



INPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0210405-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0210405-9

(22) Data do Depósito: 13/06/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 19/12/2002

(51) Classificação Internacional: C07K 16/00; G01N 33/563; C12N 15/00; A61K 39/395; C12P 21/00.

(30) Prioridade Unionista: US 60/298,172 de 13/06/2001.

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MÉTODO IN VITRO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE UMA CÉLULA EXPRESSANDO EGFR, PARA INDUZIR A CITÓLISE DE UMA CÉLULA EXPRESSANDO EGFR, E PARA DETECTAR A PRESENÇA DE ANTÍGENO EGFR OU UMA CÉLULA EXPRESSANDO EGFR EM UMA AMOSTRA, E, VETOR DE EXPRESSÃO

(73) Titular: GENMAB A/S, Companhia Dinamarquesa. Endereço: Toldbodgade 33, DK-1253 Copenhagen K, DINAMARCA(DK)

(72) Inventor: JAN VAN DE WINKEL; MARCUS A. VAN DIJK; ARNOUT F. GERRITSEN; EDWARD HALK.

Código de Controle: 23EAC77DE008ABD0 BE22B58A0D871142

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 27/11/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 27/11/2018

Assinado digitalmente por:
Alexandre Gomes Ciano
Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MÉTODO IN VITRO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE UMA CÉLULA EXPRESSANDO EGFR, PARA INDUZIR A CITÓLISE DE UMA CÉLULA EXPRESSANDO EGFR, E PARA
5 DETECTAR A PRESENÇA DE ANTÍGENO EGFR OU UMA CÉLULA EXPRESSANDO EGFR EM UMA AMOSTRA, E, VETOR DE EXPRESSÃO”

Pedidos Relacionados

Este pedido reivindica prioridade para o pedido US provisório
10 60/298.172, depositado em 13 de junho de 2001, que é incorporado aqui em sua totalidade por esta referência.

Fundamentos da Invenção

O receptor EGF (EGFR) é uma molécula de transmembrana do tipo 1, de 170 kDa. Verifica-se que sua expressão é regulada em muitos
15 tumores humanos incluindo carcinoma de cabeça e pescoço, mama, cólon, próstata, pulmão e ovários. O grau de super-expressão está correlacionado a um fraco prognóstico clínico (Baselga *et al.* (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154; Modjtahedi *et al.*, (1994) *Int. J. Oncology* 4: 277-296). Além disso, sua expressão é freqüentemente acompanhada pela produção de ligandos
20 EGFR, TGF- α e EGF, dentre outros, por células de tumor expressando EGFR, que sugere que um laço de autócrina participa na progressão destas células (Baselga *et al.* (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154; Modjtahedi *et al.* (1994) *Int. J. Oncology*. 4: 277-296). O bloqueio da interação entre os ligandos EGFR e EGFR pode, assim, inibir a sobrevivência e o crescimento
25 de tumores (Baselga *et al.* (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127- 154).

Anticorpos monoclonais (MAbs) dirigidos para o domínio de

ligação de ligandos EGFR podem bloquear a interação com EGF e TGF- α e, concomitantemente, a via de sinalização intracelular resultante. Vários anticorpos monoclonais de murino são gerados, os quais obtêm um bloco *in vitro* e que são avaliados por sua capacidade de afetar o crescimento de tumor em modelos de xenoenxerto de camundongos (Masui, *et al.* (1986) Cancer Res. 46: 5592- 5598; Masui, *et al.* (1984) Cancer Res. 44: 1002- 1007; Goldstein *et al.* (1995) Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318). Quando administrada um dia após as células de tumor humano, a maior parte dos MAbs anti-EGFR foi eficaz na prevenção da formação de tumor em camundongos atímicos (Baselga *et al.* (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127- 154). No entanto, quando injetados em camundongos transportando xenoenxertos de tumor humano estabelecidos, estes MAbs de murino (por exemplo, MAbs 225S e 528) causaram somente regressão de tumor parcial. A co-administração de agentes quimioterapêuticos foi necessária para erradicar completamente os tumores (Baselga *et al.* (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127- 154; Fan *et al.* (1993) Cancer Res. 53: 4322- 4328; Baselga *et al.* (1993) J. Natl. Cancer Inst. 85: 1327- 1333).

Assim, apesar dos resultados obtidos até agora estabelecerem claramente EGFR como um alvo para imunoterapia, eles também mostram que os anticorpos de murino não constituem agentes terapêuticos ideais. Além disso, tratamento com anticorpos de murinos geralmente ocasionam reações imunes graves em pacientes. Para frustrar a imunogenicidade de anticorpos de camundongos, a terapêutica deve ser idealmente complemento humana. Como uma etapa para este objetivo, uma versão quimérica de MAb 225 (C225), em que as regiões variáveis dos anticorpos de camundongos são ligadas a regiões constantes humanas, foi desenvolvida. Apesar de C225 demonstrar uma atividade anti-tumor melhorada no tratamento de tumores de xenoenxertos estabelecidos *in vivo*, isto somente foi obtido em altas doses (Goldstein *et al.* (1995) Clin. Cancer Res. 1: 1311- 1318). Atualmente, C225 está sendo

avaliado em experiências clínicas para tratamento de vários tipos de tumores sólidos (Baselga, J. (2000) J. Clin. Oncol. 18: 54S-59S; Baselga, J. (2000) Ann. Oncol. 11 suplem. 3: 187-190, 2000).

Assim, existe a necessidade de anticorpos terapêuticos melhorados contra EGFR, que sejam eficazes no tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas com a super-expressão de EGFR quando administrados em baixas dosagens, e que não elicitam reações imunes nos pacientes. Como descrito acima, anticorpos monoclonais (MAb) desempenham um papel proeminente em muitas abordagens de diagnóstico e terapêuticas em doenças e tornam-se agentes ainda mais atrativos com o recente advento de tecnologias que permitem o desenvolvimento de anticorpos completamente humanos. Anticorpos e derivados de anticorpos constituem vinte e cinco por cento das drogas biológicas atualmente em desenvolvimento e muitas destas estão sendo desenvolvidas como terapêutica de câncer. Os anticorpos combinam especificidade de marcação com a capacidade de comprometer eficazmente o sistema imune. A combinação destas propriedades e sua longa meia-vida biológica alertaram os pesquisadores para o potencial terapêutico dos anticorpos. Isto culminou recentemente na aprovação pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) de vários anticorpos para tratamento de câncer.

Sumário da Invenção

A presente invenção provê terapêutica de anticorpos melhorada para o tratamento e a prevenção de doenças relacionadas com a expressão de EGFR, particularmente tumores expressando EGFR e doenças autoimunes. Os anticorpos são melhorados porque são completamente humanos (referidos aqui como “HuMAbs[®]”) e, assim, são menos imunogênicos nos pacientes. Os anticorpos também são terapeuticamente eficazes (por exemplo, na prevenção do crescimento e/ou função de células expressando EGFR) em dosagens mais baixas do que previamente descritas

para outros anticorpos anti-EGFR. Além disso, em certas formas de realização, os anticorpos têm o benefício adicional de não ativar o cumprimento (por exemplo, não induzir lise mediada por complemento de células de marcação) o que reduz os efeitos colaterais adversos durante o tratamento.

Conseqüentemente, em uma forma de realização, a presente invenção provê anticorpos monoclonais humanos isolados que ligam-se especificamente ao receptor do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR), bem como a composições contendo a ou uma combinação destes anticorpos. Os anticorpos humanos inibem (por exemplo, bloqueiam) a ligação de ligandos EGFR, como EGF e TGF- α , a EGFR. Por exemplo, a ligação de ligando EGFR a EGFR pode ser inibida em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% e, preferivelmente, resulta na prevenção da sinalização de células mediadas por EGFR.

Os anticorpos humanos preferidos da invenção inibem o crescimento e/ou mediam a morte (por exemplo, lise ou fagocitose) de células expressando EGFR (*in vitro* ou *in vivo*) na presença de células efetadoras humanas (por exemplo, células polimorfonucleares, monócitos, macrófagos ou células dendríticas), eles ainda não ativam lise, mediada pelo complemento, de células que expressam EGFR. Assim, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser usados como agentes de diagnóstico ou terapêuticos *in vivo* e *in vitro*.

Em uma forma de realização exemplificada aqui, os anticorpos humanos da invenção são anticorpos de IgG1 (por exemplo, IgG1k) tendo uma cadeia pesada de IgG1 e uma cadeia leve de kappa. No entanto, outros isotipos de anticorpos também são englobados pela invenção, incluindo IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. Os anticorpos podem ser anticorpos totais ou fragmentos de ligação a antígenos de anticorpos,

incluindo fragmentos $F(ab')_2$, Fv e fragmentos Fv de cadeia.

Em uma forma de realização particular, o anticorpo humano é codificado por ácidos nucleicos de cadeia leve de kappa humana e cadeia pesada de IgG humana compreendendo seqüências de nucleotídeos em suas regiões variáveis, como descrito em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 3, respectivamente, e modificações de seqüências conservativas das mesmas. Em outra forma de realização, o anticorpo humano inclui regiões variáveis de cadeia leve de kappa e cadeia pesada de IgG que compreendem as seqüências de aminoácidos em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente, e modificações de seqüências conservativas das mesmas.

Em outra forma de realização particular, o anticorpo humano corresponde ao anticorpo 2F8 ou um anticorpo que liga ao mesmo epítopo como (por exemplo, compete com) ou tem as mesmas características de ligação funcional como anticorpo 2F8.

Os anticorpos humanos da invenção podem ser produzidos recombinantemente em uma célula hospedeira, como um transfectoma (por exemplo, um transfectoma consistindo de células CHO imortalizadas ou células linfocíticas) contendo ácidos nucleicos codificando as cadeias pesada e leve do anticorpo, ou ser obtidos diretamente de um hibridoma que expressa o anticorpo (por exemplo, que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano que codificam o anticorpo, fundidos em uma célula imortalizada). Em uma forma de realização particular, os anticorpos são produzidos por um hibridoma referido aqui como 2F8 ou por um transfectoma da célula hospedeira (por exemplo, uma célula CHO) contendo ácidos nucleicos de cadeia leve humana e de cadeia pesada humana que compreendem seqüências de nucleotídeos em suas regiões variáveis como descrito em SEQ ID Nos: 1 e 3, respectivamente, e modificações

138

conservativas das mesmas.

Em outra forma de realização, os anticorpos anti- EGFR humanos da presente invenção podem ser caracterizados por uma ou mais das seguintes propriedades:

- 5 a) especificidade para o EGFR;
- b) uma afinidade de ligação a EGFR com uma constante de associação de equilíbrio (K_A) de pelo menos cerca de 10^7 M^{-1} , preferivelmente cerca de 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , e, mais preferivelmente, cerca de 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} , ou maior;
- 10 c) uma constante de dissociação (K_D) de EGFR de cerca de 10^3 s^{-1} , preferivelmente cerca de 10^4 s^{-1} , mais preferivelmente, 10^5 s^{-1} , e, mais preferivelmente, 10^6 s^{-1} ;
- d) a capacidade de opsonizar uma célula expressando EGFR; ou
- 15 e) a capacidade de inibir o crescimento e/ou mediar fagocitose e morte de células expressando EGFR (por exemplo, uma célula de tumor) na presença de células efetadoras humanas em uma concentração de cerca de $10 \mu\text{g/ml}$ ou menos (por exemplo, *in vitro*).

Exemplos de células de tumor expressando EGFR que podem ser marcadas (por exemplo opsonizadas) por anticorpos humanos da presente invenção incluem, mas não são limitadas a células de bexiga, mama, cólon, rim, ovário, próstata, célula renal, célula escamosa, pulmão (não célula pequena), ou células de tumor de cabeça e pescoço. Outras células expressando EGFR incluem células de fibroblastos sinoviais e queratinócitos

20 que podem ser usadas, por exemplo, como células de marcação no tratamento de artrite e psoríase, respectivamente.

Em outra forma de realização, anticorpos humanos da invenção se ligam a antígeno EGFR com uma constante de afinidade de pelo menos cerca de 10^8 M^{-1} , mais preferivelmente pelo menos cerca de 10^9 M^{-1} ou

138

10^{10} M^{-1} , e são capazes de inibir o crescimento e/ou mediar a fagocitose e exterminar as células expressando EGFR por células efetadoras humanas, por exemplo, células polimorfonucleares (PMNs), monócitos e macrófagos, com um IC_{50} de cerca de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ou menos, ou a uma concentração de cerca de $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ou menos *in vitro*.

Em ainda outra forma de realização, os anticorpos humanos da invenção inibem a sinalização de células mediada por EGFR. Por exemplo, os anticorpos podem inibir autofosforilação de EGFR induzida por ligando de EGFR (por exemplo, EGF ou $\text{TGF-}\alpha$). Os anticorpos também podem inibir ativação de células induzida por $\text{TGF-}\alpha$ ou EGF de autócrina ou induzindo lise (ADCC) células expressando EGFR na presença de células polimorfonucleares humanas. Células que expressam EGFR incluem, dentre outros, uma célula da bexiga, uma célula de mama, uma célula do cólon, uma célula do rim, uma célula da próstata, uma célula renal, uma célula escamosa, uma célula de pulmão não pequena, uma célula de fibroblasto sinovial e um queratinócito.

Em outro aspecto, a presente invenção provê moléculas de ácido nucleico codificando os anticorpos, ou porções de ligação a antígeno, da invenção. Vetores de expressão recombinante que incluem ácidos nucleicos codificando anticorpos da invenção, e células hospedeiras com estes vetores, também são englobados pela invenção, como são métodos para preparar os anticorpos da invenção cultivando as células hospedeiras, por exemplo, um vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando as regiões variáveis e constantes e cadeias pesadas e leves do anticorpo 2F8 produzidas pelo hibridoma.

Em ainda outro aspecto, a invenção provê células B isoladas de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico que expressa anticorpos anti-EGFR humanos da invenção. Preferivelmente as células B isoladas são obtidas de um animal não humano

transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, que foi imunizado com uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno EGFR e/ou células expressando o EGFR. Preferivelmente, o animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tem um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano codificando todo ou uma porção de um anticorpo da invenção. As células B isoladas são então imortalizadas para prover uma fonte (por exemplo, um hibridoma) dos anticorpos anti-EGFR humano.

Conseqüentemente, a presente invenção também provê um hibridoma capaz de produzir anticorpos monoclonais humanos da invenção que ligam-se especificamente a EGFR. Em uma forma de realização, o hibridoma inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano codificando todo ou uma porção de um anticorpo da invenção, fundido a uma célula imortalizada. Hibridomas particulares da invenção incluem 2F8.

Em ainda outro aspecto, a invenção provê um animal não humano transgênico, como um camundongo transgênico (também referido aqui como um “HuMAb”), que expressa anticorpos monoclonais humanos que ligam-se especificamente a EGFR. Em uma forma de realização particular, o animal não transgênico humano é um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano codificando todo ou uma porção de um anticorpo da invenção. O animal não humano transgênico pode ser imunizado com uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno EGFR e/ou células expressando EGFR. Preferivelmente, o animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, é capaz de produzir múltiplos isotipos de anticorpos monoclonais humanos em EGFR (por

exemplo, IgG, IgA e/ou IgM) passando por recombinação de V-D-J e mudança de isotipos. A mudança de isotipos pode ocorrer, por exemplo, por mudança de isotipos clássica ou não clássica.

5 Em outro aspecto, a presente invenção provê métodos para produzir anticorpos monoclonais humanos que reagem especificamente com EGFR. Em uma forma de realização, o método inclui imunizar um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano codificando todo ou uma porção de um
10 anticorpo da invenção, com uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno EGFR e/ou células expressando EGFR. Células B (por exemplo, células B esplênicas) do animal são então obtidas e fundidas com células de mieloma para formar células de hibridoma imortais que secretam anticorpos monoclonais humanos contra EGFR.

15 Ainda em outro aspecto, os anticorpos anti-EGFR humanos da invenção são derivatizados, ligados a ou co-expressados com outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, um fragmento Fab'). Por exemplo, uma porção de ligação a antígeno ou anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligada (por exemplo, por copulação
20 química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, como outro anticorpo (por exemplo, para produzir um anticorpo biespecífico ou multi-específico), uma citoxina, um ligando celular ou um antígeno. Assim, a presente invenção engloba uma grande variedade de conjugados de anticorpos, moléculas bi- e multi-
25 específicas, e proteínas de fusão, todos os quais ligam-se a células expressando EGFR e que marcam outras moléculas nas células, ou que ligam-se a EGFR e a outras moléculas ou células.

