não limitados a ligação de anexina V, atividade de caspase, fragmentação de DNA, encolhimento celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular, e/ou formação de vesículas de membranas (denominadas estruturas apoptóticas).

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, "citotoxicidade induzida por anticorpos" é entendido como significando o efeito citotóxico derivado do sobrenadante do hibridoma ou anticorpo produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC como número de acesso 180706-02 cujo efeito não é necessariamente relacionado com o grau de ligação.

Do início ao fim da presente especificação, linhagens de células de hibridoma, bem como os anticorpos monoclonais isolados os quais são produzidos a partir das mesmas, são alternativamente referidas por sua designação interna, AR51A165.2 ou Designação do Depositário, IDAC 180706-02.

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, "anticorpo-ligante" inclui uma porção a qual apresenta especificidade de ligação para no mínimo um epitopo do antígeno-alvo, e a qual pode ser uma molécula de anticorpo intacto, fragmentos de anticorpo, e qualquer molécula tendo no mínimo uma região de ligação de antígeno ou porção da mesma (isto é, a porção variável de um anticorpo molécula), por exemplo, uma molécula Fv, molécula Fab, molécula Fab', molécula F(ab').sub.2, um anticorpo biespecífico, uma proteína de fusão, ou qualquer molécula produzida por engenharia genética a qual especificamente reconhece e liga no mínimo um epitopo do antígeno ligado pelo anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem celular do hibridoma designado como IDAC 180706-02 (o antígeno IDAC 180706-02).

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, "anticorpos modificando doença cancerosa" (CDMAB) refere-se a anticorpos monoclonais os quais modificam o processo de doença cancerosa em uma maneira a qual é benéfica para o paciente, por exemplo, reduzindo a carga tumoral ou prolongando a sobrevida de indivíduos portando tumor, e anticorpo-ligantes dos mesmos.

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, "região de ligação antigênica" significa uma porção da molécula a qual reconhece o antígeno-alvo.

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, "inibe competitivamente" significa ser capaz de reconhecer e ligar um sítio determinante ao qual o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem celular do hibridoma designatado como IDAC 180706-02, (o anticorpo IDAC 180706-02) é direcionado usando provas de competição de anticorpos recíprocos convencionais. (Belanger L., Sylvestre C. and Dufour D. (1973), *Enzyme lin-*

ked immunoassay for alpha fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clinica Chimica Acta 48, 15).

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, "antígeno-alvo" é o antígeno IDAC 180706-02 ou porções do mesmo.

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, um "imunoconjugado" significa qualquer molécula ou CDMAB tal como um anticorpo quimicamente ou biologicamente encadeado a uma citotoxina, um agente radioativo, enzima, toxina, um fármaco antitumoral ou um agente terapêutico. O anticorpo ou CDMAB pode ser encadeado à citotoxina, agente radioativo, fármaco antitumoral ou agente terapêutico em qualquer localização ao longo da molécula na medida que seja capaz de ligar seu alvo. Exemplos de imunoconjugados incluem conjugados químicos de anticorpo toxina e proteínas de fusão de anticorpo-toxina.

Conforme usado aqui, neste requerimento de Patente, uma "proteína de fusão" significa qualquer proteína quimérica em que uma região de ligação d eantígeno é conectada a uma molécula biologicamente ativa, por exemplo, toxina, enzima, ou fármaco de proteína.

De modo a que a invenção descrita aqui, neste requerimento de Patente, possa ser mais totalmente entendida, é estabelecida a seguinte descripção.

A presente invenção proporciona CDMABs (isto é, IDAC 180706-02 CDMAB) os quais especificamente reconhecem e ligam o antígeno IDAC 180706-02.

O CDMAB do anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC como número de acesso 180706-02 pode estar em qualquer forma na medida que tenha uma região de ligação de antígeno a qual inibe competitivamente a ligação imunoespecífica do anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma IDAC 180706-02 para seu antígeno-alvo. Deste modo, quaisquer proteínas recombinantes (por exemplo, proteínas de fusão em que o anticorpo é combinado com uma segunda proteína tal como uma linfocina ou um fator de crescimento inibitório tumoral) tendo a mesma especificidade de ligação que o anticorpo IDAC 180706-02

estão dentro do âmbito desta invenção.

Em uma modalidade da invenção, o CDMAB é o anticorpo IDAC 180706-02.

Em outras modalidades, o CDMAB é um fragmento de ligação antigênica o qual pode ser uma molécula Fv (tal como uma molécula Fv de cadeia única), uma molécula Fab, uma molécula Fab', uma molécula F(ab')2, uma proteína de fusão, um anticorpo bi-específico, um heteroanticorpo ou qualquer molécula recombinante tendo a região de ligação de antígeno do anticorpo IDAC 180706-02. O CDMAB da invenção é direcionado para o epitopo ao qual o anticorpo monoclonal IDAC 180706-02 é direcionado.

O CDMAB da invenção pode ser modificado, isto é, por modificações de aminoácidos dentro da molécula, de modo a produzir moléculas derivadas. Também pode ser possível modificação química.

Moléculas derivadas conservariam a propriedade funcional do polipeptídeo, isto é, a molécula tendo similares substituições ainda permitirá a ligação do polipeptídeo ao antígeno IDAC 180706-02 ou porções do mesmo.

Estas substituições de aminoácidos incluem, mas não estão necessariamente limitadas a, substituições de aminoácidos conhecidas na técnica como "conservativas".

Por exemplo, é um princípio esbalelecido de modo geral da química de proteínas que algumas substituições de aminoácidos, intituladas "substituições de aminoácidos conservativas", podem frequentemente ser feitas em uma proteína sem alterar quer a conformação ou a função da proteína.

As alterações referidas incluem substituir qualquer de isoleucina (I), valina (V), e leucina (L) por qualquer outro destes aminoácidos hidrofóbicos; ácido aspártico (D) por ácido glutâmico (E) e vice versa; glutamina (Q) por asparagina (N) e vice versa; e serina (S) por treonina (T) e vice versa. Outras substituições também podem ser consideradas conservativas, dependendo do ambiente do aminoácido em particular e de seu papel na estrutura tridimensional da proteína. Por exemplo, glicina (G) e alanina (A) podem

frequentemente ser intercambiáveis, assim como alanina e valina (V). Metionina (M), a qual é relativamente hidrofóbica, pode frequentemente ser intercambiada com leucina e isoleucina, e algumas vezes com valina. Lisina (K) e arginina (R) são frequentemente intercambiáveis em localizações nas quais a característica significativa do resíduo aminoácido é sua carga e os pK's diferentes destes dois resíduos aminoácidos não são significativos. Ainda outras alterações podem ser consideradas "conservativas" em ambientes particulares.

EXEMPLO 1

Produção de Hibridoma - Linhagem de Células de Hibridoma AR51A165.2

A linhagem de células de hibridoma AR51A165.2 foi depositada, de acordo com o Tratado de Budapeste, junto à Autoridade Depositária Internacional do Canadá (IDAC, *International Depository Authority of Canada*), Bureau of Microbiology, Health Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada, R3E 3R2, em 18 de julho de 2006, sob o Número de Acesso 180706-02. De acordo com 37 CFR 1.808, os depositantes asseguram que todas as restrições impostas sobre a disponibilidade para o público dos materiais depositados serão irrevogavelmente removidas na concessão de uma Patente. O depósito será substituído se o depositário não puder dispensar amostras viáveis.

Para produzir o hibridoma que produz o anticorpo anticancerígeno AR51A165.2, uma única suspensão celular de tecido tumoral de adenocarcinoma endometrióide congelado (Genomics Collaborative, Cambridge, MA) foi preparada em PBS. Adjuvante IMMUNEAS Y™ (Qiagen, Venlo, Netherlands) foi preparado para uso por suave mistura. Camundongos BALB/c de cinco a sete semanas de idade foram imunizados injetando por via subcutânea, 2 milhões de células em 50 microlitros do antígeno-adjuvante. Antígeno-adjuvante recentemente preparado foi usado para reforçar os camundongos imunizados por via intraperitoneal, 2 e 5 semanas depois da imunização inicial, com 2 milhões de células em 50 a 60 microlitros. Um baço foi usado para fusão três dias depois da última imunização. Os hibridomas foram preparados fundindo os esplenócitos isolados com parceiros de mieloma NSO-I.

Os sobrenadantes das fusões foram testados a partir de subclones dos hibridomas.

Para determinar se os anticorpos secretados pelas células de hibridoma são do isótipo IgG ou IgM, foi empregado um ensaio ELISA. 100 microlitros/ cavidade de IgG + IgM de cabra anti- camundongo (H+L) em uma concentração de 2,4 microgramas/ mL em tampão de revestimento (0,1 M de tampão de carbonato/bicarbonato, pH 9,2 a 9,6) a 4°C foi adicionado às lâminas do ELISA de um dia para o outro. As lâminas foram lavadas três vezes em tampão de lavagem (PBS + 0,05 por cento de Tween). 100 microlitros/ cavidade de tampão de bloqueio (5 por cento de leite em tampão de lavagem) foi adicionado à lâmina por 1 hora em temperatura ambiente e em seguida foi lavado três vezes em tampão de lavagem. 100 microlitros/ cavidade de sobrenadante do hibridoma foi adicionado e a lâmina foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e diluição a 1/100.000 de ou IgG ou IgM de cabra anticamundongo conjugado de peroxidase de raiz-forte (diluído em PBS contendo 1 por cento de leite), 100 microlitros/ cavidade, foi adicionada. Depois de incubar a lâmina por 1 hora em temperatura ambiente a lâmina foi lavada três vezes com tampão de lavagem. 100 microlitros/ cavidade de solução TMB foi incubado por 1 a 3 minutos em temperatura ambiente. A reação de cor foi terminada adicionando 50 microlitros/ cavidade de H_2SO_4 a 2 M e a lâmina foi lida a 450 nm com uma leitora de lâminas Perkin-Elmer HTS7000. Conforme indicado na figura 1, o hibridoma AR51A165.2 secretou essencialmente anticorpos do isótipo de IgG.

Para determinar a subclasse de anticorpo secretada pelas células de hibridoma, um experimento de isotipagem foi realizado usando um kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (HyCult Biotechnology, Frontstraat, Países Baixos). 500 microlitros de solução tampão foram adicionados à tira de teste contendo anticorpos específicos da subclasse de rato anticamundongo. 500 microlitros de sobrenadante do hibridoma foram adicionados ao tubo de teste, e submergiram por suave agitação. Imunoglobulinas de camundongo capturadas foram detectadas diretamente por um segundo anti-

corpo monoclonal de rato o qual é ligado a partículas de colóide. A combinação destas duas proteínas cria um sinal visual usado para analisar o isótipo. O anticorpo anticancerígeno AR51A165.2 é do isótipo Kappa de IgGI.

Depois de uma rodada de diluição limitante, sobrenadantes do hibridoma foram testados para anticorpos que ligam a células alvo em um ensaio ELISA celular. Foram testadas duas linhagens de células cancerígenas ovarianas humanas e 1 linhagem de células de pele normal humana: OCC-I, OVCAR-3 e CCD-27sk respectivamente. Todas as linhagens de células foram obtidas da American Type Tissue Collection (ATCC; Manassas, VA). As células laminadas foram fixadas antes de usar. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ em temperatura ambiente. 100 microlitros de 2 por cento de paraformaldeído diluído em PBS foi adicionado a cada cavidade por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida descartados. As lâminas foram novamente lavadas com PBS contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ três vezes em temperatura ambiente. Foi veito bloqueio com 100 microlitros/ cavidade de 5 por cento de leite em tampão de lavagem (PBS + 0,05 por cento de Tween) por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e o sobrenadante do hibridoma foi adicionado a 100 microlitros/ cavidade por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e 100 microlitros/ cavidade de 1/25.000 diluição de anticorpo IgG anticamundongo de cabra conjugado a peroxidase de raiz-forte (diluído em PBS contendo 1 por cento de leite) foi adicionado. Depois de 1 hora de incubação em temperatura ambiente as lâminas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e 100 microlitro/ cavidade de substrato TMB foi incubado por 1 a 3 minutos em temperatura ambiente. A reação foi terminada com 50 microlitros/ cavidade de H_2SO_4 a 2 M e a lâmina foi lida a 450 nm com uma leitora de lâminas Perkin-Elmer HTS7000. Os resultados conforme tabelados na figura 1 foram expressados como o número de vezes acima do pano de fundo comparado à um controle de isótipo de IgG in-house que foi mostrado previamente que liga às linhagens celulares testadas. Os anticorpos do hibridoma AR5 IA 165.2 apresentaram ligação detectável às linha-

gens celulares testadas.

Em combinação com experimentação para ligação de anticorpos, o efeito citotóxico dos sobrenadantes do hibridoma (citotoxicidade induzida por anticorpos) foi testado nas linhagens celulares: OCC- 1, OVCAR-3 e CCD-27sk. Calcein AM foi obtida da Molecular Probes (Eugene, OR) e o teste foi realizado conforme resumido abaixo. As células foram laminadas antes do teste na densidade predeterminada apropriada. Depois de 2 dias, 100 microlitros de sobrenadante das lâminas de microtítulo do hibridoma foram transferidos para as lâminas celulares e incubadas em uma incubadora a 5 por cento de CO_2 por 5 dias. As cavidades que serviram como os controles positivos foram aspiradas até vazias e 100 microlitros de azida de sódio (NaN_3, 0,01 por cento, Sigma, Oakville, ON), ciclo-heximida (CHX, 0,5 micromolar, Sigma, Oakville, ON) ou anticorpo antiEGFR (c225, IgGl, Kappa, 5 microgramas/ mL, Cedarlane, Hornby, ON) dissolvido em meio de cultura, foi adicionado. Depois de 5 dias de tratamento, as lâminas foram em seguida esvaziadas por inversão e "blotted" à seco. DPBS em temperatura ambiente (salina tamponada com fosfato de Dulbecco) contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ foi dispensada dentro de cada cavidade a partir de um frasco de compressão multicanal, batidas 3 vezes, esvaziadas por inversão e em seguida secas com mata-borrão. 50 microlitros do corante de calceína fluorescente diluído em DPBS contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ foi adicionado a cada cavidade e incubado a 37^0C em uma incubadora a 5 por cento de CO_2 por 30 minutos. As lâminas foram lidas em uma leitora de lâminas de fluorescência Perkin-Elmer HTS7000 e os dados foram analisados no Microsoft Excel. Os resultados são tabelados na figura 1. O sobrenadante do hibridoma AR51 A 165.2 produziu citotoxicidade específica de 23 por cento sobre as células OCC- 1. Isto foi 27 e 24 por cento da citotoxicidade obtida com os controles positivos azida de sódio e ciclo-heximida, respectivamente.