Em uma forma de realização particular, a invenção inclui uma molécula biespecífica ou multi-específica compreendendo pelo menos uma

primeira especificidade de ligação para EGFR (por exemplo, um anticorpo anti-EGFR humano ou fragmento ou imitação do mesmo), e uma segunda especificidade de ligação para um receptor Fc, por exemplo, um receptor Fc γ RI humano ou um receptor Fc α humano, ou outro antígeno ou uma célula apresentando antígeno (APC). Tipicamente, as moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção compreendem pelo menos um anticorpo, ou fragmento do mesmo (por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ou um Fv de cadeia única), preferivelmente um anticorpo humano ou uma porção do mesmo, ou um anticorpo "quimérico" ou "humanizado" ou uma porção do mesmo (por exemplo, tem uma região variável, ou pelo menos uma região determinante complementar (CDR), derivada de um anticorpo não humano (por exemplo, murino) com a (s) porção (ões) restante (s) sendo humana na origem).

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas e multi-específicas que se ligam a tanto EGFR humano como a um receptor Fc, por exemplo, um receptor de IgG humano, por exemplo, um receptor Fc-gama (Fc γ R), como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Outros receptores Fc, como receptores de IgA humanos (por exemplo, Fc α RI), também podem ser marcados. O receptor Fc está preferivelmente localizado na superfície de uma célula efetuidora, por exemplo, um monócito, macrófago ou uma célula polimorfonuclear ativada. Em uma forma de realização preferida, as moléculas biespecíficas e multi-específicas ligam-se a um receptor Fc em um sítio que é distinto do sítio de ligação de Fc a imunoglobulina (por exemplo, IgG ou IgA) do receptor. Assim, a ligação das moléculas biespecíficas e multi-específicas não está bloqueada por níveis fisiológicos de imunoglobulinas.

Em outro aspecto, a presente invenção provê um conjugado compreendendo um anticorpo anti-EGFR humano da invenção ligado a uma porção terapêutica, por exemplo, uma droga citotóxica, uma toxina

enzimaticamente ativa, ou um fragmento das mesmas, um radioisótopo, ou uma droga anti-câncer de molécula pequena.

Alternativamente, os anticorpos humanos da invenção podem ser co-administrados com estes agentes terapêuticos e citotóxicos, mas não ligados aos mesmos. Eles podem ser co-administrados simultaneamente com estes agentes (por exemplo, em uma composição única ou separadamente) ou podem ser administrados antes ou após a administração dos agentes. Estes agentes podem incluir agentes quimioterapêuticos como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina cisplatina, carmustina, clorambucila e hidroxiuréia de ciclofosfamida. Os anticorpos humanos da invenção também podem ser administrados em conjunto com terapia de radiação.

Em outro aspecto, a presente invenção provê composições, por exemplo, kits/composições farmacêuticas e diagnósticas, compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e pelo menos um anticorpo monoclonal humano da invenção, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que liga especificamente a EGFR. Em uma forma de realização, a composição compreende uma combinação dos anticorpos humanos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, preferivelmente cada um dos quais liga a um epítopo distinto. Por exemplo, uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal humano que media a morte altamente eficaz de células de marcação na presença de células efetuatoras pode ser combinada com outro anticorpo monoclonal humano que inibe o crescimento de células expressando EGFR. Assim, a combinação provê terapias múltiplas feitas sob encomenda para prover o benefício terapêutico máximo. Composições, por exemplo, composições farmacêuticas, compreendendo uma combinação de pelo menos um anticorpo monoclonal humano da invenção, ou porções de ligação a antígeno do mesmo, e pelo menos uma molécula biespecífica ou multi-específica da invenção, também estão dentro do escopo da invenção.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para

M3
K

inibir a proliferação e/ou crescimento de uma célula expressando EGFR, e/ou induzir a morte de uma célula expressando EGFR, usando anticorpos humanos da invenção e composições relacionadas como descrito acima. Em uma forma de realização, o método compreende contatar uma célula

5 expressando EGFR tanto *in vitro* como *in vivo* com a ou uma combinação dos anticorpos monoclonais humanos da invenção na presença de uma célula efetuada humana. O método pode ser empregado em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo* (por exemplo, culturas compreendendo células expressando EGFR e células efetuidoras). Por exemplo, uma amostra contendo células

10 expressando EGFR e células efetuidoras pode ser cultivada *in vitro*, e combinada com um anticorpo da invenção, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo (ou uma molécula biespecífica ou multi-específica da invenção). Alternativamente, o método pode ser realizado em um indivíduo, por exemplo, como parte de um protocolo *in vivo* (por exemplo, terapêutico

15 ou profilático).

Para uso no tratamento e prevenção *in vivo* de doenças relacionadas à expressão de EGFR (por exemplo, super-expressão), os anticorpos da invenção são administrados a pacientes (por exemplo, indivíduos humanos) em dosagens terapeuticamente eficazes (por exemplo,

20 dosagens que resultam na inibição do crescimento, fagocitose e/ou a morte de células de tumor expressando EGFR) usando qualquer via apropriada de administração, como injeção e outras vias de administração conhecidas na técnica para produtos clínicos baseados em anticorpos.

Doenças típicas relacionadas com EGFR, que podem ser

25 tratadas e/ou evitadas usando os anticorpos humanos da invenção, incluem, mas não são limitadas às doenças autoimunes e cânceres. Por exemplo, cânceres que podem ser tratados e/ou prevenidos incluem câncer de bexiga, mama, cólon, rim, ovário, próstata, célula renal, célula escamosa, pulmão (célula não pequena), cabeça e pescoço. Doenças autoimunes que podem ser

tratadas incluem, por exemplo, psoríase e artrite inflamatória, por exemplo, artrite reumatóide, artrite relacionada a lupus eritematoso sistêmico e artrite psoriática.

Em uma forma de realização, o paciente é adicionalmente tratado com um agente quimioterapêutico, radiação ou um agente que modula, por exemplo, melhora ou inibe, a expressão ou atividade de um receptor Fc, por exemplo, um receptor Fc α ou um receptor Fc γ , como citocina. Citocinas típicas para administração durante tratamento incluem fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos- macrófagos (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose de tumor (TNF). Agentes terapêuticos típicos incluem, dentre outros, agentes anti-neoplásicos, como doxorrubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina cisplatina, carmustina, clorambucila e hidroxiuréia de ciclofosfamida.

Para aumentar a eficácia terapêutica dos anticorpos anti-EGFR humanos da invenção contra células de câncer que não expressam altamente EGFR, os anticorpos podem ser co-administrados com um agente que regula ascendentemente ou de modo efetua expressão de EGFR, como uma preparação de linfocina que causa expressão regulada ascendentemente e mais homogênea de EGFR ou células de tumor. Preparações de linfocina apropriadas para administração incluem interferon- γ , fator de necrose de tumor e combinações dos mesmos. Estes podem ser administrados intravenosamente. Dosagens apropriadas de linfocina estão tipicamente na faixa de 10.000 a 1.000.000 unidades/ paciente.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção provê um método para detectar *in vitro* ou *in vivo* a presença do antígeno EGFR em uma amostra, por exemplo, diagnosticando uma doença relacionada a EGFR. Em uma forma de realização, isto é obtido contatando uma amostra a ser testada, opcionalmente junto com uma amostra de controle, com um anticorpo monoclonal humano da invenção (ou um porção de ligação a antígeno do

mesmo) em condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e EGFR. A formação do complexo é então detectada (por exemplo, usando um ELISA). Quando se usa uma amostra de controle junto com a amostra de teste, o complexo é detectado em ambas as amostras e qualquer

5 diferença estatisticamente significativa na formação de complexos entre as amostras é indicativa da presença do antígeno EGFR na amostra de teste.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção são evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

Breve Descrição dos Desenhos

10 Figura 1 é um gráfico mostrando ELISA competitivo com sobrenadantes de hibridoma de camundongo 20241 versus MAbs 225, 528 e AB5 anti-EGFR monoclonais de murino.

Figura 2 é um gráfico mostrando ELISA competitivo com sobrenadantes de anticorpos humanos de camundongos 20242 e 20243 versus

15 MAbs 225, 528 e AB5 anti-EGFR monoclonais de murino.

Figura 3 é um gráfico mostrando ELISA competitivo com anticorpos humanos purificados versus MAbs 225 e 528 anti-EGFR monoclonais de murino.

Figuras 4A, 4B, 4C e 4D são gráficos mostrando ELISA competitivo com HuMAbs (A) 6B3, (B) 5F12, (C) 2F8 e (D) 2A2.

20

Figuras 5A e 5B são gráficos mostrando inibição da ligação de EGF-biotina a EGFR por HuMAbs anti-EGFR e MAbs de murino (formato ELISA).

Figura 6 é um gráfico mostrando inibição da ligação EGF-biotina a EGFR em células A431 por HuMAbs anti-EGFR e MAbs de murino.

25

Figura 7 é um gráfico mostrando titulação de HuMAbs anti-EGFR em células A431.

Figura 8 é um gráfico mostrando a capacidade de 2F8 de inibir

a ligação da ligação de EGF a EGFR purificado e nativo. O efeito de 2F8 (diamantes), murino 225 (quadrados), EGF (triângulos) ou controle de isotipo kappa IgG1 humano (balas) é medido na ligação de EGF-biotina a EGFR imobilizado. Como descrito na figura 8, 2F8 é capaz de inibir ligação EGF-biotina com um IC50 de 17 nM, significativamente mais baixo do que 225 (IC50 de 30 nM).

Figura 9 é um gráfico de barras mostrando a capacidade de 2F8 para inibir a ligação de EGF e TGF- α a células A431. Células A431 são derivadas de um carcinoma epidermóide de ovário e expressam em excesso de 1×10^6 moléculas de EGFR em sua superfície celular. A inibição da ligação de 2F8 a células A431 foi determinada usando análise de citometria de fluxo. As células foram pré-incubadas com ligandos tanto de 5 (barras abertas) como de 50 $\mu\text{g/ml}$ (barras fechadas) antes de adicionar 2F8. A ligação de anticorpo sem ligando (grupo PBS) foi designada como sendo de 100%. Como mostrado, ligação de EGF e TGF- α a células A431 é eficientemente bloqueada por 2F8. Estes resultados indicam que 2F8 liga próximo a, ou no mesmo sítio, em EGFR como os ligandos.

Figuras 10A e 10B mostram o efeito de anti-EGFR monoclonal na autofosforilação de células A431. Células A431 subconfluentes sem soro foram tratadas com anticorpos diferentes (10 $\mu\text{g/ml}$), como indicado nos métodos, estimuladas tanto com EGF (A) como TGF- α (B), e extraídas. A fosforilação de EGFR foi analisada por SDS-PAGE e imunoblotting com anticorpos antifosfotirosina.

Figuras 11A, 11B e 11C são gráficos mostrando inibição de crescimento de linhagens de células de tumor expressando EGFR por anticorpos humanos anti-EGFR. As linhagens de células de tumor A431 (A), HN5 (B) e MDA-MB-468 (C) expressando EGFR foram incubadas com várias concentrações de HuMAb 2F8 (quadrados), 5C5 (triângulos), 6E9 (cruzes), 2A2 (diamantes), controle negativo de anticorpos anti-CTLA4

(círculos abertos), controle positivo de anticorpo 225 (círculos fechados) ou com meio somente (controle) durante sete (7) dias). Depois disso, o crescimento das células foi avaliado usando coloração violeta cristal de células fixadas. O percentual de inibição de crescimento foi calculado como a quantidade de proteína deixada após incubação durante sete (7) dias comparada à quantidade de proteína presente apenas no meio de controle. Os dados representam medições em triplicata e são representativos de três experiências realizadas em dias diferentes.

Figura 12 é um gráfico mostrando citotoxicidade dependente de anticorpo mediada por PMN humano. PMN foram isolados como descrito. Células A431 rotuladas com ^{51}Cr foram depositadas em placas de fundo plano de 96 reservatórios. PMN foram adicionados na relação efetuator:marcação de 100:1 e os anticorpos foram adicionados em diferentes concentrações. Após incubação durante a noite, a liberação de ^{51}Cr foi medida.

Figura 13 é um gráfico mostrando a prevenção da formação de tumor por HuMAb 2F8 em um modelo de murino atímico. Grupos de seis (6) camundongos foram injetados subcutaneamente no flanco com 3×10^6 células de tumor em 200 μl de PBS no dia zero (0). Subseqüentemente, os camundongos foram injetados i.p. nos dias 1 (75 μg / 200 μl), 3 (25 μg / 200 μl) e 5 (25 μg / 200 μl) (setas) tanto com HuMAb 2F8 (quadrados fechados) i.p. de MAb de IgG1- κ como um controle (círculos abertos). Os dados são apresentados como volume de tumor médio + SEM, e são representativos de 3 experiências individuais, dando resultados similares.

Figura 14 é um gráfico mostrando a erradicação de xenoenxertos de tumor A431 estabelecidos por HuMAb 2F8 em comparação a MAb anti-EGFR de murino (m225). Os camundongos foram injetados subcutaneamente no flanco com 3×10^6 células de tumor em 200 μl de PBS no dia zero (0). No dia 10, os camundongos foram alocados aleatoriamente

MS
A

em grupos de tratamento e tratados nos dias 12 (75 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{l}$), 14 (25 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{l}$) e 16 (25 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{l}$) (setas) com HuMAb 2F8 (quadrados fechados, a curto prazo 2F8) ou com MAb 225 anti-EGFR de murino (triângulos fechados, a curto prazo m225). Além disso, os grupos foram incluídos recebendo 75 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{l}$ de HuMAb 2F8 ou m225 no dia 12, continuaram por 25 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{l}$ de HuMAb 2F8 ou m225 nos dias 14, 16, 19, 22, 26, 29, 33, 36 e 40 (quadrados abertos, a longo prazo 2F8; triângulos abertos, a longo prazo m225). Os dados são apresentados como volume de tumor médio + SEM, e são representativos de 3 experiências individuais, dando resultados similares.

Setas pretas indicam os dias de tratamento para tratamento a curto prazo, setas abertas indicam os dias de tratamento para o tratamento a longo prazo.

Figuras 15A e 15B mostram as seqüências das regiões V_H - e V_L - de 2F8 com regiões CDR designadas.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção provê novas terapias baseadas em anticorpos para o tratamento e o diagnóstico de doenças caracterizadas pela expressão, particularmente super-expressão, do antígeno do receptor do fator de crescimento epidérmico (referido aqui como “EGFR”). As terapias da invenção empregam anticorpos monoclonais de IgG humanos isolados, ou porções da ligação a antígeno dos mesmos, que ligam-se a um epítipo presente em EGFR. Outros anticorpos monoclonais humanos isolados englobados pela presente invenção incluem anticorpos de IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD. Em uma forma de realização, os anticorpos humanos são produzidos em um animal transgênico não humano, por exemplo, um camundongo transgênico, capaz de produzir isotipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos em EGFR (por exemplo, IgG, IgA e/ou IgE) passando por recombinação de V-D-J e mudança de isotipo. Conseqüentemente, os aspectos da invenção incluem não somente anticorpos, fragmentos de anticorpos e composições farmacêuticas dos mesmos, mas também animais

transgênicos não humanos, células B, transfectomas de células hospedeiras e hibridomas que produzem anticorpos monoclonais. Métodos de uso dos anticorpos da invenção para detectar uma célula expressando EGFR ou um receptor do fator de crescimento de reação cruzada relacionado, ou para inibir o crescimento, diferenciação e/ou mobilidade de uma célula expressando EGFR, tanto *in vitro* como *in vivo*, também são englobados pela invenção.

A fim de que a presente invenção possa ser entendida mais prontamente, alguns termos serão primeiro definidos. As definições adicionais são especificadas em toda a descrição detalhada.

Os termos “receptor de fator de crescimento epidérmico” “EGFR” e “antígeno EGFR” são usados de modo interpermutável e incluem variantes, isoformas e homólogos de espécies de EGFR humano. Em uma forma de realização preferida, a ligação de um anticorpo da invenção para o antígeno-EGFR inibe o crescimento de células expressando EGFR (por exemplo, uma célula de tumor) por inibição ou bloqueio da ligação do ligando de EGFR a EGFR. O termo “ligando de EGFR” engloba todos os ligandos (por exemplo fisiológicos) para EGFR, incluindo EGFR, TGF- α , EGF ligando a heparina (HB-EGF), anfiregulina (AR) e epiregulina (EPI). Em outra forma de realização preferida, a ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno – EGFR media a fagocitose de célula efetuada e/ou morte de células expressando EGFR.

Como usado aqui, o termo “inibe o crescimento” (por exemplo com referência a células) se destina a incluir qualquer diminuição mensurável no crescimento de uma célula quando contatada com um anticorpo anti-EGFR como comparado com o crescimento da mesma célula não em contato com um anticorpo anti-EGFR, por exemplo, a inibição do crescimento de uma célula por, pelo menos, cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

Como usado aqui, os termos “inibe a ligação” e “bloqueia a

ligação”(por exemplo com referência a inibição /bloqueio de ligação de ligando EGFR a EGFR) são usados de modo interpermutável e englobam tanto a inibição/bloqueio parcial como completo. A inibição /bloqueio de ligando de EGFR a EGFR preferivelmente reduz ou altera o nível normal ou tipo de célula assinalando que ocorre quando o ligando de EGFR liga a EGFR sem inibição ou bloqueio. A inibição e bloqueio são também destinados a incluir qualquer diminuição mensurável na afinidade de ligação de ligando de EGFR a EGFR quando em contato com um anticorpo anti-EGFR como comparado com o ligando não em contato com um anticorpo anti-EGFR, por exemplo o bloqueio de ligandos EGFR para EGFR em, pelo menos, cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

O termo “anticorpo” referido aqui inclui os anticorpos completos e qualquer fragmento de ligação a antígeno (isto é “por exemplo de ligação a antígeno) ou cadeia única do mesmo. Um “anticorpo” refere-se a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é composta de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é composta de um domínio CL). As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões de determinação de complementaridade (CDR) interdispersas com regiões que são mais conservadas, chamadas regiões de armação (FR). Cada VH e VL é composto de três CDRs e quatro FRs, dispostos de amino-término para carboxi-término na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis de cadeias pesadas e leves contém um domínio de ligação que interage com o antígeno.



As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina para tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo células efetadoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

5 O termo “porção de ligação a antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente “porção de anticorpo” como usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de especificamente ligar a um antígeno (por exemplo EGFR). Foi demonstrado que a função de ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um

10 anticorpo de comprimento completo. Os exemplos de fragmentos de ligação englobados pelo termo “porção de ligação a antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo de domínios VL, VH, CL e CH1, (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte

15 dissulfeto na região de gancho; (iii) um fragmento Fd consistindo de domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo; (v) um fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) Nature, 341: 544-546) que consiste de um domínio VH; e (vi) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR). Além disso, apesar dos

20 dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, são codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que permite que os mesmos sejam feitos como uma cadeia de proteína única em que as regiões VL e VH estão em pares para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia única Fv (scFv), ver, por

25 exemplo, Bird *et al.*, (1988), Science, 242: 423- 426, e Huston *et al.*, (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883). Estes anticorpos de cadeia única são também destinados a serem englobados no termo “porção de ligação a antígeno” de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas na técnica, e os fragmentos são triados

para utilidade do mesmo modo que são os anticorpos intactos.

O termo “epítopo” significa um determinante de proteína capaz de ligação específica a um anticorpo. Os epítopos geralmente consistem de grupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente tem características estruturais tridimensionais, assim como características de carga específica. Os epítopos conformacionais e não conformacionais são distintos em que a ligação ao primeiro mas não ao último é perdida na presença de solventes desnaturantes.

O termo “molécula biespecífica” se destina a incluir qualquer agente, por exemplo, uma proteína, peptídeo, ou complexo de proteína ou peptídeo, que tem duas diferentes especificidades de ligação. Por exemplo, a molécula pode ligar a ou interagir com (a) um antígeno de superfície de célula e (b) um receptor de Fc sobre a superfície de uma célula efetuidora. O termo “molécula multi-específica” ou “molécula hetero-específica” se destina a incluir qualquer agente, por exemplo uma proteína, peptídeo, ou complexo de proteína ou peptídeo, que tem mais do que duas diferentes especificidades de ligação. Por exemplo, a molécula pode ligar a, ou interagir com (a) um antígeno de superfície de célula, (b) um receptor de Fc sobre a superfície de uma célula efetuidora, e (c) pelo menos um outro componente. conseqüentemente, a invenção inclui, mas não é limitada a moléculas biespecíficas, triespecíficas, tetraespecíficas e outras multiespecíficas que são dirigidas a antígenos de superfície de célula, como EGFR, e para outras marcações, como receptores Fc em células efetuidoras.

O termo “anticorpos biespecíficos” também inclui diacorpos. Diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos em que os domínios VH e VL são expressados em uma cadeia de polipeptídeo única, mas usando um ligador que é muito curto para permitir a formação de pares entre os dois domínios na mesma cadeia, assim forçando os domínios a formar par com

11/3

domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação de antígeno (ver, por exemplo, Holliger P. *et al.* (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90- 6444-64448, Poljak R.J. *et al.* (1994), *Structure*, 2: 1121- 1123).

Como usado aqui, o termo “heteroanticorpos” se refere a dois ou mais anticorpos, fragmentos de ligação a anticorpo (por exemplo Fab), derivados dos mesmos, ou regiões de ligação de antígeno ligadas juntas, pelo menos duas das mesmas tendo especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluem uma especificidade de ligação para um receptor de Fc em uma célula efetuidora, e uma especificidade de ligação para um antígeno ou epítipo em uma célula de mar, por exemplo uma célula de tumor. O termo “anticorpo humano”, como usado aqui, se destina a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana (por exemplo mutações introduzidas por metagênese específica ao sítio ou aleatória *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo “anticorpo humano”, como usado aqui, não se destina a incluir anticorpos em que as seqüências CDR derivadas da linhagem germinal de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas sobre as seqüências de armação humanas.

Os termos “anticorpo monoclonal “ ou “composição de anticorpo monoclonal” como usado aqui refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal demonstra uma especificidade de ligação única e afinidade para um epítipo em particular. conseqüentemente, o termo “ anticorpo monoclonal humano” refere-se a anticorpos mostrando uma única especificidade de ligação que tem regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Em uma forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um

hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve fundido em uma célula imortalizada.

5 O termo “anticorpo humano recombinante”, como usado aqui, se destina a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo um camundongo), que é transgênico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir daí
10 (descrito acima na seção I abaixo), (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humano combinatorial, recombinante, e (d) anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolve a emenda de
15 seqüências de gene de imunoglobulina humana a outras seqüências de DNA. Estes anticorpos humanos recombinantes tem regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Em algumas formas de realização, no entanto, estes anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos a metagênese *in vitro* (ou quando um se
20 usa um animal transgênico para seqüências Ig humanas, metagênese somática *in vivo*) e assim as seqüências de aminoácido de regiões VH e VL de anticorpos recombinantes são seqüências que, apesar de derivadas de e relacionadas com seqüências VH e VL de linhagem germinal humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de linhagem germinal de
25 anticorpo humano *in vivo*.

Como usado aqui, um “anticorpo heterólogo” é definido com relação ao organismo não humano transgênico produzindo este anticorpo. Este termo refere-se a um anticorpo tendo uma seqüência de aminoácido ou uma seqüência de ácido nucleico codificando correspondente à encontrada em



um organismo não consistindo de animal não humano transgênico, e geralmente de uma espécie diferente da do animal não humano transgênico.

Como usado aqui, “anticorpo hetero-híbrido” refere-se a um anticorpo tendo cadeias pesadas e leves de diferentes origens de organismos.

5 Por exemplo, um anticorpo tendo uma cadeia pesada humana associada com uma cadeia leve de murinos é um anticorpo hetero-híbrido. Exemplos de anticorpos hetero-híbridos incluem anticorpos quiméricos e humanizados, discutidos acima.

10 Um “anticorpo isolado”, como usado aqui, destina—se a fazer referência a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos tendo diferentes especificidades antigênicas (por exemplo um anticorpo isolado que especificamente liga a EGFR é substancialmente isento de anticorpos que especificamente ligam antígenos diferentes de EGFR). Um anticorpo isolado que especificamente liga a um epítopo, isoforma ou variante
15 de EGFR humano pode, no entanto, ter reatividade cruzada para outros antígenos relacionados, por exemplo, de outras espécies (por exemplo homólogos de espécies EGFR). Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outro material celular e/ou produtos químicos. Em uma forma de realização da invenção, uma combinação de anticorpos monoclonais “isolados” tendo diferentes especificidades é combinada em uma
20 composição bem definida.

Como usado aqui, “ligação específica” refere-se a ligação de anticorpo para uma antígeno predeterminado. Tipicamente, o anticorpo liga com uma afinidade de pelo menos cerca de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, e liga ao antígeno
25 predeterminado com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior do que sua afinidade para ligação a um antígeno não específico (por exemplo BSA, caseína) diferente ao antígeno predeterminado ou um antígeno intimamente relacionado. As frases “um anticorpo reconhecendo um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são usadas de modo

interpermutável aqui com o termo “um anticorpo que liga especificamente a um antígeno”.

Como usado aqui, o termo “elevada afinidade” para um anticorpo IgG refere-se a uma afinidade de ligação de pelo menos cerca de $10^7 M^{-1}$, preferivelmente pelo menos cerca de $10^8 M^{-1}$, mais preferivelmente pelo menos cerca de $10^9 M^{-1}$, e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$, ou maior, por exemplo até $10^{13} M^{-1}$, ou maior. No entanto, ligação de “alta afinidade” pode variar para outros isotipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de “alta afinidade” para um isotipo IgM refere-se a uma afinidade de ligação de pelo menos cerca de $1 \times 10^7 M^{-1}$.

O termo “ K_A ”, como usado, destina-se a fazer referência à constante de associação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

O termo “ K_D ”, como usado, destina-se a fazer referência à constante de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

Como usado aqui, “isotipo” refere-se à classe de anticorpo (por exemplo IgM, ou IgG1) que é codificada por genes de região constante de cadeia pesada.

Como usado aqui, “mudança de isotipo” refere-se ao fenômeno pelo qual a classe, ou isotipo, de um anticorpo muda de uma classe de Ig para as outras classes de Ig.

Como usado aqui, “isotipo não mudado” refere-se a uma classe isotípica de cadeia pesada que é produzida quando não ocorreu nenhuma mudança de isotipo, o gene CH codificando o isotipo não mudado é tipicamente o primeiro gene CH imediatamente a jusante do gene VDJ funcionalmente rearranjado. A mudança de isotipo foi classificada como mudança de isotipo clássica ou não clássica. A mudança de isotipo clássica ocorre por eventos de recombinação que envolvem, pelo menos, uma região de sequência de mudança no transgene. A mudança de isotipo não clássica pode ocorrer, por exemplo, recombinação homóloga entre σ_μ humano e Σ_μ

humano (deleção associada com δ). Os mecanismos de mudança não clássicos alternativos, como recombinação intertransgene e/ou intercromossômica, dentre outras, podem ocorrer e efetuar a mudança de isotipo.

5 Como usado aqui, o termo “seqüência de mudança” refere-se às seqüências de DNA responsáveis pela recombinação de mudança. Uma seqüência de “doador de mudança”, tipicamente uma região de mudança μ , estará 5' (isto é, a montante) da região de construção a ser deletada durante a recombinação de mudança. A região de “aceitador de mudança” estará entre a região de construção a ser deletada e a região constante de substituição (por
10 exemplo γ , ϵ , etc). Como não se tem sítio específico onde a recombinação sempre ocorre, a seqüência de gene final não será tipicamente previsível a partir da construção.

Como usado aqui, “padrão de glicosilação” é definido como o padrão de unidades de carboidrato que são covalentemente fixada a uma
15 proteína, mais especificamente a uma proteína de imunoglobulina. Um padrão de glicosilação de um anticorpo heterólogo pode ser caracterizado como sendo substancialmente similar a padrões de glicosilação que ocorrem naturalmente em anticorpos produzidos pela espécie de animal transgênico não humano, quando um versado na técnica irá reconhecer que o padrão de
20 glicosilação do anticorpo heterólogo como sendo mais similar ao referido padrão de glicosilação na espécie de animal transgênico não humano do que a espécie da qual os genes CH do transgene foram derivados.

O termo “ocorrência natural” como usado aqui, quando aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado
25 na natureza. Por exemplo, uma seqüência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que está presente em um organismo (incluindo vírus) que podem ser isolados de uma fonte na natureza e que não foram intencionalmente modificados pelo homem no laboratório é de ocorrência natural.

O termo “rearranjado”, como usado aqui, refere-se a uma

configuração de um local de imunoglobulina de cadeia pesada ou cadeia leve em que um segmento V está posicionado imediatamente adjacente a um segmento D-J ou J em uma conformação codificando essencialmente um domínio VH ou VL completo, respectivamente. Um local de gene de imunoglobulina rearranjado pode ser identificado por comparação com DNA de linhagem germinal; um local rearranjado terá, pelo menos, um elemento de homologia heptâmero/ nonâmero recombinado.

O termo “não rearranjado” ou “configuração de linhagem germinal”, como usado aqui, com referência a um segmento V, refere-se a configuração em que o segmento V não é recombinado, de modo a estar imediatamente adjacente a um segmento D ou J.

O termo “molécula de ácido nucleico”, como usado aqui, se destina a incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de filamento único ou filamento duplo, mas preferivelmente é DNA de filamento duplo.

O termo “molécula de ácido nucleico isolada” como usado aqui com referência a ácido nucleico codificando anticorpos ou porções de anticorpo (por exemplo VH, VL, CDR3) que ligam a EGFR, destina-se a fazer referência a uma molécula de ácido nucleico em que as seqüências de nucleotídeo codificando o anticorpo ou porção de anticorpo são livres de outras seqüências de nucleotídeo codificando anticorpos ou porções de anticorpo que ligam antígenos diferentes de EGFR, cujas outras seqüências podem naturalmente flanquear o ácido nucleico em DNA genômico humano. Em uma forma de realização, o anticorpo anti-EGFR humano, ou porção do mesmo, inclui o nucleotídeo ou seqüência de aminoácido de 2F8, assim como regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL) tendo as seqüências mostradas em SEQ ID NO. 1 e 3 e 2 e 4, respectivamente.

Como descrito e reivindicado aqui, as seqüências especificadas em SEQ ID NO. 1-4 incluem “modificações de seqüência conservativa” isto

é, modificações de seqüência de nucleotídeo e aminoácido que não afetam de modo significativo ou alteram as características de ligação de anticorpo codificado pela seqüência de nucleotídeo ou contendo a seqüência de aminoácido. Estas modificações de seqüência conservativa incluem substituições, adições e deleções de nucleotídeo e aminoácido. As modificações podem ser introduzidas em SEQ ID NO. 1-4, por técnicas padrões bem conhecidas na técnica, como mutagênese dirigida ao sítio, e mutagênese mediada por PCR. As substituições de aminoácidos conservativas incluem umas em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo treonina, valina, isoleucina), e cadeias laterais aromáticas (por exemplo tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial previsto em um anticorpo anti-EGFR humano é preferivelmente substituído com outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral.

Alternativamente, em outra forma de realização, mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte de uma seqüência de codificando de anticorpo anti-EGFR, como por metagênese de saturação, e os anticorpos anti-EGFR modificados resultantes podem ser triados para atividade de ligação.

Conseqüentemente, anticorpos codificados pelas seqüências de nucleotídeo (região variável de cadeia pesada e leve) descritas aqui e/ou

contendo as seqüências de aminoácido de (região variável de cadeia pesada e leve) descritas aqui (isto é, SEQ ID NO. 1-4) incluem anticorpos substancialmente similares codificados por ou contendo seqüências similares que foram modificadas de modo conservativo. Outra discussão a como estes anticorpos substancialmente similares podem ser gerados com base em seqüências parciais (isto é, regiões variáveis de cadeia pesada e leve) aqui como SEQ ID NO. 1-4, é também apresentada abaixo.

Para ácidos nucleicos, o termo “homologia substancial” indica que dois ácidos nucleicos, ou seqüências designadas dos mesmos, quando alinhadas e comparadas otimamente, são idênticos, com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriadas, em pelo menos cerca de 80% dos nucleotídeos, geralmente pelo menos cerca de 90% a 95%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% a 99,5% dos nucleotídeos. Alternativamente, existe homologia substancial quando os segmentos irão hibridizar sob condições de hibridização seletivas, para o complemento do filamento.

A identidade percentual entre duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, % de homologia = # de posições idênticas/ total # de posições x 100), levando em conta o número de falhas, e o comprimento de cada falha, que precisam ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas seqüências. A comparação de seqüências e determinação de identidade percentual entre duas seqüências pode ser obtida usando algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não limitativos abaixo.

A identidade percentual entre duas seqüências de nucleotídeos pode ser determinada usando o programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>) usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de falha de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. A identidade percentual entre duas seqüências de nucleotídeo ou aminoácido também pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e

16/2

W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17 (1988), que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de falha de 12 e uma penalidade de falha de 4. Além disso, a identidade percentual entre duas seqüências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970), que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>) usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de falha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4, e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

As seqüências de ácido nucleico e proteína da presente invenção podem ser ainda usadas como uma “seqüência de busca” para realizar uma busca contra bases de dados públicas, para identificar, por exemplo, seqüências relacionadas. Estas pesquisas podem ser realizadas usando programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0), de Altschul *et al.* (1990), *J. mol. Biol.* 215- 403-10. As buscas de nucleotídeo BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, *escore* = 100, comprimento da palavra = 12 para obter seqüências de nucleotídeos homólogas às moléculas de ácido nucleico da invenção. As buscas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, *escore* = 50, comprimento de palavra = 3 para obter seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de proteína da invenção. Para obter alinhamentos com falhas para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser usado como descrito em Altschul *et al.*, (1997), *Nucleic Acids Res.* 25(17) 3389-3402. Quando usando programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros de default dos programas respectivos (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células completas, em um lisado de célula, ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é “isolado” ou “tornado

164

substancialmente puro” quando purificado fora de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, por técnicas padrões, incluindo tratamento alcalino /SDS, banda CsCl, cromatografia em coluna, eletroforese de gel agarose, e outros bem conhecidos na técnica. Ver F. Ausubel *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, NY (1987).