Os resultados da figura 1 demonstram que os efeitos citotóxicos de AR51A165.2 não foram proporcionais aos níveis de ligação sobre os tipos de células cancerígenas. Houve ligação detectável sobre as três linhagens celulares testadas e citotoxicidade associada a somente OCC-I. Conforme

tabelado na figura 1, AR51A165.2 não produziu citotoxicidade na linhagem de células de pele humana normal CCD-27sk. Os agentes citotóxicos não-específicos conhecidos ciclo-heximida e NaN_3 produziram de modo geral citotoxicidade conforme esperado. O anticorpo c225 antiEGFR produziu citotoxicidade conforme esperado sobre SWI 116.

EXEMPLO 2

Ligação *In vitro*

Anticorpo monoclonal AR51A165.2 foi produzido cultivando o hibridoma em frascos CL-1000 (BD Biosciences, Oakville, ON) com coleções e ocorrendo ressemeadura duas vezes por semana. Foram seguidos procedimentos de purificação de anticorpos de rotina com Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Está dentro do âmbito desta invenção utilizar anticorpos monoclonais que são de-imunizados, humanizado, quimerizados ou murinos.

A ligação de AR51A165.2 a linhagens celulares de câncer de próstata (PC-3 e DU-145), de cólon (DLD-I, Lovo e SWI 116), pancreático (BxPC-3, PL-45 e AsPC-I), pulmonar (A549), ovariano (OVCAR-3, ES-2, A2780-cp, A2780-S, C-13, Hey, OV2008 e OVCA-429) e mama (MDA-MB-231 e MCF-7), e não-cancerígenas de pele (CCD-27sk) e pulmão (Hs888.Lu) foi avaliada por citometria de fluxo (FACS). Toda as linhagens celulares, exceto pela maioria das linhagens de células cancerígenas ovarianas, foram obtidas da American Type Tissue Collection (ATCC; Manassas, VA). A2780-cp, A2780-S, C-13, OV2008, ES-2, Hey, OVCA-429 foram obtidas do Ottawa Regional Cancer Center (Ottawa, ON).

As células foram preparadas para FACS lavando inicialmente a monocamada celular com DPBS (sem Ca^{++} e Mg^{+*}). Tampão de dissociação celular (Invitrogen, Burlington, ON) foi então usado para expulsar as células de suas lâminas de cultura celular a 37^0C. Depois de centrifugação e coleta, as células foram ressuspendidas em DPBS contendo $MgCl_2$, $CaCl_2$ e 2 por cento de soro fetal bovino a 4°C (meio de coloração) e contadas, divididas em alíquotas para a densidade celular apropriada, centrifugadas para peletizar as células e ressuspendidas em meio de coloração a 4°C na presença

do anticorpo de teste (AR51 A165.2) ou anticorpos controle (isótipo controle, antiEGFR). O isótipo controle e o anticorpo de teste foram avaliados a 20 microgramas/ mL ao passo que o antiEGFR foi avaliado a 5 microgramas/ mL sobre gelo por 30 minutos. Antes da adição de anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 546 as células foram lavadas uma vez com meio de coloração. O anticorpo conjugado a Alexa Fluor 546 em meio de coloração foi em seguida adicionado por 30 minutos a 4°C. As células foram em seguida lavadas pelo tempo final e ressuspendidas em meio de fixação (meio de coloração contendo 1,5 por cento de paraformaldeído). A aquisição citométrica de fluxo das células foi avaliada passando as amostras sobre um FACSarray™ usando o programa FACSarray™ System Software (BD Biosciences, Oakville, ON). A dispersão para diante (FSC) e lateral (SSC) das células foram ajustadas ajustando a voltagem e os ganhos de amplitude nos detectores de FSC e SSC. Os detectores para o canal de fluorescência (Alexa-546) foram ajustados passando células não coradas de tal modo que as células tinham um pico uniforme com uma intensidade fluorescente média de aproximadamente 1 a 5 unidades. Para cada amostra, aproximadamente 10.000 eventos *gated* (células fixas coradas) foram adquiridos para análise e os resultados são apresentados na figura 2.

A figura 2 apresenta o aumento múltiplo da intensidade de fluorescência média acima do isótipo controle. Histogramas representativos de anticorpos AR51 A165.2 foram compilados para a figura 3. AR5 IA 165.2 demonstrou ligação a muitas das linhagens celulares testadas. Houve ligação muito forte à linhagem de células de câncer de cólon DLD-I (168,6 vezes) e ligação forte à linhagem de células de câncer de ovário ES-2 (30,9 vezes), C-13 (18,0 vezes) e OV2008 (22,6 vezes). Não houve qualquer ligação detectável à linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231. Houve ligação moderada ao resto das linhagens celulares. Estes dados demonstram que AR51A165.2 ligou a várias linhagens celulares diferentes com maior expressão antigênoica sobre determinadas linhagens de células de câncer de cólon e de ovário.

EXEMPLO 3

Experimentos Tumorais *In vivo* com Células BxPC-3

Os Exemplos 1 e 2 demonstraram que AR51A165.2 teve propriedades anticancerígenas contra uma linhagem de células cancerígenas humanas com ligação detectável através de várias indicações de câncer diferentes. Com referência às figuras 4 e 5, camundongos SCID fêmeas de 4 a 6 semanas de idade foram implantados com 5 milhões de células de câncer pancreático humano (BxPC-3) em 100 microlitros de salina injetada por via subcutânea na nuca do pescoço. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de tratamento de 5. No dia seguinte à implantação, 20 mg/kg de anticorpo de teste AR51A165.2 ou tampão controle foi administrado por via intraperitoneal a cada coorte em um volume de 300 microlitros depois de diluição da concentração de estoque com um diluente que continha 2,7 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4, 137 mM de NaCl e 20 mM de Na_2HPO_4. As amostras de anticorpo e controle foram em seguida administradas uma vez por semana pela duração do estudo do mesmo modo. O crescimento do tumor foi medido em torno de a cada sétimo dia com calibradores. O estudo foi completado depois de 8 injeções de anticorpo. Os pesos corporais dos animais foram registrados uma vez por semana pela duração do estudo. Ao final do estudo todos os animais foram eutanizados de acordo com as diretrizes do CCAC.

AR51A165.2 reduziu o crescimento do tumor no modelo profilático *in vivo* BxPC-3 de câncer pancreático humano. O tratamento com anticorpo ARIUS AR51 A 165.2 reduziu o crescimento de tumores BxPC-3 por 65 por cento ($p = 0,035$), comparado à o grupo tratado com tampão, conforme determinado no dia 52, 2 dias depois da última dose de anticorpo (figura 1). Ao final do estudo (Dia 61), o tratamento com AR51A165.2 resultou em uma inibição do crescimento tumoral de 66 por cento ($p = 0,0375$; figura 4). Estes resultados *in vivo*, em combinação com os resultados apresentados no Exemplo 2, demonstram que AR51A165.2 é capaz de ligar à linhagem celular BxPC- 3, bem como induzir citotoxicidade em um modelo xenoenxerto de câncer pancreático.

Não houve sinais clínicos de toxicidade do início ao fim do estu-

do. O peso corporal medido em intervalos semanais foi um substituto para o bem-estar e deficiência de crescimento. O peso corporal médio aumentou em todos os grupos durante a duração do estudo (figura 5). O ganho de peso médio entre o dia 1 e o dia 61 foi de 3,6 g no grupo controle e de 3,2 g no grupo tratado com AR51A165.2. Não houve diferenças significativas entre os grupos ao final do período de tratamento.