As composições de ácido nucleico da presente invenção, apesar de com freqüência em uma seqüência nativa, (exceto pelos sítios de restrição modificados e outros), de ou cDNA, genômico ou misturas, podem ser mudados, dos mesmos de acordo com técnicas padrões para prove seqüências de genes. Para seqüências de codificação, estas mutações podem afetar a seqüência de aminoácido, como desejado. Particularmente, as seqüências de DNA substancialmente homólogas ou derivadas de seqüências nativas, V, D, J, constantes, comutações e outras, descritas aqui, são contempladas (onde “derivado” indica que uma seqüência é idêntica ou modificada de outra seqüência).

Um ácido nucleico é “ligado de modo operativo” quando é colocado em uma relação funcional com outra seqüência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou melhorador é ligado de modo operativo a uma seqüência de codificação se ele afetar a transcrição da seqüência. Com relação a seqüência reguladoras de transcrição, ligado de modo operativo significa que as seqüências de DNA sendo ligadas são contíguas e, onde necessário para unir duas regiões de codificação de proteína, e na matriz de leitura. Para seqüências de mudança, ligado de modo operativo indica que as seqüências são capazes de efetuar a recombinação de mudança.

O termo “vetor”, como usado, se destina a referir a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligado. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a um laço DNA

de filamento duplo circular em que os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Alguns vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores de mamíferos epissômicos. Outros vetores (por exemplo vetores de mamíferos não epissômicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira quando da introdução na célula hospedeira, e assim são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, alguns vetores são capazes de dirigir a expressão de genes em que eles são ligados de modo operativo. Estes vetores são referidos aqui como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente “vetores de expressão”). Geralmente, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão com frequência na forma de plasmídeos. No presente relatório, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados de modo interpermutável como o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor. No entanto, a invenção se destina a incluir estas outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo retrovírus defeituosos na replicação, adenovírus e vírus adeno-associados), que servem a funções equivalentes.

O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente célula hospedeira) como usado aqui, se destina a fazer referência a uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve-se entender que estes termos se destinam a fazer referência não apenas à célula em questão particular, mas à progênie desta célula. Porque algumas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido ou a influências de mutação ou ambientais, esta progênie não pode, de fato, ser idêntica à célula parental, mas ainda incluídos no escopo do termo “célula hospedeira” como usado aqui. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, células CHO, e células linfocíticas.

Vários aspectos da invenção são descritos em outros detalhes nas seguintes sub-seções.

I. Produção de anticorpos humanos para EGFR

Os anticorpos monoclonais (MAbs) da invenção podem ser produzidos por várias técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein (1975) Nature 256: 495. Apesar dos procedimentos de hibridização de célula somática serem preferidos em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser empregadas, por exemplo transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparar hibridomas é o sistema de murinos. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento bem estabelecido. Os protocolos e técnicas de imunização para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Os parceiros de fusão (por exemplo células de mieloma de murinos) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

Em uma forma de realização preferida, os anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra EGFR podem ser gerados usando camundongos transgênicos transportando partes do sistema imune humano em vez de sistema de camundongos. Estes camundongos transgênicos, referidos aqui como camundongos “HuMAb” contém um minilocal de gene de imunoglobulina humano que codifica seqüências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e cadeia leve κ não rearranjadas, junto com mutações marcadas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógenos (Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368 (6474): 856 - 859). conseqüentemente, os camundongos demonstram expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo, e em resposta a imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanos, introduzidos, sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar monoclonal IgGk humano de alta afinidade (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; estudado em

Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49 - 101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.*, vol. 13: 65 - 93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536 - 546). A preparação de camundongos HuMab é descrita em detalhe na seção II abaixo e em Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287 - 6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647 - 656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 3720 - 3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4: 117 - 123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821 - 830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152: 2912 - 2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368 (6474): 856 - 859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49 - 101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579 - 591; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* vol. 13: 65 - 93; Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536 - 546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 - 851, cujos conteúdos são incorporados aqui por referência em sua totalidade. Ainda mais, patentes U.S. números 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todas de Lonberg e Kay, e GenPharm International; patente U.S. número 5.545.807 para Surani *et al.*; publicação internacional números WO 98/24884, publicado em 11 de junho de 1998; WO 94/25585, publicado em 10 de novembro de 1994; WO 93/1227, publicado em 24 de junho de 1993; WO 92/22645, publicado em 23 de dezembro de 1992; WO 92/03918; publicado em 19 de março de 1992, cujas descrições são aqui incorporadas aqui por referência em sua totalidade. Alternativamente, os camundongos transgênicos HCO12 descritos no exemplo 2 podem ser usados para gerar anticorpos anti-EGFR humanos.

Imunizações de anticorpo humano

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para EGFR, camundongos HuMab podem ser imunizados com uma

preparação purificada ou enriquecida de antígeno EGFR e/ou células expressando EGFR, como descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856 - 859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 - 851 e WO 98/24884. Preferivelmente, os camundongos terão 6-16 semanas de idade quando da primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou enriquecida (5-20 µg) de antígeno EGFR (por exemplo purificado de células LNCaP expressando EGFR) pode ser usada para imunizar os camundongos HuMAb intraperitonealmente. No caso em que as imunizações usando uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno EGFR não resulta em anticorpos, os camundongos também podem ser imunizados com células expressando EGFR, por exemplo uma linhagem de célula de tumor, para promover respostas imunes.

A experiência cumulativa com vários antígenos demonstrou que os camundongos transgênicos HuMAb respondem melhor quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno em adjuvante de Freund completo, seguido por imunizações i.p. cada semana sim, cada semana não (até um total de 6) com antígeno em adjuvante de Freund incompleto. A resposta imune pode ser monitorada no curso de protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas com sangramentos retro-orbitais. O plasma pode ser triado por ELISA (como descrito abaixo), e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-EGFR podem ser usados para fusões. Os camundongos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Espera-se que 2-3 fusões de cada antígeno possam ser necessárias. Vários camundongos serão imunizados para cada antígeno. Por exemplo, um total de doze camundongos HuMAb das cepas HC07 e HC012 pode ser imunizado.

Geração de hibridomas produzindo anticorpos monoclonais humanos para EGFR

Os esplenócitos de camundongos podem ser isolados e

N67

fundidos com PEG a uma linhagem de célula de mieloma de camundongo com base nos protocolos padrões. Os hibridomas resultantes são então triados para a produção de anticorpos específicos para antígeno. Por exemplo, suspensões de células únicas de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados são fundidas em um sexto o número de células mieloma de camundongo não secretando P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com 50% PEG. As células são colocadas em placas em aproximadamente 2×10^5 em placa de microtitulação de fundo plano, seguido por uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo 20% soro de clone fetal, 18% meio condicionado com "653", 5% Origen (IGEN), 4 mM de L-glutamina, 1 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e 1X HAT (Sigma; o HAT é adicionado 24 horas após a fusão). Após duas semanas, as células são cultivadas em meio em que o HAT é substituído com HT. Os reservatórios individuais são então triados pr ELISA para anticorpos IgG e IgM monoclonal anti-EGFR humano. Uma vez que ocorre o crescimento de hibridoma extensivo, meio é observado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas de secreção de anticorpo são recolocados em placa, triados novamente, e se ainda positivos para IgG humano, anticorpos monoclonais anti-EGFR, podem ser subclonados pelo menos duas vezes por limitação da diluição. Os subclones estáveis são então cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

Geração de transfectomas produzindo anticorpos monoclonais humanos para EGFR

Os anticorpos humanos da invenção também podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinantes e métodos de transfecção de gene, como bem conhecido na técnica (Morrison, S. (1985)

Science 229: 1202).

Por exemplo, em uma forma de realização, o gene (s) de interesse, por exemplo, genes de anticorpo humano, podem ser ligados em um vetor de expressão como plasmídeo de célula eucariótica. O plasmídeo pode então ser introduzido em uma célula hospedeira, como uma célula bacteriana (por exemplo *E. coli*), e a célula pode ser cultivada. A célula hospedeira contendo o plasmídeo com DNA integrado pode ser selecionada e tratada com lisozima para remover as paredes de célula. Os esferoplastos resultantes podem ser fundidos com células imortalizadas, como células de mieloma (referidas como “transfecção”). Após fusão, as células estáveis (transfectantes) podem ser identificadas e selecionadas. Estas células representam os transfectomas que podem então ser amplificados por cultivos dos mesmos como ascites ou em cultura de tecido e usados para produzir anticorpos humanos recombinantes.

15 *Uso de seqüências de anticorpo parciais para expressar anticorpos intactos*

Os anticorpos interagem com antígenos de marcação predominantemente através de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões de determinação de complementaridade de cadeia pesada e leve (CDRs). Por esta razão, as seqüências de aminoácido dentro de CDRs são mais diversas entre os anticorpos individuais do que as seqüências fora de CDRs. Porque as seqüências de CDR são responsáveis pela maior parte das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar os anticorpos recombinantes que imitam as propriedades de anticorpos específicos de ocorrência natural por construção de vetores de expressão que incluem seqüências de CDR a partir de anticorpo específico de ocorrência natural enxertado sobre seqüências de armação de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (ver, por exemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, *Nature* 332: 323 - 327; Jones, P. *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522 - 525; e Queen, C. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86: 10029 - 10033). Estas seqüências

de armação podem ser obtidas de bases de dados públicas de DNA que incluem seqüências de gene de anticorpo de linhagem germinal. Estas seqüências de linhagem germinal irão diferir de seqüências de gene de anticorpo maduros porque não irão incluir genes variáveis completamente montados, que são formados por união de V(D)J durante a maturação da célula B. As seqüências de gene de linhagem germinal irão também diferir de seqüências de um anticorpo de repertório secundário de alta afinidade em indivíduo uniformemente através da região variável. Por exemplo, as mutações somáticas são relativamente não freqüentes na porção amino-terminal de região de armação. Por exemplo, mutações somáticas são relativamente não freqüentes na porção amino terminal de região de armação 1 e na porção carbóxi-terminal de região de armação 4. Além disso, muitas mutações somáticas não alteram de modo significativo as propriedades de ligação do anticorpo. Por esta razão, não é necessário obter toda a seqüência de DNA de um anticorpo particular a fim de recriar um anticorpo recombinante intacto tendo propriedades de ligação similares às do anticorpo original (ver PCT/US 99/05535 depositado em 12 de março de 1999, que é incorporado aqui por referência para todos os fins). A seqüência de cadeia pesada e leve parcial englobando as regiões de CDR é tipicamente suficiente para este fim. A seqüência parcial é usada para determinar quais segmentos de gene de união e variáveis de linhagem germinal contribuem para os genes variáveis de anticorpo recombinado. A seqüência de linhagem germinal é então usada para encher as porções faltando das regiões variáveis. As seqüências de líder de cadeia pesada e leve são clivadas durante a maturação da proteína e não contribuem para as propriedades do anticorpo final. Por esta razão, é necessário usar a seqüência líder de linhagem germinal correspondente para construções de expressão. Para adicionar seqüências faltando, seqüências de cDNA clonadas podem ser combinadas com oligonucleotídeos sintéticos por ligação ou amplificação de PCR.

Alternativamente, a região variável completa pode ser sintetizada como um conjunto de oligonucleotídeos curtos, de sobreposição, e combinada por amplificação de PCR para criar um clone de região variável completamente sintético. Este processo tem certas vantagens como eliminação ou inclusão ou

5 sítios de restrição particulares, ou otimização de códons particulares.

As seqüências de nucleotídeos de transcritos de cadeia pesada e leve de hibridomas são usadas para projetar um conjunto de sobreposição de oligonucleotídeos sintéticos para criar seqüências V sintéticas com capacidades de codificação de aminoácido idênticas como as seqüências

10 naturais. As seqüências de cadeia pesada e kappa sintéticas podem diferir das seqüências naturais em três modos: filamentos de bases de nucleotídeos repetidas são interrompidas para facilitar a síntese de oligonucleotídeo e amplificação PCR; sítios de iniciação de tradução ótimos são incorporados de acordo com as regras de (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870); e,

15 sítios HindIII são engenheirados a montante dos sítios de iniciação de tradução.

Para ambas as regiões variáveis de cadeia pesada e leve, as seqüências de filamentos de codificação otimizados, e não codificação correspondentes, são rompidas em 30-50 nucleotídeos, aproximadamente no

20 ponto de meio do oligonucleotídeo de não codificação correspondente. Assim, para cada cadeia, os oligonucleotídeos podem ser montados em conjuntos de filamento duplo de sobreposição que incluem segmentos de 150 – 400 nucleotídeos. As poças são então usadas como gabaritos para produzir produtos de amplificação PCR de 150- 400 nucleotídeos. Tipicamente, um

25 conjunto de oligonucleotídeo de região variável única será rompido em poças que são amplificadas separadamente para gerar dois produtos PCV de sobreposição. Estes produtos de sobreposição são então combinados por amplificação PCR para formar a região variável completa. Pode ser também desejável incluir um fragmento de sobreposição da região constante de cadeia



pesada ou leve (incluindo o sítio BbsI da cadeia leve Kappa ou o sítio AgeI se a cadeia pesada gama) na amplificação PCR para gerar fragmentos que podem ser facilmente clonados nas construções de vetor de expressão.

5 As regiões variáveis de cadeia pesada e leve re-construídas são então combinadas com promotor clonado, iniciação de tradução, região constante, seqüências 3' não traduzida, poliadenilação, e terminação de transcrição, seqüências para formar construções de vetor de expressão. As construções de expressão de cadeia pesada e leve podem ser combinadas em um vetor único, co-transfectado, serialmente transfectado ou separadamente
10 transfectado em células hospedeiras que são então fundidas para formar uma célula hospedeira expressando ambas as cadeias.

Os plasmídeos para uso na construção de vetores de expressão para IgGκ humano são descritos abaixo. Os plasmídeos foram construídos de modo que seqüências de cDNA de cadeia pesada V e leve kappa V,
15 amplificadas por PCR, podem ser usadas para reconstruir minigenes de cadeia pesada e leve. Estes plasmídeos podem ser usados para expressar anticorpos IgG₁ κ quimérico ou IgG₄ κ. Os plasmídeos similares podem ser construídos para expressão de outros isotipos de cadeia pesada, ou para expressão de anticorpos compreendendo cadeias leves lambda.

20 Assim, em outro aspecto da invenção, os aspectos estruturais de anticorpos anti-EGFR humanos da invenção, por exemplo 2F8, são usados para criar anticorpos anti-EGFR humanos estruturalmente relacionados que retém, pelo menos, uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, como ligação a EGFR. Mais especificamente, uma ou mais regiões CDR de
25 2F8 podem ser combinada de modo recombinante com regiões de armação humana conhecidas e CDRs para criar anticorpos anti-EGFR humanos, adicionais, engenheirados de modo recombinante da invenção.

Conseqüentemente, em outra forma de realização, a invenção provê um método para a preparação de um anticorpo anti-EGFR

compreendendo:

preparar um anticorpo compreendendo (1) regiões de armação de cadeia pesada humana e CDRs de cadeia pesada humana, em que pelo menos um dos CDRs de cadeia pesada humana compreende uma seqüência de aminoácido selecionada dentre as seqüências de aminoácido de CDRs como mostrado na figura 15 (ou resíduos de aminoácido correspondentes na SEQ ID NO: 2); e (2) regiões de armação de cadeia leve humana e CDRs de cadeia leve humana, em que pelo menos um dos CDRs de cadeia leve humana compreende uma seqüência de aminoácido selecionada dentre as seqüências de aminoácido de CDRs mostradas na figura 15 (ou resíduos de aminoácido correspondentes na SEQ ID NO: 4); em que o anticorpo retém a capacidade de ligar a EGFR.

A capacidade do anticorpo de ligar EGFR pode ser determinada usando testes de ligação padrões, como os dos exemplos (por exemplo um ELISA). Porque é bem conhecido na técnica que os domínios CDR3 de cadeia pesada e leve de anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade / afinidade de ligação de um anticorpo para um antígeno, os anticorpos recombinantes da invenção preparados como especificado acima preferivelmente compreendem os CDR3s de cadeia pesada e leve de 2F8. Os anticorpos ainda podem compreender os CDR2s de 2F8. Os anticorpos ainda podem compreender os CDR1s de 2F8. conseqüentemente, a invenção ainda provê anticorpos anti-EGFR compreendendo: (1) regiões de armação de cadeia pesada humana, uma região CDR1 de cadeia pesada humana, uma região CDR2 de cadeia pesada humana, e uma região CDR3 de cadeia pesada humana, em que a região CDR3 de cadeia pesada humana é CDR3 de 2F8 como mostrado na Figura 15 (ou resíduos de aminoácido correspondentes em SEQ ID NO 2), e (2) regiões de armação de cadeia leve humana, uma região CDR1 de cadeia leve humana, uma região CDR2 de cadeia leve humana e uma região CDR2

173

de cadeia leve humana, em que a uma região CDR3 de cadeia leve humana é CDR3 ou 2F8 como mostrado na Figura 15 (ou resíduos de aminoácido correspondentes em SEQ ID NO 4), em que o anticorpo liga a EGFR. O anticorpo pode ainda compreender o CDR2 de cadeia pesada e/ou o CDR2 de cadeia leve de 2F8. O anticorpo pode ainda compreender o CDR1 de cadeia pesada e/ou CDR1 de cadeia leve de 2F8.

Preferivelmente, o CDR1, 2 e/ou 3 de anticorpos engenheirados descritos acima compreende a(s) seqüência(s) de aminoácido exata(s) dos 2F8 descritos aqui. No entanto, o versado na técnica irá notar que algum desvio das seqüências CDR exatas de 2F8 pode ser possível enquanto ainda retendo a capacidade de anticorpo de ligar EGFR efetivamente (por exemplo substituições conservativas). Conseqüentemente, em outra forma de realização, o anticorpo engenheirado pode ser composto de um ou mais CDRs que são, por exemplo 90%, 95%, 98% ou 99,5% idênticos a um ou mais CDRs de 2F8. Além de simplesmente ligar EGFR, os anticorpos engenheirados como os descritos acima podem ser selecionados para sua retenção de outras propriedades funcionais de anticorpos da invenção, como:

- (1) ligação a células vivas expressando EGFR,
- (2) ligação de alta afinidade para EGFR;
- (3) ligação a epítipo único em EGFR (para eliminar a possibilidade de que os anticorpos monoclonais com atividades complementares quando usados em combinação devem competir para ligação ao mesmo epítipo;
- (4) opsonização de células expressando EGFR e/ou
- (5) mediação de inibição de crescimento, fagocitose e/ou morte de células expressando EGFR na presença de células efetadoras humanas.

Caracterização de ligação de anticorpos monoclonais humanos a EGFR

Para caracterizar ligação de anticorpos EGFR monoclonais da



invenção, soro de camundongos imunizados podem ser testados, por exemplo, por ELISA. Brevemente, as placas de microtitulação são revestidas com EGFR purificado a 0,25 µg /ml em PBS, e então bloqueadas com 5% albumina de soro bovino a 5% em PBS. As diluições de plasma de camundongos imunizados com EGFR são adicionadas a cada reservatório e incubadas durante 1-2 h a 37 °C. As placas são lavadas com PBS/Tween e então incubadas com reagente policlonal específico para Fc de IgG anti-humano de cabra, conjugado a fosfatase alcalina durante 1 h a 37 °C. Após lavar, as placas são reveladas com substrato pNPP (1 mg/ml) e analisadas a OD de 405-650. preferivelmente, os camundongos que desenvolvem os maiores títulos serão usados para fusões.

Um teste ELISA como acima pode ser também usado para triar para hibridomas que mostram reatividade positiva com imunogene EGFR. Os hibridomas que ligam com elevada avidéz para EGFR serão subclonados e ainda caracterizados. Um clone de cada hibridoma, que retém a reatividade das células parentais (por ELISA) pode ser escolhido para fazer um banco de células em 5-10 viais armazenados a -140 °C e para purificação de anticorpo.

Para purificar anticorpos anti-EGFR humanos, hibridomas selecionados podem ser cultivados em fracos de centrífuga de 2 l para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes de cromatografia por afinidade com sefarose de proteína A (Pharmacia, Piscataway, NJ). O IgG eluído pode ser verificado por eletroforese de gel e cromatografia de líquido de elevado desempenho para assegurar pureza. A solução de tampão pode ser mudada com PBS, e a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ usando coeficiente de extinção 1.43. Os anticorpos monoclonais podem ser divididos em alíquotas e armazenados a -80 °C.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-EGFR

humanos selecionados ligam a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado usando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, IL). Os estudos de competição usando anticorpos monoclonais não rotulados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser realizados usando placas ELISA revestidas com EGFR como descrito acima. A ligação MAb biotinilada pode ser detectada com sonda de fosfatase alcalina – estreptavidina.

Para determinar o isotipo de anticorpos purificados, ELISAs isotipo podem ser realizados. Os reservatórios de placas de microtitulação podem ser revestidos com 10 µg /ml de Ig anti-humano durante a noite a 4 °C. Após bloqueio com 5% BSA, as placas são reagidas com 10 µg/ml de anticorpos monoclonais ou controles de isotipo purificados, em temperatura ambiente durante duas horas. Os reservatório s podem ser então reagidos com sondas conjugadas a fosfatase alcalina – específicas para IgG1 humano ou IgM humano. As placas são reveladas e analisadas como descrito acima.

A fim de demonstrar a ligação de anticorpos monoclonais a células vivas expressando EGFR, foi usada citometria de fluxo. Brevemente, as linhagens de célula expressando EGFR (cultivadas sob condições de crescimento padrões) são misturadas com várias concentrações de anticorpos monoclonais em PBS contendo 0,1 % Tween 80 e 20 soro de camundongo, e incubada a 37°C durante 1 h. Após lavar, as células são reagidas com anticorpo IgG anti-humano rotulado com fluoresceína, sob as mesmas condições que a coloração de anticorpo primário. As amostras podem ser analisadas por instrumento FACScan usando propriedades de difusão lateral e luz para reunir em células únicas. Um teste alternativo usando microscopia fluorescente pode ser usado (além ou em vez de) teste de citometria de fluxo. As células podem ser coloridas exatamente como acima e examinadas por microscopia de fluorescência. Este método permite a visualização de células individuais, mas podem ter sensibilidade diminuída dependendo da densidade

do antígeno.

IgGs humanos anti-EGFR podem ser ainda testados para reatividade com antígeno EGFR por Western blot. Brevemente, os extratos de célula de célula expressando EGFR podem ser preparados e submetidos a eletroforese de gel poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS). Após eletroforese, os antígenos separados serão transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro de camundongo a 20%, e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação de IgG humano pode ser detectada usando fosfatase alcalina de IgG anti-humano e reveladas com

5
10

tabletes de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Atividades fagocíticas e de morte celular de anticorpos monoclonais humanos para EGFR

Além de ligar especificamente a EGFR, os anticorpos monoclonais anti-EGFR humanos podem ser testados para sua capacidade de mediar fagocitose e morte de células expressando EGFR. O teste de atividade de anticorpo monoclonal *in vitro* irá prover uma triagem inicial antes de teste de modelos *in vivo*. Brevemente, as células polimorfonucleares (PMN) ou outras células efetadoras, de doadores saudáveis, podem ser purificadas por centrifugação de densidade Ficoll Hypaque, seguido por lise de eritrócitos contaminantes. Os PMNs lavados podem ser colocados em suspensão em RPMI suplementado com 10% soro de bezerro fetal inativado com calor e misturados com células rotuladas ^{51}CR expressando EGFR, em várias relações de células efetadoras para células de tumor (-células efetadoras: células de tumor). Os IgGs anti-EGFR humanos purificados podem ser então

15
20
25

adicionados em várias concentrações. O IgG humano irrelevante pode ser usado como controle negativo. Os testes podem ser realizados durante 0-120 minutos a 37°. C. As amostras podem ser testadas para citólise por medida de liberação de ^{51}CR no sobrenadante de cultura. Monoclonal anti-EGFR também pode ser testados em combinações entre si para determinar se citólise

é melhorada com anticorpos monoclonais múltiplos.

Os anticorpos monoclonais humanos que ligam a EGFR também podem ser testados em qualquer modelo in vivo (por exemplo em camundongos) para determinar sua eficácia na mediação de fagocitose e morte de células expressando EGFR, por exemplo células de tumor. Estes anticorpos podem ser selecionados, por exemplo, com base nos seguintes critérios, que não pretendem ser exclusivos:

- 1) ligação a células vivas expressando EGFR;
- 2) alta afinidade de ligação a EGFR;
- 3) ligação a epítipo único em EGFR (para eliminar a possibilidade de que anticorpos monoclonais com atividades complementares quando usados em combinação devem competir para ligação com o mesmo epítipo;
- 4) opsonização das células expressando EGFR;
- 5) mediação de inibição de crescimento, fagocitose e/ou morte de células expressando EGFR na presença de células efetadoras humanas.

Os anticorpos monoclonais humanos preferidos atendem a um ou mais, e preferivelmente todos, estes critérios. Em uma forma de realização particular, os anticorpos monoclonais humanos são usados em combinação, por exemplo, como uma composição farmacêutica, compreendendo dois ou mais anticorpos monoclonais anti-EGFR ou fragmentos do mesmo. Por exemplo, anticorpos monoclonais anti-EGFR humanos tendo atividades diferentes, mas complementares, podem ser combinados em uma terapia única para obter um efeito terapêutico ou diagnóstico. Uma ilustração disto pode ser uma composição contendo um anticorpo monoclonal humano anti-EGFR que media a morte altamente eficaz de células de marcação na presença de células efetadoras, combinadas com outro anticorpo monoclonal anti-EGFR humano que inibe o crescimento de células expressando EGFR.

II. Produção de animais não humanos transgênicos que geram anticorpos monoclonais anti-EGFR humanos

Em ainda outro aspecto, a invenção provê animais não humanos, transgênicos, por exemplo camundongos transgênicos, que são capazes de expressar anticorpos monoclonais humanos que especificamente ligam a EGFR, preferivelmente com alta afinidade. Em uma forma de realização preferida, os animais transgênicos não humanos, por exemplo, os camundongos transgênicos (camundongos HuMAb) tem um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve. Em uma forma de realização, os animais transgênicos não humanos, por exemplo os camundongos transgênicos, foram imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno EGFR e/ou células expressando EGFR. Preferivelmente, os animais transgênicos não humanos, por exemplo, os camundongos transgênicos, são capazes de produzir isotipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para EGFR (por exemplo IgG, IgA e/ou IgE) ao sofrerem recombinação V-D-J e mudança de isotipos. A mudança de isotipos pode ocorrer, por exemplo, por mudança de isotipos clássica ou não clássica.

O projeto de um animal transgênico não humano que responde a estimulação de antígeno estranho com um repertório de anticorpo heterólogo, requer que os transgenes de imunoglobulina heterólogos contenham a função de animal transgênico corretamente através da via do desenvolvimento de célula B. Em uma forma de realização preferida, a função correta de um transgene heterólogo de cadeia pesada inclui a mudança de isotipo. conseqüentemente, os transgenes da invenção são construídos de modo a produzir mudança de isotipo e um ou mais dos seguintes: (1) expressão de alto nível e específica para tipo de célula, (2) rearranjo de gene funcional; (3) ativação de e resposta a exclusão alélica, (4) expressão de um repertório primário suficiente, (5) transdução de sinal, (6) hipermutação

somática, e (7) domínio do local do anticorpo transgene durante a resposta imune.

Nem todos os critérios acima precisam ser atendidos. Por exemplo, nas formas de realização em que os locais de imunoglobulina endógena do animal transgênico são funcionalmente rompidos, o transgene não precisa ativar a exclusão alélica. Além disso, nas formas de realização em que o transgene compreende um gene de imunoglobulina de cadeia pesada e/ou cadeia leve funcionalmente rearranjado, o segundo critério de rearranjo de gene funcional é desnecessário, pelo menos para este transgene que já foi rearranjado. Para informação antecedente sobre imunologia molecular, ver, Fundamental Immunology, segunda edição (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N. Y., que é incorporado aqui por referência.

Em algumas formas de realização, os animais transgênicos não humanos usados para gerar os anticorpos monoclonais humanos da invenção contém transgenes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina heteróloga rearranjados, não rearranjados, ou uma combinação de rearranjados e não rearranjados, na linhagem germinal do animal transgênico. Cada um dos transgenes de cadeia pesada compreende pelo menos um gene C_H . Além disso, o transgene de cadeia pesada pode conter seqüências de mudança de isotipo funcional, que são capazes de suportar a mudança de isotipo de um transgene heterólogo codificando genes C_H múltiplos nas células B do animal transgênico. Estas seqüências de mudança podem ser as que ocorrem naturalmente no local de imunoglobulina de linhagem germinal da espécie que serve como a fonte dos genes C_H do transgene, ou estas seqüências de mudança podem ser derivadas das que ocorrem na espécie que deve receber a construção de transgene (o animal transgênico). Por exemplo, uma construção de transgene humano, que é usada para produzir um camundongo transgênico, pode produzir uma maior freqüência de eventos de mudança de isotipo, se ela incorporar seqüências de mudança similares às que ocorrem naturalmente no



local de cadeia pesada do camundongo, como provavelmente as seqüências de mudança do camundongo são otimizadas para funcionar com o sistema de enzima recombinase de mudança de camundongo, enquanto as seqüências de mudança humana não são. As seqüências de mudança podem ser isoladas e clonadas por métodos de clonagem convencionais, ou podem ser sintetizadas *de novo* a partir dos oligonucleotídeos sintéticos de sobreposição projetados com base na informação de seqüência publicada com relação às seqüências da região de mudança de imunoglobulina (Mills *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15: 7305 - 7316 (1991); Sideras *et al.*, *Intl. Immunol.* 1: 631 - 642 (1989), que são incorporados aqui por referência). Para cada um dos animais transgênicos acima, os transgenes de imunoglobulina de cadeia pesada e leve heterólogos, funcionalmente rearranjados, são encontrados em uma fração significativa de células B do animal transgênico (pelo menos 10 por cento).

Os transgenes usados para gerar os animais transgênicos da invenção incluem um transgene de cadeia pesada compreendendo DNA codificando, pelo menos, um segmento de gene variável, um segmento de gene de diversidade, um segmento de gene de união, e pelo menos um segmento de gene de região constante. O transgene de cadeia leve de imunoglobulina compreende DNA codificando pelo menos um segmento de gene variável, um segmento de gene de união e pelo menos um segmento de gene de região constante. Os segmentos de gene codificando os segmentos de gene de cadeia pesada e leve são heterólogos para o animal transgênico não humano em que eles são derivados de, ou correspondem a, DNA codificando segmentos de gene de cadeia pesada e leve de imunoglobulina de uma espécie não consistindo do animal transgênico não humano. Em um aspecto da invenção, o transgene é construído de modo que os segmentos de gene individuais são não rearranjados, isto é, não rearranjados de modo a codificar uma cadeia pesada ou leve de imunoglobulina funcional. Estes transgenes não rearranjados suportam a recombinação dos segmentos de gene V, D e J

181

(rearranjo funcional) e preferivelmente suportam a incorporação de toda ou uma parte de um segmento de gene de região D na cadeia pesada de imunoglobulina rearranjada resultante dentro do animal transgênico não humano quando exposto a antígeno EGFR.

- 5 Em uma forma de realização alternativa, os transgenes compreendem um “mini-local” não rearranjado. Estes transgenes tipicamente compreendem uma porção substancial dos segmentos C, D e J, assim como um sub-conjunto dos segmentos de gene V. Em tais construções de transgene, as várias seqüências regulatórias, por exemplo, promotores, melhoradores, regiões de mudança de classe, seqüências de doador de emenda e receptor de emenda para processamento de RNA, sinais de recombinação e outros, compreendem seqüências correspondentes derivadas do DNA heterólogo. Estas seqüências regulatórias podem ser incorporadas no transgene da mesma ou espécie relacionada, do animal não humano usado na invenção. Por exemplo, segmentos de gene de imunoglobulina humana podem ser combinados em um transgene com uma seqüência melhoradora de imunoglobulina de roedor para uso em um camundongo transgênico. Alternativamente, as seqüências regulatórias sintéticas podem ser incorporadas no transgene, em que estas seqüências regulatórias sintéticas não são homólogas a uma seqüência de DNA funcional, que se sabe ocorre naturalmente nos genomas de mamíferos. As seqüências regulatórias sintéticas são projetadas de acordo com regras de consenso, por exemplo, as especificando as seqüências permissíveis de um sítio de receptor de emenda ou um motivo promotor/melhorador. Por exemplo, um mini-local compreende uma porção do local genômico de imunoglobulina tendo pelo menos uma deleção interna (isto é não em um término da porção) de uma porção de DNA não essencial (por exemplo seqüência de intervenção, íntron ou porção da mesma), como comparado com o local Ig de linhagem germinal de ocorrência natural.
- 10
- 15
- 20
- 25

Em uma forma de realização preferida da invenção, o animal transgênico usado para gerar anticorpos humanos para EGFR contém, pelo menos, um, tipicamente 2-10, e às vezes 25-50 ou mais cópias do transgene descrito no exemplo 12 de WO 98/24884 (por exemplo, pHCl ou pHCl2) criado com um animal contendo uma única cópia de um transgene de cadeia leve descrito nos exemplos 5, 6, 8, ou 14 de WO 98/24884, e da ninhada criada com o animal deletado em J_H, descrito no exemplo 10 de WO 98/24884, cujos conteúdos são aqui expressamente incorporados por referência. Os animais são criados a homozigotidade para cada um destes traços. Estes animais tem o seguinte genotipo: uma cópia única (por conjunto haplóide de cromossomos) de um mini-local não rearranjado de cadeia pesada humana (descrito no exemplo 12 de WO 98/24884), uma cópia única (por conjunto haplóide de cromossomos) de uma construção de cadeia leve K humana, rearranjada (descrita no exemplo 14 de WO 98/24884), e uma deleção em cada local de cadeia pesada endógena que remove todos os segmentos J_H funcionais (descrito no exemplo 10 de WO 98/24884). Estes animais são cruzados com camundongos que são homozigóticos para a deleção de segmentos J_H (exemplos 10 de WO 98/24884) para produzir uma ninhada que é homozigótica para a deleção de J_H e hemizigótica para as construções de cadeia pesada e leve humanas. Os animais resultantes são injetados com antígenos e usados para a produção de anticorpos monoclonais humanos contra estes antígenos.