Em resumo, AR51A165.2 foi bem tolerado e reduziu a carga tumoral neste modelo de xenoenxerto de câncer pancreático humano.

EXEMPLO 4

Experimentos Tumorais *In vivo* com Células MDA-MB-231

Os resultados do Exemplo 3 foram estendidos a um modelo diferente de câncer humano. Com referência às figuras 6 e 7, camundongos SCID fêmeas de 4 a 6 semanas de idade foram implantados com 5 milhões de células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) em 100 microlitros de salina injetada por via subcutânea na nuca do pescoço. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de tratamento de 5. No dia seguinte à implantação, 20 mg/kg de anticorpo de teste AR51A165.2 ou tampão controle foi administrado por via intraperitoneal a cada coorte em um volume de 300 microlitros depois de diluição da concentração do estoque com um diluente que continha 2,I7 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4, 137 mM de NaCl e 20 mM de Na_2HPO_4. As amostras de anticorpo e controle foram em seguida administradas uma vez por semana pela duração do estudo do mesmo modo. O crescimento do tumor foi medido em torno de a cada sétimo dia com calibradores. O estudo foi completado depois de 8 injeções de anticorpo. Os pesos corporais dos animais foram registrados uma vez por semana pela duração do estudo. Ao final do estudo todos os animais foram eutanizados de acordo com as diretrizes do CCAC.

AR51A165.2 reduziu o crescimento do tumor no modelo profilático *in vivo* MDA-MB-231 de câncer de mama humano. Os resultados para o estudo de inibição do crescimento do tumor são mostrados na figura 6. No dia 56, a primeira medição depois do último tratamento no dia 50, AR51A165.2 reduziu o crescimento do tumor por 67 por cento ($p = 0,18$) neste modelo de cân-

cer de mama humano. Este resultado não obteve significância, provavelmente devido ao número limitado de animais em cada grupo neste estudo. A partir do Exemplo 2, é evidente que a ligação de AR51A165.2 à linhagem celular MDA-MB-231 não é detectável usando FACS. Não obstante, o anticorpo foi capaz de reduzir o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto MDA-MB-231. A eficácia pode ser devido a qualquer um de 2 fatores. É possível que a linhagem celular MDA-MB-231 expresse o alvo antigênico em um niível abaixo do limiar de detecção por FACS sob estas condições, mas que o baixo nível de expressão seja suficiente para disparar um evento levando a crescimento tumoral retardado. Também é possível que a expressão do antígeno seja induzida quando as células MDA-MB-231 são colocadas no ambiente *in vivo* mais fisiológico. Em qualquer caso, a eficácia deste anticorpo em um modelo de câncer de cólon MDA-MB-231 é um achado não-óbvio que pode não ter sido previsto com base na ligação.

Não houve sinais clínicos de toxicidade do início ao fim do estudo. O peso corporal medido em intervalos semanais foi um substituto para o bem-estar e deficiência de crescimento. Houve um aumento significativo no peso corporal para ambos os grupos durante o curso do estudo (figura 7). Ao fim do período de tratamento, não houve diferenças significativas nos pesos corporais entre os gurpos controle e tratado com anticorpo.

Em resumo, AR51A165.2 foi bem tolerado e reduziu a carga tumoral neste modelo de xenoenxerto de câncer de mama humano.

EXEMPLO 5

Isolamento de Ligantes Competitivos

Dado um anticorpo, um indivíduo ordinariamente versado na técnica pode gerar um CDMAB inibidor competitivamente, por exemplo, um anticorpo de competição, o qual é um anticorpo que reconhece o mesmo epitopo (Belanger L et al. Clinica Chimica Acta 48:15-18 (1973)). Um método acarreta imunização com um imunogênio que expressa o antígeno reconhecido pelo anticorpo. A amostra pode incluir mas não está limitada a tecidos, uma ou mais proteínas isoladas ou uma ou mais linhagens celulares. Hibridomas resultantes podem ser triados usando uma prova de competição, a

qual é uma prova que identifica anticorpos que inibem a ligação do anticorpo de teste, tal como ELISA, FACS ou *Western blotting*. Outro método pode fazer uso de bibliotecas de anticorpos de display de fago e varredura para anticorpos que reconhecem no mínimo um epitopo do referido antígeno (Rubinstein JL et al. Anal Biochem 314: 294-300 (2003)). Em qualquer caso, anticorpos são selecionados com base em sua capacidade para deslocar a ligação do anticorpo etiquetado original para no mínimo um epitopo de seu antígeno-alvo. Os anticorpos referidos portanto possuiriam a característica de reconhecedr no mínimo um epitopo do antígeno como o anticorpo original.

EXEMPLO 6

Clonagem das Regiões Variáveis do Anticorpo Monoclonal AR51A165.2

Podem ser determinadas as sequências das regiões variáveis das cadeias pesadas (V.H) e leve (V.L) de anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de células de hibridoma AR51A165.2. RNA codificando as cadeias pesada e leve de imunoglobulina pode ser extraído do hibridoma em questão usando métodos de rotina envolvendo solubilização celular com isotiocianato de guanidínio (Chirgwin et al Biochem. 18:5294-5299 (1979)). O mRNA pode ser usado para preparar cDNA para subsequente isolamento dos genes V.H e V.L por metodologia de PCR conhecida na técnica (Sambrook et al., eds., Molecular Cloning, Chapter 14, Cold Spring Harbor laboratories Press, N. Y. (1989)). A sequência de aminoácido de N-terminal das cadeias pesada e leve pode ser determinada de modo independente por sequenciamento de Edman automatizado. Trechos adicionais das CDRs e FRs flanqueantes também podem ser determinados por sequenciamento de aminoácidos dos fragmentos V.H e V.L. Primers sintéticos podem ser então designados para isolamento dos genes V.H e V.L de anticorpo monoclonal AR51A165.2, e o gene isolado pode ser ligado em um vetor apropriado para sequenciamento. Para produzir IgG quimérica e humanizada, os domínios variáveis leves e domínios variáveis pesados podem ser subclonados em um vetor apropriado para expressão.

(i) Anticorpo Monoclonal

DNA codificando o anticorpo monoclonal (conforme reivindicado no Exemplo 1) é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesada e leve dos anticorpos monoclonais). A célula de hibridoma serve como uma fonte preferencial de similar DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, os quais são então transfectados em células hospedeiras tais como células de E. coli, células COS de símio, células de ovário de hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem de modo diverso proteína imunoglobulin, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência codificante por domínios constantes de cadeias pesada e leve humanas ao invés das sequências murinas homólogas. Anticorpos quiméricos ou híbridos também podem ser preparados *in vitro* usando métodos conhecidos em química de proteína sintética, incluindo aqueles envolvendo agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando uma reação de permuta de dissulfeto ou formando uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

(ii) Anticorpo Humanizado

Um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos aminoácidos introduzidos neste de uma fonte não-humana. Estes resíduos aminoácidos não-humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação", os quais são tipicamente selecionados entre um domínio variável de "importação". Humanização pode ser realizada pelo método de Winter e colaboradores substituindo sequências CDR ou CDRs de roedor pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano (Jones et al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al, Science 239:1534-1536 (1988); revisado em Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000)).

Um anticorpo humanizado pode ser preparado por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados concei-

tuais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulinas tridimensionais estão disponíveis comumente e são familiares para os versados na técnica. Estão disponíveis programas de computação os quais ilustram e apresentam estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. Inspeção destes displays permite análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para ligar seu antígeno. Deste modo, resíduos FR podem ser selecionados e combinados entre a sequência de consenso e de importação de modo que é obtida a característica do anticorpo desejada, tal como aumentada afinidade para o um ou mais antígenos alvo. Em geral, os resíduos CDR são diretamente e o mais substancialmente envolvidos em influenciar a ligação de antígeno.