As células B isoladas deste animal são monoespecíficas com relação às cadeias pesadas e leves humanas porque elas contém somente uma única cópia de cada gene. Além disso, elas serão monoespecíficas com relação a cadeias pesadas humanas ou de camundongo porque ambas as cópias de gene de cadeia pesada de camundongo endógenas são não funcionais devido à deleção englobando a região J_H introduzida, como descrito no exemplo 9 e 12 de WO 98/24884. Além disso, uma fração

18/3/2

substancial das células B será monoespecífica com relação às cadeias leves humana ou de camundongo porque a expressão da cópia única do gene de cadeia leve κ humano rearranjado irá excluir, de modo alélico e isotípico, o rearranjo dos genes de cadeia κ e lambda endógena de camundongo em uma

5 fração significativa de células B.

O camundongo transgênico da forma de realização preferida irá exibir produção de imunoglobulina com um repertório significativo, idealmente substancialmente similar ao de camundongo nativo. Assim, por exemplo, em formas de realização onde os genes Ig endógenos foram

10 inativados, os níveis de imunoglobulina totais estarão na faixa de cerca de 0,1 a 10 mg/ml de soro, preferivelmente 0,5 a 5 mg/ml, idealmente pelo menos cerca de 1,0 mg/ml. Quando um transgene capaz de efetuar uma mudança para IgG a partir de IgM foi introduzido no camundongo transgênico, a relação de soro IgG para IgM de camundongo adulto é preferivelmente cerca

15 de 10:1. A relação de IgG para IgM será bem menor no camundongo imaturo. Geralmente, mais do que cerca de 10%, preferivelmente 40 a 80% das células de baço e linfonodo B expressam exclusivamente proteína IgG humana.

O repertório irá se aproximar idealmente do mostrado em um camundongo não transgênico, geralmente pelo menos cerca de 10% tão

20 elevado, preferivelmente 25 a 50% ou mais. Geralmente, pelo menos cerca de mil diferentes imunoglobulinas (idealmente IgG), preferivelmente 10^4 a 10^6 ou mais, serão produzidas, dependendo primariamente do número de diferentes regiões V, J e D introduzidas no genoma do camundongo. Estas imunoglobulinas irão tipicamente reconhecer cerca de uma metade ou mais de

25 proteínas altamente antigênicas, por exemplo proteína A de estafilococo. Tipicamente, as imunoglobulinas irão demonstrar uma afinidade para antígenos pré-selecionados de pelo menos cerca de $10^7 M^{-1}$, preferivelmente pelo menos cerca de $10^9 M^{-1}$, mais preferivelmente pelo menos cerca de $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$, ou maior do que, por exemplo, até $10^{13} M^{-1}$ ou

maior.

Em algumas formas de realização, pode ser preferível gerar camundongos com repertórios predeterminados para limitar a seleção de genes V representados na resposta do anticorpo a um tipo de antígeno predeterminado. Um transgene de cadeia pesada tendo um repertório predeterminado pode compreender, por exemplo, genes VH humanos que são preferivelmente usados em respostas de anticorpo para o tipo de antígeno predeterminado em humanos. Alternativamente, alguns genes VH podem ser excluídos de um repertório definido por várias razões (por exemplo tem uma menor possibilidade de codificar regiões V de alta afinidade para o antígeno predeterminado; tem uma baixa propensão para sofrer mutação somática e definição precisa da afinidade, ou são imunogênicos para alguns humanos). Assim, antes do rearranjo de um transgene contendo vários segmentos de gene de cadeia pesada ou leve, estes segmentos de gene podem ser prontamente identificados, por exemplo, por hibridização ou seqüenciamento de DNA, como sendo de uma espécie de organismo diferente de um animal transgênico.

Os camundongos transgênicos da presente invenção, que podem ser imunizados da presente invenção, podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno EGFR e/ou células expressando EGFR como descrito previamente. Os camundongos irão produzir células B que sofrem mudança de classe via recombinação de mudança intra-transgene (cis-mudança) e expressam imunoglobulinas reativas com EGFR. As imunoglobulinas podem ser anticorpos de seqüência humana, em que os polipeptídeos de cadeia pesada e leve são codificados por seqüências de transgene humano, que podem incluir seqüências derivadas por mutação somática e juntas recombinatoriais de região V, assim como seqüências codificadas de linhagem germinal; estas imunoglobulinas de seqüência humana podem ser referidas como sendo substancialmente

idênticas a uma seqüência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene V_L ou V_H humano e um segmento J_L ou J_H humano, apesar de outras seqüências não de linhagem germinal poderem estar presentes como um resultado de mutação somática e juntas de recombinação V-J e V-D-J diferenciais. Com relação a estes anticorpos de seqüência humana, as regiões variáveis de cada cadeia são tipicamente pelo menos 80 por cento codificadas por seqüências de gene V, J e, no caso de cadeias pesadas, D, de linhagem germinal humana; com freqüência pelo menos 85 por cento das regiões variáveis são codificados por seqüências de linhagem germinal humana presentes no transgene, com freqüência 90 ou 95 por cento ou mais das seqüências de região variável são codificadas por seqüências de linhagem germinal humana presentes no transgene. No entanto, porque as seqüências não de linhagem germinal são introduzidas por mutação somática e união de VJ e VDJ, os anticorpos de seqüência humana irão ter, com freqüência, algumas seqüências de região variável (e com menor freqüência seqüências de região constante) que não são codificadas por segmentos de gene V, D ou J, humano, como encontrado no(s) transgene(s) humano na linhagem germinal do camundongo. Tipicamente, estas seqüências não de linhagem germinal (ou posições de nucleotídeo individuais) irão se agrupar em ou próximo dos CDRs, ou em regiões onde as mutações somáticas são conhecidas como se agrupando.

Os anticorpos de seqüência humana que ligam a um antígeno predeterminado podem resultar de mudança de isotipo, de modo que anticorpos humanos compreendendo uma cadeia γ de seqüência humana (como $\gamma 1$, $\gamma 2$ a, $\gamma 2B$, ou $\gamma 3$), e uma cadeia leve de seqüência humana (como K) são produzidos. Estes anticorpos de seqüência humana mudados com isotipo com freqüência contém uma ou mais mutação (s) somática(s), tipicamente na região variável e com freqüência em ou dentro de cerca de 10 resíduos de um CDR) como resultado de maturação com afinidade e seleção

de célula B por antígeno, particularmente subsequente a desafio com antígeno secundário (ou subsequente). Estes anticorpos de sequência humana de alta afinidade podem ter afinidades de ligação de pelo menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, tipicamente pelo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, frequentemente mais do que $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, e algumas vezes $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ maior.

Outro aspecto da invenção pertence a células B de tais camundongos que podem ser usadas para gerar hibridomas expressando anticorpos monoclonais humanos que ligam com alta afinidade (por exemplo, maior do que $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) para EGFR. Assim, em outra forma de realização da invenção, estes hibridomas são usados para gerar uma composição compreendendo uma imunoglobulina tendo uma constante de afinidade (K_A) de pelo menos $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ para ligar EGFR, em que referida imunoglobulina compreende:

uma cadeia leve de sequência humana composta de (1) uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de polipeptídeo que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene V_L humano e um segmento J_L humano, e (2) uma região constante de cadeia leve tendo uma sequência de polipeptídeo que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene C_L humano; e

uma cadeia pesada de sequência humana composta de (1) uma região variável de cadeia pesada, tendo uma sequência de polipeptídeo que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene V_H humano, opcionalmente uma região D, e um segmento J_H humano, e (2) uma região constante tendo uma sequência de polipeptídeo que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene C_H humano.

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos de alta afinidade contra EGFR é facilitado por um método para expansão do

18/8/20

repertório de segmentos de gene de região variável humana em um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene de imunoglobulina humano integrado, referido método compreendendo introduzir, no genoma, um transgene de gene V compreendendo os segmentos de gene de região V que não estão presentes no referido transgene de imunoglobulina humana integrado. Com freqüência, o transgene de região V é um cromossomo artificial de levedura compreendendo uma porção de uma rede de segmento de gene V_H ou V_L (V_K) humano, como podem ocorrer naturalmente em um genoma humano ou podem ser emendados juntos separadamente por métodos recombinantes, que podem incluir segmentos de gene V omitidos ou fora de ordem. Com freqüência, pelo menos cinco ou mais segmentos de gene V funcionais estão contidos no YAC. Nesta variação, é possível fazer um camundongo transgênico produzido pelo método de expansão de repertório V, em que o camundongo expressa uma cadeia de imunoglobulina compreendendo uma seqüência de região variável codificada por um segmento de gene de região V presente no transgene de região V e uma região C codificada no transgene Ig humano. Por meio de método de expansão de repertório V, os camundongos transgênicos tendo pelo menos 5 genes V distintos podem ser gerados, como podem os camundongos contendo pelo menos cerca de 24 genes V ou mais. Alguns segmentos de gene V podem ser não funcionais (por exemplo pseudogenes, e outros); estes segmentos podem ser retidos ou podem ser seletivamente deletados por métodos recombinantes disponíveis para o versado na técnica, se desejado.

Uma vez que a linhagem germinal de camundongo foi engenheirada para conter um YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido, substancialmente não presente no transgene Ig humano cont os segmentos de gene J e C, o traço pode ser propagado e criado em outros antecedentes genéticos, incluindo antecedentes onde o YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido é criado em uma

linhagem germinal de camundongo tendo um transgene Ig Humano diferente. Os YACs fracionais múltiplos tendo um repertório de segmento V expandido podem ser criados em uma linhagem germinal para trabalhar com um transgene Ig humano (ou transgenes Ig humanos múltiplos). Apesar de referidos aqui como transgenes YAC, estes transgenes quando integrados no genoma podem faltar substancialmente seqüências de levedura, como seqüências requeridas para replicação autônoma em levedura; estas seqüências podem opcionalmente ser removidas por engenharia genética (por exemplo digestão de restrição e eletroforese de gel de campo pulsado ou outro método apropriado) após replicação em levedura não é mais necessária (isto é, antes de introdução em uma célula ES de camundongo ou prozigoto de camundongo). Os métodos para propagar o traço de expressão de imunoglobulina de seqüência humana, incluem o cruzamento de um camundongo transgênico tendo o(s) transgene(s) Ig humano, e opcionalmente também tendo um YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido. Ambos os segmentos de gene V_H e V_L podem estar presentes no YAC. O camundongo transgênico pode ser cruzado em qualquer antecedente desejado pelo versado, incluindo antecedentes abrigando outros transgenes humanos, incluindo transgenes Ig humanos e/ou transgenes codificando outras proteínas de linfócitos humanos. A invenção também provê uma imunoglobulina de seqüência humana de alta afinidade produzida por um camundongo transgênico tendo um transgene YAC de 5 de repertório de região V expandida. Apesar do acima descrever uma forma de realização preferida do animal transgênico da invenção, outras formas de realização são contempladas que foram classificadas em quatro categorias:

I. animais transgênicos contendo um transgene de imunoglobulina de cadeia pesada não rearranjada e leve rearranjada;

II. animais transgênicos contendo um transgene de imunoglobulina de cadeia pesada não rearranjada e leve não rearranjada

III. animal transgênico contendo transgene de imunoglobulina de cadeia pesada rearranjada e leve não rearranjada e

IV. animais transgênicos contendo transgenes de imunoglobulina de cadeia pesada rearranjada e leve rearranjada.

5 Dentre estas categorias de animal transgênico, a ordem preferida de preferência é como a seguir $II > I > III > IV$, onde os genes de cadeia leve endógenos (ou pelo menos o gene k) foram abatidos por recombinação homóloga (ou outro método) e $I > II > III > IV$ onde os genes de cadeia leve endógenos não foram abatidos e devem ser dominados por exclusão alélica.

10 III. Moléculas biespecíficas e multi-específicas que ligam a EGFR

Em ainda outra forma de realização da invenção, os anticorpos monoclonais humanos para EGFR, ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, podem ser derivatizados ou ligados a outra molécula funcional, por exemplo outro peptídeo ou proteína (por exemplo um fragmento Fab') para 15 gerar uma molécula biespecífica ou multi-específica que liga a sítios de ligação múltiplos ou epítomos de marcação. Por exemplo, uma porção de ligação a antígeno ou anticorpo da invenção pode ser ligada funcionalmente (por exemplo por copulação química, fusão genética, associação não covalente ou outros), para uma ou mais de outras moléculas de ligação, como 20 outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas em multi-específicas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação para EGFR e uma segunda especificidade de ligação 25 para um segundo epítopo de marcação. Em uma forma de realização particular da invenção, o segundo epítopo de marcação é um receptor Fc, por exemplo Fc γ RI (CD64) ou um receptor de Fc α humano (CD89). Assim, a invenção inclui moléculas biespecíficas e multi-específicas capazes de ligar tanto Fc γ R, Fc α R ou Fc ϵ R expressando células efetadoras (por exemplo

monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) e para células de marcação expressando EGFR. Estas moléculas biespecíficas e multi-específicas marcam as células expressando para célula efetuada e, como os anticorpos monoclonais humanos da invenção, disparam as atividades de células efetuidoras mediadas por receptor Fc, como fagocitose de células expressando EGFR, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocinas, ou geração de ânion superóxido.

As moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção podem ainda incluir uma terceira especificidade de ligação, além de uma especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-EGFR. Em uma forma de realização, a terceira especificidade de ligação é uma porção de fator anti-melhora (EF), por exemplo uma molécula que liga a uma proteína de superfície envolvida em atividade citotóxica e, assim, aumenta a resposta imune contra a célula de marcação. A "porção de fator anti-melhora" pode ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligando que liga a uma dada molécula, por exemplo um antígeno ou um receptor, e assim resulta na melhora do efeito dos determinantes de ligação para o receptor Fc ou antígeno de célula de marcação. A "porção de fator anti-melhora" pode ligar a um receptor Fc ou um antígeno de célula de marcação. Alternativamente, a porção de fator anti-melhora pode ligar a uma entidade que é diferente da entidade em que a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção de fator anti-melhora pode ligar a uma célula T citotóxica (por exemplo, via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulta em uma resposta imune aumentada contra a célula de marcação).

Em uma forma de realização, as moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção compreendem, como uma especificidade de ligação, pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ou um Fv de cadeia única. O

anticorpo também pode ser um dímero de cadeia leve ou cadeia pesada, ou qualquer fragmento mínimo do mesmo como um fv ou uma construção de cadeia única, como descrito em Ladner *et al.* patente U.S. número 4.946.778, expedida em 7 de agosto de 1990, cujos conteúdos são aqui expressamente incorporados por referência.

Em uma forma de realização, as moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção compreendem uma especificidade de ligação para um Fc γ R ou um Fc α R presente na superfície de uma célula efetuidora, e uma segunda especificidade de ligação para um antígeno de célula de marcação, por exemplo EGFR.

Em uma forma de realização, a especificidade de ligação para um receptor de Fc é provida por um anticorpo monoclonal humano, cuja ligação não é bloqueada por imunoglobulina humana G (IgG). Como usado aqui, o termo "receptor de IgG" refere-se a qualquer um dos oito genes de cadeia γ localizados no cromossoma. Estes genes codificam um total de doze isoformas de receptor solúvel ou transmembrana que são agrupados em três classes de receptor de Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), e Fc γ RIII (CD16). Em uma forma de realização preferida, o receptor Fc γ é um Fc γ RI de alta afinidade humano. O Fc γ RI humano é uma molécula de 72 kDa, que mostra alta afinidade para IgG monomérico ($10^8 - 10^9 M^{-1}$).

A produção e caracterização destes anticorpos monoclonais preferidos são descritas por Fanger *et al.* no pedido PCT WO 88/00052 e na patente U.S. número 4.954.617, cujos conteúdos são aqui expressamente incorporados por referência. Estes anticorpos ligam a um epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII como um sítio que é distinto de sítio de ligação de Fc γ do receptor e, assim, sua ligação não é bloqueada substancialmente por níveis fisiológicos de IgG. Os anticorpos anti-Fc γ RI específicos utilizáveis na invenção são MAb 22, MAb 32, MAb 44, MAb 62 e MAb 197. O hibridoma produzindo Mab 32 é disponível de American Type Culture Collection,

acesso ATCC número HB9469. Anti-Fc γ RI MAb 22, fragmentos F(ab')₂ de MAb 22, e podem ser obtidos de Medarex, Inc. (Annandale, N.J.). Em outras formas de realização, o anticorpo receptor anti-Fc γ é uma forma humanizada de anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 são descritas em Graziano, R. F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996 - 5002 e PCT/US93/10384. A linhagem de célula produtora de anticorpo H22 foi depositada no American Type Culture Collection em 4 de novembro de 1992 sob a designação HA022CL1 e tem número de acesso CRL 11177.

Em ainda outras formas de realização preferidas, a especificidade de linhagem para um receptor Fc é provida por um anticorpo que liga a um receptor IgA humano, por exemplo um receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), cuja ligação é preferivelmente não bloqueada por imunoglobulina humana A (IgA). O termo "receptor de IgA" se destina a incluir o produto de gene de um gene α (Fc α RI) localizado no cromossomo 19. Este gene é conhecido para codificar várias isoformas de transmembrana alternativamente emendadas de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) é expresso de modo constitutivo em monócitos/ macrófagos, granulócitos eosinófilos e neutrófilos, mas não em populações de células não efetadoras. Fc α RI tem afinidade do meio ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) para ambos IgA1 e IgA2, que é aumentada quanto da exposição a citocinas como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H. C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16: 423 - 440). Quatro anticorpos monoclonais específicos para Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 e A77, que liga Fc α RI fora do domínio de ligação de ligando IgA, foram descritos (Monteiro, R. C. *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148: 1764).

Fc α RI e Fc γ RI são receptores de disparo preferidos para uso na invenção porque eles são (1) expressos primariamente em células efetadoras imunes, por exemplo monócitos, PMNs, macrófagos e células dendríticas; (2) expressados em altos níveis (por exemplo 5.000 - 100.000 por célula); (3) mediadores de atividades citotóxicas (por exemplo ADCC,

193

fagocitose); (4) mediam a apresentação de antígeno melhorada de antígenos, incluindo auto-antígenos, marcados para os mesmos.

Em outras formas de realização, as moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção ainda compreendem uma especificidade de
5 ligação que reconhece, por exemplo liga a um antígeno de célula de marcação, por exemplo EGFR. Em uma forma de realização preferida, a especificidade de ligação é provida por um anticorpo monoclonal humano da presente invenção.

Um "anticorpo específico para célula efetuidora", como usado
10 aqui, refere-se a um anticorpo ou fragmento de anticorpo funcional que liga o receptor Fc de células efetuidoras. Os anticorpos preferidos para uso na presente invenção ligam o receptor Fc de células efetuidoras em um sítio que não é ligado por imunoglobulina endógena.

Como usado aqui, o termo "célula efetuidora" refere-se a uma
15 célula imune que está envolvida na fase efetuidora de uma resposta imune, como oposta às fases cognitivas e de ativação de uma resposta imune. As células imunes de exemplo incluem uma célula de uma origem mielóide ou linfóide, por exemplo linfócitos (por exemplo células B e células T incluindo células T citolíticas (CTLs)), células exterminadoras, células exterminadoras
20 naturais, macrófagos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulócitos, mastóides, e basófilos. Algumas células efetuidoras expressam receptores de Fc específicos e transportam funções imunes específicas. Em formas de realização preferidas, uma célula efetuidora é capaz de induzir a citotoxicidade mediada por célula dependente
25 de anticorpo (ADCC), por exemplo, um neutrófilo capaz de induzir ADCC. Por exemplo, os monócitos, macrófagos, que expressam FcR estão envolvidos em morte específica de células de marcação e apresentando antígenos para outros componentes do sistema imune, ou ligação a células que apresentam antígenos. Em outras formas de realização, uma célula efetuidora pode

fagocitar um antígeno de marcação, célula de marcação ou microorganismo. A expressão de um FcR particular em uma célula efetadora pode ser regulada por fatores humorais como citocinas. Por exemplo, a expressão de Fc α RI foi verificada como sendo regulada por gama interferon (IFN- γ). Esta expressão aumentada aumenta a atividade citotóxica de células contendo Fc α RI contra as marcações. Uma célula efetadora pode fagocitar ou lisar um antígeno de marcação ou célula de marcação.

"Célula de marcação" deve significar qualquer célula indesejável em um indivíduo (por exemplo um humano ou animal) que pode ser marcado por uma composição (por exemplo um anticorpo monoclonal humano, uma molécula biespecífica ou multi-específica) da invenção. Em formas de realização preferidas, a célula de marcação é uma célula expressando ou super-expressando EGFR. As células expressando EGFR tipicamente incluem células de tumor, como de bexiga, mama, cólon, rim, ovário, próstata, célula renal, célula escamosa, pulmão (não célula pequena), e célula de tumor da cabeça e pescoço. Outras células expressando EGFR incluem células fibroblastos sinoviais e queratinócitos que podem ser usados com marcações no tratamento de artrite e psoríase, respectivamente.

Apesar de anticorpos monoclonais humanos serem preferidos, outros anticorpos que podem ser empregados nas moléculas biespecíficas ou multi-específicas da invenção são de anticorpos monoclonais murinos, quiméricos e humanizados.

Os anticorpos monoclonais camundongo-humano quiméricos (isto é, anticorpos quiméricos) podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante conhecidas na técnica. Por exemplo, um gene codificando a região constante Fc de uma molécula de anticorpo monoclonal de murino (ou outra espécie) é digerido com enzima de restrição para remover a região codificando Fc murino, e a porção equivalente de um gene codificando uma região constante Fc humana é substituída. (ver Robinson *et al.*, publicação da

patente internacional PCT/US86/02269; Akira, *et al.*, pedido de patente europeia número 184.187; Taniguchi, pedido de patente europeia M., 171.496; Morrison *et al.*, pedido de patente europeia número 173.494; Neuberger *et al.*, pedido internacional WO 86/01533; Cabilly *et al.* patente U.S. número 4.816.567; Cabilly *et al.*, pedido de patente europeia número 125.023; Better *et al.* (1988 *Science* 240: 1041 - 1043); Liu *et al.* (1987) PNAS 84: 3439 - 3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139: 3521 - 3526; Sun *et al.* (1987) PNAS 84: 214 - 218; Nishimura *et al.*, 1987, *Canc. Res.* 47: 999 - 1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446 - 449; e Shaw *et al.*, 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80: 1553 - 1559).

O anticorpo quimérico pode ser ainda humanizado por substituição de seqüências de região variável de Fv que não estão diretamente envolvidas em ligação de antígeno com seqüências equivalentes de regiões variáveis de Fv humano. Estudos gerais de anticorpos quiméricos humanizados são providos por Morrison, S. L., 1985, *Science* 229: 1202 - 1207 e por Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4: 214. Estes métodos incluem isolamento, manipulação e expressão de seqüências de ácido nucleico que codificam toda ou parte das regiões variáveis de Fv de imunoglobulina de, pelo menos, uma dentre cadeia pesada e leve. As fontes deste ácido nucleico são bem conhecidas na técnica e, por exemplo, podem ser obtidas de hibridoma produzindo um anticorpo anti-GPII_bIII_a. O DNA recombinante codificando o anticorpo quimérico, ou fragmento do mesmo, pode ser então clonado em um vetor de expressão apropriado. Os anticorpos humanizados apropriados podem ser alternativamente produzidos por substituição de CDR; patente U.S. número 5.225.539; Jones *et al.* 1986 *Nature* 321: 552 - 525; Verhoeyan *et al.* 1988 *Science* 239: 1534; e Beidler *et al.* 1988 *J. Immunol.* 141: 4053 - 4060.

Todos os CDRs de um anticorpo humano particular podem ser substituídos com pelo menos uma porção de um CDR não humano ou

somente um dos CDRs pode ser substituído com CDRs não humanos. É apenas necessário substituir o número de CDRs requeridos para ligação do anticorpo humanizado ao receptor Fc.

Um anticorpo pode ser humanizado por qualquer método, que é capaz de substituir pelo menos uma porção de um CDR de um anticorpo humano com um CDR derivado de um anticorpo não humano. Winter descreve um método que pode ser usado para preparar os anticorpos humanizados da presente invenção (pedido de patente UK GB 2188638A, depositado em 26 de março de 1987), cujos conteúdos são aqui expressamente incorporados por referência. Os CDRs humanos podem ser substituídos com CDRs não humanos usando metagênese dirigida ao sítio de oligonucleotídeos como descrito no pedido internacional WO 94/10332 intitulado, *Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes*.

Também está no escopo da invenção os anticorpos quiméricos e humanizados em que aminoácidos específicos foram substituídos, deletados ou adicionados. Particularmente, os anticorpos humanizados preferidos tem substituições de aminoácido na região de armação, como para melhorar a ligação ao antígeno. Por exemplo, em um anticorpo humanizado tendo CDRs de camundongo, os aminoácidos localizados na região de armação humana podem ser substituídos com os aminoácidos localizados nas posições correspondentes no anticorpo de camundongo. Estas substituições são conhecidas como melhorando a ligação de anticorpos humanizados ao antígeno em alguns casos. Os anticorpos em que os aminoácidos foram adicionados, deletados ou substituídos são referidos aqui como anticorpos modificados ou anticorpos alterados.

O termo anticorpo modificado é também destinado a incluir anticorpos, como anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, e anticorpos humanizados, que foram modificados por, por exemplo, porções de deleção,

adição ou substituição do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo pode ser modificado por deleção da região constante e a sua substituição com uma região constante significa aumentar a meia-vida, por exemplo, meia-vida do soro, estabilidade ou afinidade do anticorpo. Qualquer modificação está dentro do escopo da invenção, desde que a molécula biespecífica e multi-específica tenha, pelo menos, uma região de ligação ao antígeno específica para um Fc α RI e dispere, pelo menos, uma função efetuadora.

As moléculas biespecíficas e multi-específicas da presente invenção podem ser feitas usando técnicas químicas (ver por exemplo, D. M. Kranz *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5807), técnicas “polidoma” (ver patente U.S. número 4.474.893, para leitura), ou técnicas de DNA recombinantes.

Em particular, as moléculas biespecíficas e multi-específicas da presente invenção podem ser preparadas por conjugação das especificidades de ligação constituintes, por exemplo as especificidades de ligação anti-FcR e anti-EGFR, usando métodos conhecidos na técnica e descritas nos exemplos aqui providos. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica e multi-específica pode ser gerada separadamente e então conjugada uma na outra. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou peptídeos, vários agentes de copulação ou reticulação por ser usados para conjugação covalente. Os exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'- ditiobis (2- ácido nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil -3-(2- piridilditio) propionato (SPDP), e sulfosuccinimidil 4- (N- maleimido-metil) ciclo-hexano-2-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver por exemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8648). Outros métodos incluem os descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) número 78, 118 - 132); Brennan *et al.* (Science (1985) 229: 81 - 83), e

mg

Glennie *et al.* (J. Immunol. (1987) 139: 2367 - 2375). Os agentes de conjugação preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação são anticorpos (por exemplo dois anticorpos humanizados), elas podem ser conjugadas via ligação de sulfidrina das regiões de gancho C-término das duas cadeias pesadas. Em uma forma de realização particularmente preferida, a região de gancho é modificada para conter um número ímpar de resíduos sulfidrina, preferivelmente um, antes da conjugação.

Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressadas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente utilizável onde a molécula biespecífica e multi-específica é uma proteína de fusão MAb x MAb, MAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligando x Fab. Uma molécula biespecífica e multi-específica da invenção, por exemplo uma molécula biespecífica pode ser uma molécula de cadeia única, como um anticorpo biespecífico de cadeia única, uma molécula biespecífica de cadeia única, compreendendo um anticorpo de cadeia única e um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia única compreendendo dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas e multi-específicas também podem ser moléculas de cadeia única ou podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Os métodos para preparar moléculas bi- e multi-específicas são descritos por exemplo na patente U.S. número 5.260.203; patente U.S. número 5.455.030; patente U.S. número 4.881.175; patente U.S. número 5.132.405; patente U.S. número 5.091.513; patente U.S. número 5.476.786; patente U.S. número 5.013.653; patente U.S. número 5.258.498; e patente U.S. número 5.482.858.

A ligação de moléculas biespecíficas e multi-específicas para suas marcações específicas pode ser confirmada por teste imunossorvente ligado a enzima (ELISA), um radio-imunoteste (RIA), análise FACS, um

bioteste (por exemplo inibição de crescimento) ou um teste de Western blot. Cada um destes testes geralmente detecta a presença de complexos proteína-anticorpo de interesse particular por emprego de um reagente rotulado (por exemplo um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo,

5 complexos FcR- anticorpo podem ser detectados usando, por exemplo, anticorpo ligado a enzima ou fragmento de anticorpo que reconhece e especificamente liga aos complexos anticorpo- FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados usando vários outros imunotestes, por exemplo, o anticorpo pode ser rotulado de modo radioativo e usado em um

10 radio-imunoteste (RIA), (ver, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Teste Techniques, The Endocrine Society, março de 1986, que é incorporado aqui por referência). O isótopo radioativo pode ser detectado por tal meio como o uso de um contador γ ou um contador de cintilação ou por auto-radiografia.

15 IV. Conjugados de anticorpo / imunotoxinas

Em outro aspecto, a presente invenção apresenta um anticorpo monoclonal anti-EGFR humano, ou fragmento do mesmo, conjugado a uma porção terapêutica, como uma citotoxina, uma droga ou radioisótopo. Quando conjugado a uma citotoxina, estes conjugados de anticorpo são referidos

20 como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial a células (por exemplo exterminadoras). Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídeo, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidróxi antracina diona, mitoxantrona,

25 mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Os agentes terapêuticos incluem, mas não são limitados a antimetabólitos (por exemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por



exemplo mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU), e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos, por exemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (por exemplo vincristina e vinblastina). Um anticorpo da presente invenção pode ser conjugado a um radioisótopo, por exemplo iodo radioativo, para gerar radio-farmacêuticos citotóxicos para o tratamento de distúrbio relacionado com EGFR, como um câncer.

Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica, e a porção de droga não deve ser construída como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de droga pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Estas proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou fragmento ativo da mesma, como abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas, ou toxina de difteria, uma proteína como fator de necrose de tumor ou interferon γ , ou modificadores de resposta biológica como, por exemplo, linfocinas, interleucina -1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina -6 ("IL-6"), fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônia de granulócitos ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

As técnicas para conjugar esta porção terapêutica para anticorpos são bem conhecidas, ver, por exemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drogas In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (segunda edição), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers



Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475 - 506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982).

V. Composições farmacêuticas

10 Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais humanos, ou porção(ões) de ligação a antígeno do mesmo, da presente invenção, formulada junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma forma de realização preferida, as
15 composições incluem uma combinação de anticorpos humanos isolados, múltiplos (por exemplo dois ou mais) ou porções de ligação a antígeno dos mesmos da invenção. Preferivelmente, cada um dos anticorpos ou porções de ligação a antígeno da composição liga a um epítipo pré-selecionado, distinto, de EGFR.

20 Em uma forma de realização, os anticorpos monoclonais anti-EGFR humanos tendo atividades complementares são usados em combinação, por exemplo como uma composição farmacêutica, compreendendo dois ou mais anticorpos monoclonais anti-EGFR humanos. Por exemplo, um anticorpo monoclonal humano que media a morte altamente efetiva de células
25 de marcação na presença de células efetuatoras pode ser combinado com outro anticorpo monoclonal humano que inibe o crescimento de células expressando EGFR.

Em outra forma de realização, a composição compreende uma ou uma combinação de moléculas biespecíficas ou multi-específicas da

invenção (por exemplo que contém pelo menos uma especificidade de ligação para um receptor de Fc e pelo menos uma especificidade de ligação para EGFR).

5 As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é combinados com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição da presente invenção com, pelo menos, um agente anti-tumor ou outra terapia convencional.

10 Como usado aqui, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes anti-bacterianos e antifúngicos, agentes de retardo de absorção e isotônicos, e outros, que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o veículo é apropriado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo por injeção ou 15 infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, molécula biespecífica e multi-específica, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

20 Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parental e não prejudica quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (ver, por exemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1 - 19). Exemplos destes sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem os derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, como clorídrico, nítrico, 25 fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e outros, assim como de ácidos orgânicos não tóxicos como ácidos mono- e dicarboxílicos e alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos com fenila, ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e outros. Os sais de adição de base incluem os derivados de metais alcalino-terrosos como sódio,

potássio, magnésio, cálcio e outros, assim como de aminas orgânicas não tóxicas, como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e outros.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será notado pelo versado, a via e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados. Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que irão proteger o composto contra rápida liberação, como formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, podem ser usados, como etileno acetato de vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação destas formulações são patenteados ou geralmente bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Para administrar um composto da invenção por algumas vias de administração, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com um material para evitar sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um indivíduo em um veículo apropriado, por exemplo lipossomas, ou um diluente. Os diluentes farmacologicamente aceitáveis incluem solução salina e soluções de tampão aquoso. Os lipossomas incluem emulsões de CGF em água-em-óleo-em-água assim como lipossomas convencionais (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7: 27).