(iii) Fragmentos de Anticorpos

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Estes fragmentos podem ser produzidos por células hospedeiras recombinantes (revisado em Hudson, Curr. Opin. Immunol 11:548-557 (1999); Little et al, Immunol. Today 21:364- 370 (2000)). Por exemplo, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados a partir de E. coli e ligados quimicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Biotechnology 10:163-167 (1992)). Em outra modalidade, o $F(ab')_2$ é formado usando o zíper de leucina GCN4 para promover montagem da molécula $F(ab')_2$. De acordo com outra abordagem, fragmentos Fv, Fab ou $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes.

EXEMPLO 7

Uma Composição Compreendendo o Anticorpo da Presente Invenção

O anticorpo da presente invenção pode ser usado como uma composição para prevenir/tratar câncer. A composição para prevenir/tratar câncer, a qual compreende o anticorpo da presente invenção, é não tóxica e pode ser administrada como estão sob a forma de preparações líquidas, ou

como composições farmacêuticas de preparações adequadas a humanos ou mamíferos (por exemplo, ratos, coelhos, carneiro, suíno, bovino, felino, canino, símio, e etc.) por via oral ou por via parenteral (por exemplo, por via intravascular, por via intraperitoneal, por via subcutânea, e etc.). O anticorpo da presente invenção pode ser administrado sozinho, ou pode ser administrado como uma composição apropriada. A composição usada para a administração pode conter um veículo farmacologicamente aceitável com o anticorpo da presente invenção ou seu sal, um diluente ou excipiente. Uma composição similar é proporcionada sob a forma de preparações farmacêuticas adequadas para administração oral ou parenteral.

Exemplos da composição para administração parenteral são preparações injetáveis, supositórios, e etc. As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagens tais como injeções intravenosas, subcutâneas, intracutâneas e intramusculares, infusões para gotejamento, injeções intra-articulares, e etc. Estas preparações injetáveis podem ser preparadas por meio de métodos conhecidos publicamente. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas dissolvendo, suspendendo ou emulsificando o anticorpo da presente invenção ou seu sal em um meio aquoso estéril ou um meio oleoso usado convencionalmente para injeções. Como o meio aquoso para injeções, há, por exemplo, salina fisiológica, uma solução isotônica contendo glucose e outros agentes auxiliares, e etc., as quais podem ser usadas em combinação com um agente solubilizante apropriado tal como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, propileno glicol, polietileno glicol), um tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO- 50 (aduto de polioxietileno (50 mols) de óleo de rícino hidrogenado)], e etc. Como o meio oleoso, são empregados, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de soja, e etc., os quais podem ser usados em combinação com um agente solubilizante tal como benzoato de benzila, álcool benzílico, e etc. A injeção preparada deste modo é geralmente preenchida em uma ampola apropriada. O supositório usado para administração retal pode ser preparado combinando o anticorpo da presente invenção ou seu sal com bases convencionais para supositórios. A composição para administração

oral inclui preparações sólidas ou líquidas, especificamente, comprimidos (incluindo drágeas e comprimidos revestidos com película), pílulas, grânulos, preparações em pó, cápsulas (incluindo cápsulas mols), xarope, emulsões, suspensões, e etc. Uma composição similar é fabricado por meio de métodos publicamente conhecidos e pode conter um veículo, um diluente ou excipiente convencionalmente usado no campo de preparações farmacêuticas. Exemplos do veículo ou excipiente para comprimidos são lactose, amido, sacarose, estearato de magnésio, e etc.

Vantajosamente, as composições para uso oral ou parenteral descritas acima são preparadas em preparações farmacêuticas com uma unidade de dose conveniente para se adequar a uma dose dos ingredientes ativos. As preparações de unidade de dose referidas incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios, e etc. A quantidade do composto supracitado contido é geralmente de 5 a 500 mg por forma de unidade de dosagem; é preferencial que o anticorpo descrito acima seja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg especialmente sob a forma de injeção, e em 10 a 250 mg para as outras formas.

A dose do agente profilático/terapêutico ou regulador supracitado compreendendo o anticorpo da presente invenção pode variar dependendo do sujeito a ser administrado, da doença alvo, condições, via de administração, e etc. Por exemplo, quando usada para os fins de tratar/prevenir, por exemplo, câncer de mama em um adulto, é vantajoso administrar o anticorpo da presente invenção por via intravenosa em uma dose de cerca de 0,01 a cerca de 20 mg/kg de peso corporal, preferencialmente cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg de peso corporal e mais preferencialmente cerca de 0,1 a cerca de 5 mg/kg de peso corporal, cerca de 1 a 5 vezes/ dia, preferencialmente cerca de 1 a 3 vezes/ dia. Em outra administração parenteral e oral, o agente pode ser administrado em uma dose correspondente à dose administrada acima. Quando a condição é especialmente grave, a dose pode ser aumentada de acordo com a condição.

O anticorpo da presente invenção pode ser administrado no estado em que se encontra ou sob a forma de uma composição apropriada. A

composição usada para a administração pode conter um veículo farmacologicamente aceitável com o anticorpo supracitado ou seus sais, um diluente ou excipiente. Uma composição similar é proporcionada sob a forma de preparações farmacêuticas adequadas para administração oral ou parenteral (por exemplo, injeção intravascular, injeção subcutânea, e etc.). Cada composição descrita acima pode conter adicionalmente outros ingredientes ativos. Além disso, o anticorpo da presente invenção pode ser usado em combinação com outros fármacos, por exemplo, agentes alquilantes (por exemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, e etc.), antagonistas metabólicos (por exemplo, metotrexato, 5-fluorouracila, e etc.), antibióticos antitumorais (por exemplo, mitomicina, adriamicina, e etc.), agentes antitumorais derivados de plantas (por exemplo, vincristina, vindesina, Taxol, e etc.), cisplatina, carboplatina, etoposídeo, irinotecan, e etc. O anticorpo da presente invenção e os fármacos descritos acima podem ser administrados ao paciente simultaneamente ou em momentos alternados.

A preponderância de evidência mostra que AR51A165.2 media efeitos anticancerígenos através de ligação de um epitopo presente sobre linhagens de células cancerígenas. Adicionalmente pode ser mostrado que o anticorpo AR5IA165.2 pode ser usado na detecção de células as quais expressam o epitopo o qual especificamente liga às mesmas; utilizando técnicas ilustradas por, mas não limitadas a FACS, ELISA celular ou IHC.

Todas as patentes e publicações mencionadas nesta especificação são indicativas dos níveis daqueles versados na técnica, à qual diz respeito a invenção. Todas as patentes e publicações são aqui, a este requerimento de Patente, incorporadas por meio de referência na mesma extensão como se cada publicação individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por meio de referência.

Deve ser entendido que apesar de ser ilustrada uma forma determinada da invenção, não deve ser limitada à forma específica ou disposição de partes descrita e mostrada aqui, neste requerimento de Patente. Será evidente para os versados na técnica que podem ser feitas várias alterações sem se afastar do âmbito da invenção e a invenção não deve ser considera-

da limitada ao que é mostrado e descrito na especificação.

Uma pessoa versada na técnica reconhecerá prontamente que a presente invenção é bem adaptada para realizar os objetivos e obter as finalidades e vantagens mencionadas, bem como as inerentes na mesma. Quaisquer oligonucleotídeos, peptídeos, polipeptídeos, compostos biologicamente relacionados, métodos, procedimentos e técnicas descritos aqui, neste requerimento de Patente, são presentemente típicos das modalidades preferenciais, são pretendidos para serem exemplares e não são pretendidos como limitações do âmbito. Alterações nas mesmas e outros usos ocorrerão aos versados na técnica os quais são englobados dentro do espírito da invenção e são definidos pelo âmbito das reivindicações anexadas. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades preferenciais específicas, deve ser entendido que a invenção conforme reivindicado não deve ser indevidamente limitada a similares modalidades específicas. Na verdade, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção as quais são óbvias para os versados na técnica são pretendidas para estarem dentro do âmbito das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de que é produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02.

2. Anticorpo humanizado contendo o anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de que é produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou um fragmento de ligação de antígeno produzido a partir do referido anticorpo humanizado.

3. Anticorpo quimérico do anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de que é produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02. ou um fragmento de ligação de antígeno produzido a partir do referido anticorpo quimérico.

4. Linhagem de células de hibridoma isolada. caracterizada pelo fato de que é depositada junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02.

5. Método para iniciar citotoxicidade induzida por anticorpos de células cancerosas em uma amostra de tecido selecionada entre um tumor humano, caracterizado pelo fato de que compreende:

proporcionar uma amostra de tecido do referido tumor humano;

proporcionar o anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, o anticorpo humanizado do anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, o anticorpo quimérico do anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02 ou um CDMAB do mesmo, cujo CDMAB é definido por uma capacidade de inibir competitivamente ligação do referido anticorpo monoclonal isolado a seu antígeno-alvo; e

contactar o referido anticorpo monoclonal isolado, o referido anticorpo humanizado, o referido anticorpo quimérico ou CDMAB do mesmo com a referida amostra de tecido;

em que ligação do referido anticorpo monoclonal isolado, o refe-

rido anticorpo humanizado, o referido anticorpo quimérico ou CDMAB do mesmo com a referida amostra de tecido induz citotoxicidade.

6. CDMAB do anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de que é como definido na reivindicação 1.

7. CDMAB do anticorpo humanizado, caracterizado pelo fato de que é como definido na reivindicação 2.

8. CDMAB do anticorpo quimérico, caracterizado pelo fato de que é como definido na reivindicação 3.

9. Anticorpo isolado ou CDMAB do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que é conjugado com um membro selecionado entre o grupo consistindo em porções citotóxicas, enzimas, compostos radioativos, e células hematógenas.

10. Uso de um anticorpo monoclonal ou do CDMAB do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma compopsição para tratar um tumor humano suscetível a citotoxicidade induzida por anticorpos em um mamífero, em que o referido tumor humano expressa no mínimo um epitopo de um antígeno, o qual especificamente liga ao anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou um CDMAB do mesmo, cujo CDMAB é definido por uma capacidade de inibir competitivamente ligação do referido anticorpo monoclonal isolado a seu antígeno-alvo, resultando em uma redução da carga tumoral do referido mamífero.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é conjugado a uma porção citotóxica.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a referida porção citotóxica é um isótopo radioativo.

13. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo ativa o complemento.

14. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo

fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo media citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

15. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é humanizado.

16. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é quimerizado.

17. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de que é capaz de ligação específica ao mesmo epitopo ou epitopos que o anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02.

18. Uso de um anticorpo monoclonal ou do CDMAB do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição para tratar um tumor humano em um mamífero, em que o referido tumor humano expressa no mínimo um epitopo de um antígeno o qual especificamente liga ao anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou um CDMAB do mesmo, cujo CDMAB é definido por uma capacidade de inibir competitivamente ligação do referido anticorpo monoclonal isolado a seu antígeno-alvo, resultando em uma redução da carga tumoral do referido mamífero.

19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é conjugado a uma porção citotóxica.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a referida porção citotóxica é um isótopo radioativo.

21. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo ativa o complemento.

22. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo media citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

23. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é humanizado.

24. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é quimerizado.

25. Uso de um anticorpo monoclonal ou CDMAB do mesmo em combinação com no mínimo um agente quimioterápico, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição para tratar um tumor humano em um mamífero, em que o referido tumor humano expressa no mínimo um epitopo de um antígeno o qual especificamente liga ao anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou um CDMAB do mesmo, cujo CDMAB é definido por uma capacidade de inibir competitivamente ligação do referido anticorpo monoclonal isolado a seu antígeno-alvo, resultando em uma redução da carga tumoral do referido mamífero.

26. Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é conjugado a uma porção citotóxica.

27. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a referida porção citotóxica é um isótopo radioativo.

28. Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo ativa o complemento.

29. Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo media citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

30. Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é humanizado.

31. Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é quimerizado.

32. Ensaio de ligação para determinar a presença de células cancerosas em uma amostra de tecido selecionada entre um tumor humano, a qual é especificamente ligada pelo anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de células de hibridoma AR51A165.2 tendo Nº de Acesso I-DAC 180706-02, o anticorpo humanizado do anticorpo monoclonal isolado

produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou o anticorpo quimérico do anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, caracterizado pelo fato de que compreende:

proporcionar uma amostra de tecido do referido tumor humano;

proporcionar no mínimo um do referido anticorpo monoclonal isolado, o referido anticorpo humanizado, o referido anticorpo quimérico ou CDMAB do mesmo que reconhece o mesmo epitopo ou epitopos como aqueles reconhecidos pelo anticorpo monoclonal isolado produzido por uma linhagem de células de hibridoma AR51A165.2 tendo Nº de Acesso IDAC 180706-02;

contactar no mínimo um dos anticorpos proporcionados referidos ou CDMAB do mesmo com a referida amostra de tecido; e

determinar ligação do referido no mínimo um anticorpo proporcionado ou CDMAB do mesmo com a referida amostra de tecido;

pela qual é indicada a presença das referidas células cancerosas na referida amostra de tecido.

33. Uso de anticorpos monoclonais ou de CDMAB dos mesmos, caracterizado pelo fato de que é para a redução da carga tumoral humana, em que o referido tumor humano expressa no mínimo um epitopo de um antígeno o qual especificamente liga ao anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou um CDMAB do mesmo, cujo CDMAB é definido por uma capacidade de inibir competitivamente ligação do referido anticorpo monoclonal isolado a seu antígeno-alvo, resultando em uma redução da carga tumoral humana do referido mamífero.

34. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é conjugado a uma porção citotóxica.

35. Uso de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a referida porção citotóxica é um isótopo radioativo.

36. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo

fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo ativa o complemento.

37. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo media citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

38. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é humanizado.

39. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é quimerizado.

40. Uso de anticorpos monoclonais ou de CDMAB dos mesmos em combinação com no mínimo um agente quimioterápico, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição para a redução da carga tumoral humana, em que o referido tumor humano expressa no mínimo um epitopo de um antígeno o qual especificamente liga ao anticorpo monoclonal isolado produzido pelo hibridoma depositado junto ao IDAC com o número de acesso 180706-02, ou um CDMAB do mesmo, cujo CDMAB é definido por uma capacidade de inibir competitivamente ligação do referido anticorpo monoclonal isolado a seu antígeno-alvo, resultando em uma redução da carga tumoral humana do referido mamífero.

41. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é conjugado a uma porção citotóxica.

42. Uso de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que a referida porção citotóxica é um isótopo radioativo.

43. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo ativa o complemento.

44. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado ou CDMAB do mesmo media citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

45. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é humanizado.

46. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal isolado é quimerizado.

47. Composição eficaz para tratar um tumor canceroso humano, caracterizada pelo fato de que compreende, em combinação:

um anticorpo ou CDMAB de qualquer uma das reivindicações 1,2,3,6,7,8, ou 17;

um conjugado do referido anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo com um membro selecionado entre o grupo consistindo em porções citotóxicas, enzimas, compostos radioativos, e células hematógenas; e

uma quantidade requerida de um veículo farmaceuticamente aceitável;

em que a referida composição é eficaz para tratar o referido tumor canceroso humano.

FIG. 1

		ELISA Secretor		Citotoxicidade						Ligação de IgG		
		Dobra		OCC-1		OVCAR-3		CCD-27sk		OCC-1	OVCAR-3	CCD-27sk
		IgG	IgM	Média	CV	Média	CV	Média	CV	Dobra	Dobra	Dobra
	AR51A165.2	3.9	0.3	23	11	5	8	-1	0	2.0	1.8	2.3
Controles	NaN_3			86	24			-12	5			
	Cicloeximida			95	26	45	13	46	10			
	c225					62	10					

FIG. 2

	Cólon			Pancreas			Mama		Próstata		Pulmão
	LOVO	SW1116	DLD-1	BxPC-3	AsPC-1	PL-45	MDA-MB-231	MCF-7	PC-3	DU-145	A549
Dobra de ligação de 51A165.2	4.4	3.4	168.6	7.8	4.4	2.8	1.0	6.5	10.7	3.3	4.8

	Ovariano								Pele Normal	Pulmão Normal
	A2780-cp	A2780-s	C-13	ES-2	Hey	OV2008	OVCA-429	OVCAR-3	CCD-27sk	Hs888.Lu
Dobra de ligação de 51A165.2	9.1	8.2	18.0	30.9	3.5	22.6	4.5	4.0	2.4	10.7

FIG. 3

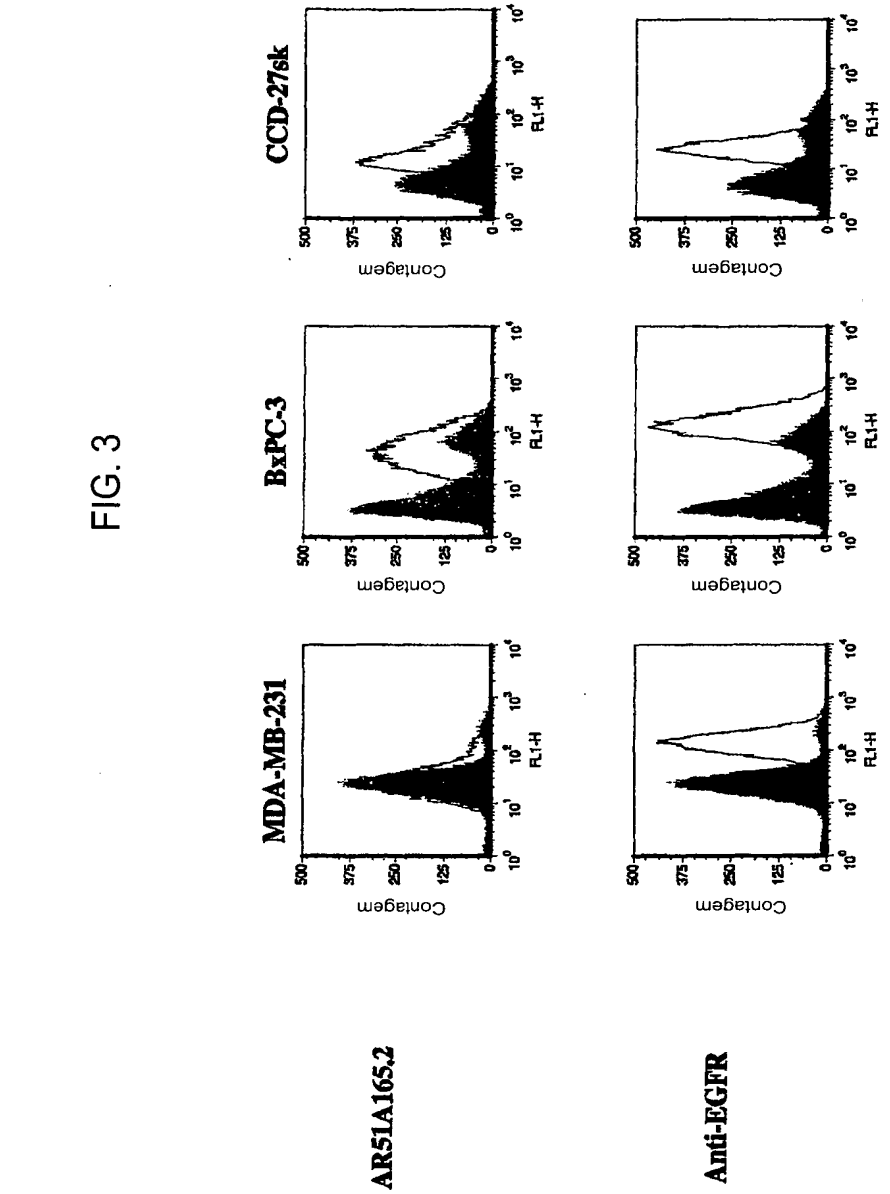


FIG. 4

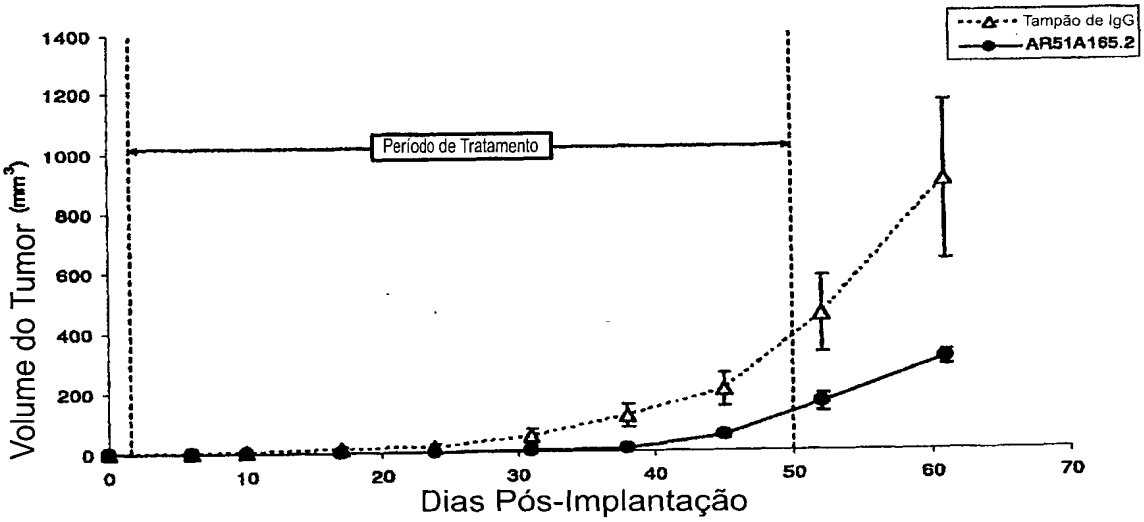

Tampão de IgG
AR51A165.2
Período de Tratamento
Volume do Tumor (mm³)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Dias Pós-Implantação

FIG. 5

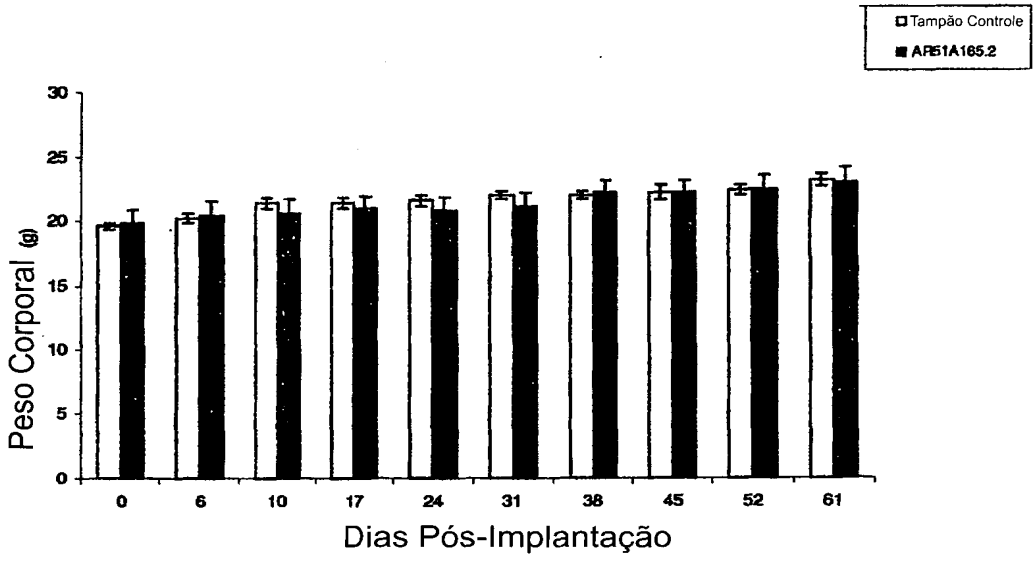

Tampão Controle
AR51A165.2
Peso Corporal (g)
30
25
20
15
10
5
0
0
6
10
17
24
31
38
45
52
61
Dias Pós-Implantação

FIG. 6

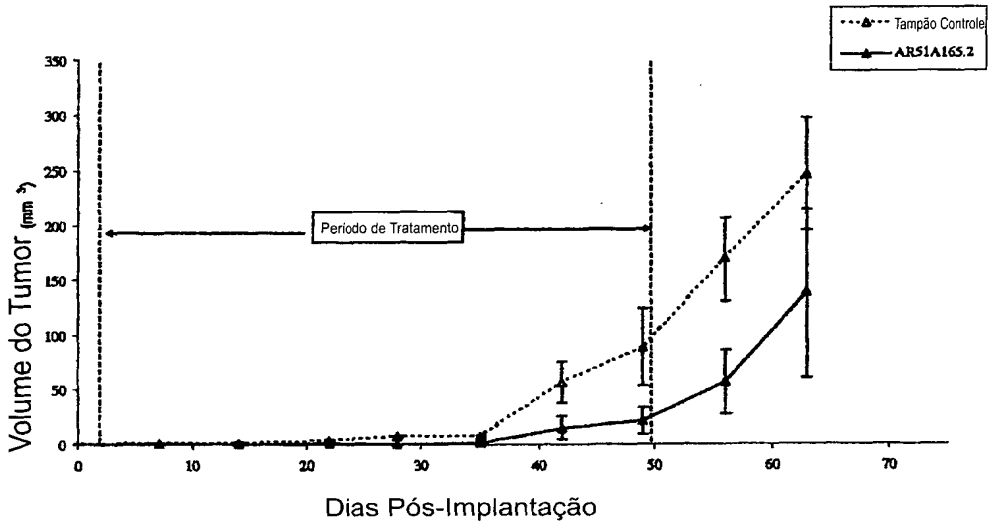
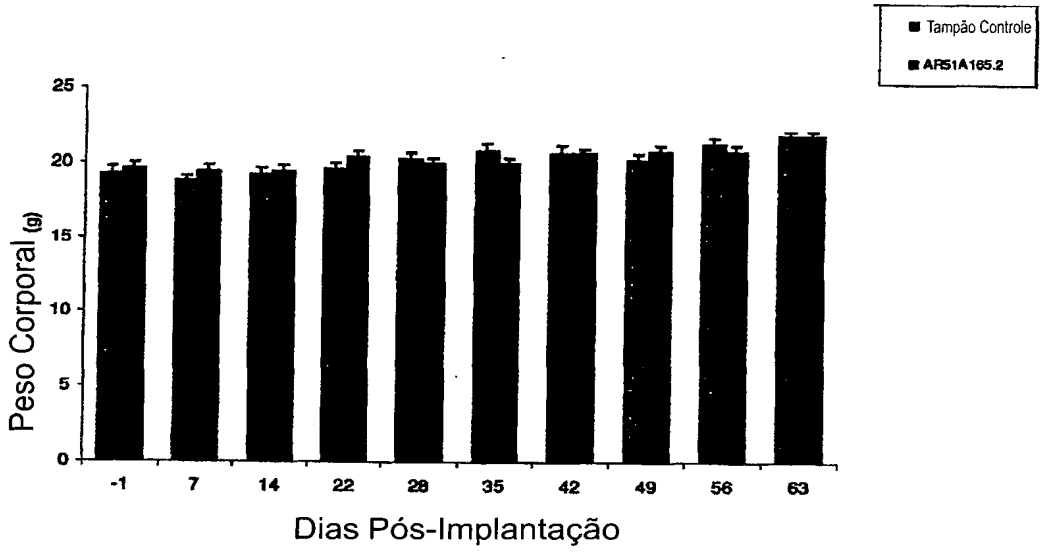

Tampão Controle
AR51A165.2
Período de Tratamento
Volume do Tumor (mm³)
Dias Pós-Implantação
0
50
100
150
200
250
300
350
0
10
20
30
40
50
60
70

FIG. 7


Tampão Controle
ARS1A165.2
Peso Corporal (g)
25
20
15
10
5
0
-1
7
14
22
28
35
42
49
56
63
Dias Pós-Implantação

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, ANTICORPOS HUMANIZADO E QUIMÉRICO DO ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, LINHA DE CÉLULA HIBRIDOMA ISOLADA, MÉTODO PARA INICIAR A CITOTOXIDEZ INDUZIDA POR ANTICORPO DE CÉLULAS CANCEROSAS EM UMA AMOSTRA DE TECIDO SELECIONADA DE UM TUMOR HUMANO, CDMAB DO ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, CDMAB DO ANTICORPO HUMANIZADO E QUIMÉRICO, ANTICORPO ISOLADO OU SEU CDMAB E USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL OU SEU CDMAB, SOZINHO OU EM CONJUNÇÃO COM PELO MENOS UM AGENTE QUIMIOTERAPÊUTICO, E COMPOSIÇÃO"**.

A presente invenção refere-se a um método para produzir anticorpos modificando doenças cancerosas usando um novo paradigma de triagem. Segregando os anticorpos anticancerígenos usando citotoxicidade de células cancerígenas como um ponto de desfecho, o processo torna possível a produção de anticorpos anticancerígenos para fins terapêuticos e diagnósticos. Os anticorpos podem ser usados no auxílio do estagiamento e diagnóstico de um câncer, e podem ser usados para tratar tumores primários e metástases tumorais. Os anticorpos anticancerígenos podem ser conjugados a toxinas, enzimas, compostos radioativos, e células hematógenas.