Os veículos farmacologicamente aceitáveis incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de solução estéril injetável ou dispersão. O uso destes meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é bem conhecidos na técnica. Exceto

quando qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o composto ativo, uso do mesmo nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

5 As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis ou estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada apropriada para uma alta concentração da droga. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e outros), e misturas apropriadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser feita por inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais monoestearato e gelatina.

20 As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação de composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com uma ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido por microfiltração com esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básica e os outros ingredientes requeridos dos enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que dão um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução filtrada estéril previamente do mesmo.

Os regimes de dosagem são ajustados para prover a resposta desejada ótima (por exemplo uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma unitária de dosagem, como usado aqui, refere-se a unidades fisicamente discretas apropriadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção é ditada por e diretamente dependente de (a) as características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser obtidos, e (b) as limitações inerentes na técnica de composição como um composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e outros; (2) antioxidantes solúveis em óleo, como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol, e outros; e (3) agentes quelantes de metal, como ácido cítrico, ácido tetraacético de etilenodiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e outros.

Para as composições terapêuticas, as formulações da presente invenção incluem as apropriadas para administração oral, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou administração parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem

unitária e podem ser preparadas por métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material veículo para produzir uma forma de dosagem unitária irá variar dependendo do indivíduo sendo tratado, e o modo de administração particular.

- 5 A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material veículo para produzir uma forma de dosagem unitária irá geralmente ser a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. geralmente, dentre cem por cento, esta quantidade estará na faixa de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo,
- 10 preferivelmente de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento.

- As formulações da presente invenção que são apropriadas para administração vaginal também incluem emplastos, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de pulverização contendo os veículos como bem conhecidos na técnica como apropriados. As formas de dosagem para a
- 15 administração tópica ou transdérmica de composições da invenção incluem pós, pulverizadores, ungüentos, pastas, cremes, loções, géis, soluções, adesivos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um veículo farmacêuticamente aceitável, e com quaisquer
- 20 conservantes, tampões, ou propelentes, que podem ser requeridos.

- As frases "administração parenteral" e "administrado parenteralmente", como usadas aqui, significam modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção intravenosa, intramuscular, intraarterial,
- 25 intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide, intraespinal, epidural e intraesternal e infusão.

Exemplos de veículos aquosos e não aquosos apropriados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem

água, etanol, polióis (como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e outros), e misturas apropriadas dos mesmos, óleos vegetais, como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Estas composições também podem conter adjuvantes como conservantes, agentes umectantes, e dispersantes. A prevenção da presença de microorganismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra, como pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, e outros. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, como açúcares, cloreto de sódio, e outros na composição. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser feita pela inclusão de agentes que retardam a absorção como monoestearato de alumínio e gelatina.

Quando os compostos da presente invenção são administrados como fármacos, para humanos e animais, eles podem ser dados sozinhos ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,01 a 99,5% (mais preferivelmente, 0,1 a 90%) de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Sem levar em conta a via de administração selecionada, os compostos da presente invenção que podem ser usados em uma forma hidratada apropriada, e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção, são formulados em formas de dosagem farmacêuticamente aceitáveis por métodos convencionais bem conhecidos na técnica.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade de ingrediente ativo que é efetiva para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente em particular, composição e

modo de administração, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado irá depender de vários fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, ou o éster, sal ou amida das mesmas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular sendo empregado, a duração do tratamento, outras drogas, componentes e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente sendo tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos na técnica médica.

10 Um médico ou veterinário tendo conhecimento na técnica pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica requerida, Por exemplo, o médico ou veterinário deve iniciar doses dos compostos da invenção empregados na composição farmacêutica em níveis menores do que requerido a fim de obter o efeito terapêutico

15 desejado e gradualmente aumentar a dosagem até o efeito ser obtido. geralmente, uma dose diária apropriada das composições da invenção será a quantidade do composto que é a menor dose efetiva para produzir um efeito terapêutico. Esta dose efetiva irá geralmente depender de fatores descritos acima. Prefere-se que a administração seja intravenosa, intramuscular,

20 intraperitoneal ou subcutânea, preferivelmente administrada próxima ao sítio de marcação. Se desejado, a dose diária efetiva de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas, três, quatro, cinco, seis ou mais sub-doses administradas separadamente em intervalos aproximados durante o dia, opcionalmente em formas de dosagem unitária. Apesar de ser possível

25 para um composto da presente invenção ser administrado sozinho, é preferível administrar o composto como uma formulação farmacêutica (composição).

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma forma de realização preferida, uma composição terapêutica da invenção pode ser



administrada com um dispositivo de injeção hipodérmico sem agulha, como os dispositivos descritos em patentes U.S. números 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes bem conhecidos na técnica e módulos utilizáveis na presente invenção incluem Patente U.S. número 4.487.603, que descreve uma bomba de micro-infusão implantável para distribuir medicamento em uma taxa controlada; patente U.S. número 4 486 194 que descreve um dispositivo terapêutico para a administração de medicamentos através da pele, patente U.S. número 4.447.233, que descreve uma bomba de infusão de medicamento para liberar remédio em uma taxa de infusão precisa, patente US 4 447 224 que descreve um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação de droga contínua; patente U.S. número 4.439.196, que descreve um sistema de liberação de droga osmótica tendo compartimentos de múltiplas câmaras, e patente U.S. número 4.475.196, que descreve um sistema de liberação de droga osmótico. Estas patentes são incorporadas aqui por referência. Muitos outros destes implantes, sistemas de liberação e módulos são conhecidos dos versados na técnica.

Em algumas formas de realização, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para assegurar uma distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira sangue-cérebro (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção cruzam a BBB, (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Os métodos para fabricar lipossomas incluem, por exemplo, patentes U.S. números 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou outras porções que são seletivamente transportadas em células ou órgãos específicos, assim melhoram a liberação de drogas marcadas (ver, por exemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). As porções de marcação exemplares incluem folato ou biotina (ver, por exemplo, patente U.S. número

5.416.016 para Low *et al.*); manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticorpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína de tensoativo A (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134), espécies diferentes das mesmas compreendem as formulações da invenção, assim como componentes das moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); ver também K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273. Em uma forma de realização da invenção, os compostos terapêuticos da invenção são formulados em lipossomas; em uma forma de realização mais preferida, os lipossomas incluem uma porção de marcação. Em uma forma de realização mais preferida, os compostos terapêuticos nos lipossomas são liberados por injeção de bolo em um sítio proximal ao tumor ou infecção. A composição deve ser fluída na extensão de proporcionar fácil aplicação da injeção. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser conservada contra a ação contaminante de microorganismos como bactérias e fungos.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" preferivelmente inibe o crescimento de tumor em pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 40%, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% com relação a indivíduos não tratados. A capacidade de uma composição para inibir câncer pode ser avaliada em um sistema de modelo animal que prevê eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada por exame da capacidade do composto de inibir, esta inibição *in vitro* por testes bem conhecidos pelos versados. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor ou de outra forma melhorar os sintomas em um indivíduo. Um



versado na técnica deve ser capaz de determinar estas quantidades com base em fatores como o tamanho do indivíduo, a severidade dos sintomas do indivíduo, e a composição particular ou via de administração selecionada.

5 A composição deve ser estéril e fluida na extensão de que a composição é distribuída por seringa. Além de água, o veículo pode ser uma solução salina tamponada isotônica, etanol, poliol (por exemplo glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido e outros) e misturas apropriadas. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de revestimento como lecitina, por exemplo manutenção do tamanho de partícula requerido no 10 caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, é preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois como manitol ou sorbitol, e cloreto de sódio na composição. A absorção a longo prazo das composições injetáveis pode ser obtida por inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou 15 gelatina.

Quando o composto ativo é apropriadamente protegido, como descrito acima, o composto pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável.

VI. Usos e métodos da invenção

20 As composições (por exemplo anticorpos monoclonais humanos para EGFR e derivados/ conjugados dos mesmos) da presente invenção tem utilidades terapêuticas e diagnósticas *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas a células em cultura, por exemplo *in vitro* ou *ex vivo*, ou em um indivíduo, por exemplo *in vivo*, para 25 tratar, prevenir ou diagnosticar várias distúrbios. Como usado aqui, o termo "indivíduo" destina-se a incluir animais humanos e não humanos. Os animais humanos preferidos incluem um paciente humano tendo um distúrbio caracterizado por expressão, tipicamente expressão aberrante (por exemplo super-expressão) de EGFR. Por exemplo, os métodos e composições da

presente invenção podem ser usados para tratar um indivíduo com distúrbio tumorigênico, por exemplo um distúrbio caracterizado pela presença de célula de tumor expressando EGFR incluindo, por exemplo células de bexiga, mama, cólon, rim, ovário, próstata, célula renal, célula escamosa, pulmão (não de célula pequena) e célula de tumor de cabeça e pescoço. Os métodos e composições da presente invenção também podem ser usados para tratar outros distúrbios, por exemplo doenças autoimunes, câncer, psoríase, ou artrite inflamatória, por exemplo artrite reumatóide, artrite associada com lupus eritematoso sistêmico, ou artrite psoriática. O termo "animais não humanos" da invenção incluem todos os vertebrados, por exemplo mamíferos e não mamíferos, como primatas não humanos, ovelha, cães, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

As composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas multi-específicas e biespecíficas) da invenção podem ser inicialmente testados para atividade de ligação associada com uso terapêutico ou diagnóstico *in vitro*. Por exemplo, composições da invenção podem ser testadas usando o ELISA e testes citometria de fluxo descritos no exemplo abaixo. Além disso, a atividade destas moléculas para disparar pelo menos uma atividade de célula efetuada mediada por efetuator, incluindo citólise de células expressando EGFR pode ser testada. Os protocolos para testar a fagocitose mediada por célula efetuada são descritos nos exemplos abaixo.

As composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas multi-específicas e biespecíficas) da invenção tem utilidade adicional na terapia e diagnóstico de doenças relacionadas com EGFR. Por exemplo, os anticorpos monoclonais humanos, as moléculas multi-específicas ou biespecíficas podem ser usadas, por exemplo, para elicitar *in vivo* ou *in vitro* uma ou mais das seguintes atividades biológicas: para opsonizar uma célula expressando EGFR; para mediar fagocitose ou citólise de uma célula expressando EGFR na presença de células efetuidoras humanas, para inibir

autofosforilação induzida por EGF ou TGF- α em uma célula expressando EGFR; para inibir ativação induzida por EGF ou TGF- α de autócrina de uma célula expressando EGFR; ou para inibir o crescimento de uma célula expressando EGFR, por exemplo em baixas dosagens.

5 Em outra forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos da presente invenção são incapazes de induzir lise mediada por complemento de células e, assim, tem menores efeitos laterais para disparar doenças ativadas por complemento, por exemplo acne. A causa primária de acne é uma alteração no padrão de queratinização dentro do folículo para
10 produzir sebo. Porque os queratinócitos expressam EGFR, a interferência com processos de sinalização de EGFR na pele podem alterar o crescimento e diferenciação dos queratinócitos nos folículos que resulta na formação de acne. Os estudos imunofluorescentes diretos demonstraram que em lesões de acne não inflamadas e inflamadas prematuras ocorre ativação das vias
15 complementares clássicas e alternativas.

 Em uma forma de realização particular, os anticorpos humanos e derivados dos mesmos são usados in vivo para tratar, evitar ou diagnosticar uma variedade de doenças relacionadas com EGFR. Os exemplos de doenças relacionadas com EGFR incluem vários cânceres como de bexiga, mama,
20 cólon, rim, ovário, próstata, célula renal, célula escamosa, pulmão (não de célula pequena) e de cabeça e pescoço. Outras doenças relacionadas com EGFR incluem, dentre outras, doenças autoimunes, psoríase, e artrite inflamatória.

 Os métodos de administração das composições (por exemplo
25 anticorpos humanos, moléculas multi-específicas e biespecíficas) da invenção são bem conhecidos na técnica. As dosagens apropriadas de moléculas usadas irão depender da idade e peso do indivíduo e a droga particular usada. As moléculas podem ser copuladas a radionuclídeos, como ^{131}I , ^{90}Y , ^{105}Rh , etc., como descrito em Goldenberg, D. M. *et al.* (1981) Cancer Res. 41: 4354

- 4360, e em EP 0365 997. As composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multi-específicas e biespecíficas) da invenção podem ser copuladas a agentes anti-infecciosos.

Em outra forma de realização, os anticorpos anti-EGFR humanos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, podem ser co-administrados com um agente terapêutico, por exemplo um agente quimioterapêutico, ou podem ser co-administrados com outras terapias conhecidas, por exemplo uma terapia anti-câncer, por exemplo radiação. Estes agentes terapêuticos incluem, dentre outros, agentes anti-neoplásicos, como doxorubicina (adriamicina), bleomicina sulfato de cisplatina, carmustina, clorambucil, e ciclofosfamida hidroxauréia, que, sozinhos, são apenas efetivos em níveis que são tóxicos ou sub-tóxicos para um paciente. Cisplatina é administrada intravenosamente como uma dose única de 100 mg/m^2 uma vez a cada quatro semanas e adriamicina é administrada intravenosamente como uma dose única de $60\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ a cada 21 dias. A co-administração de anticorpos anti-EGFR humanos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, da presente invenção, com agentes quimioterapêuticos provê dois agentes anti-câncer que operam via mecanismos diferentes que dão um efeito citotóxico para células de tumor humano. Estas co-administração pode resolver problemas devido ao desenvolvimento de resistência a drogas ou uma mudança na antigenicidade de células de tumor que as devem tornar não reativas com o anticorpo.

As células efetadoras específicas para marcação, por exemplo células efetadoras ligadas a composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção podem ser também usadas como agentes terapêuticos. As células efetadoras para marcação podem ser leucócitos humanos, como macrófagos, neutrófilos ou monócitos. Outras células incluem eosinófilos, células exterminadoras naturais, e outras células contendo receptor IgG ou IgA. Se desejado, as células efetadoras

podem ser obtidas do indivíduo a ser tratado. As células efetadoras específicas para marcação, podem ser administradas como uma suspensão de células em uma solução fisiologicamente aceitável. O número de células administrada pode ser da ordem de 10^8 - 10^9 , mas irá variar dependendo do fim terapêutico. geralmente, a quantidade será suficiente para obter localização na célula de marcação, por exemplo uma célula de tumor expressando EGFR, e para efetuar a morte da célula, por exemplo, por fagocitose. As vias de administração também podem variar.

A terapia com células efetadoras específicas para marcação pode ser realizada em conjunto com outras técnicas para remoção de células marcadas. Por exemplo, terapia anti-tumor usando as composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção e/ou células efetadoras armadas com estas composições podem ser usadas em conjunto com quimioterapia. Além disso, a imunoterapia de combinação pode ser usada para dirigir duas populações distintas de efetador citotóxico para a rejeição de célula de tumor. Por exemplo, anticorpos anti-EGFR ligados a anti-Fc-gamaRI ou anti-CD3 podem ser usados em conjunto com agentes de ligação específicos para receptor IgG ou IgA.

As moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção também podem ser usadas para modular os níveis de Fc γ R ou Fc α R em células efetadoras, como por terminação e eliminação de receptores na superfície da célula. As misturas de receptores anti-Fc também podem ser usadas para este fim.

As composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção que tem sítios de ligação complementares como porções de IgG1, -2 ou 3- ou IgM que ligam complemento, também podem ser usadas na presença de complemento. Em uma forma de realização, o tratamento *ex vivo* de uma população de células

compreendendo células de marcação com um agente de ligação da invenção e células efetadoras apropriadas podem ser suplementados pela ad de um complemento ou complemento contendo soro. A fagocitose de células de marcação revestidas com um agente de ligação da invenção pode ser

5 melhorada por ligação de proteínas complementos. Em outra forma de realização, as células de marcação revestidas com as composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção também podem ser lisados por complemento. Em ainda outra forma de realização, as composições da invenção não ativam o complemento.

10 As composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção também podem ser administradas junto com complemento. conseqüentemente, no escopo da invenção, as composições compreendendo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas e soro e complemento. Estas composições

15 são vantajosas em que o complemento está localizado em proximidade íntima com os anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas. Alternativamente,, os anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas da invenção e o complemento ou soro pode ser administrado em separado.

20 Também está dentro do escopo da invenção os kits compreendendo as composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção e instruções para uso. O kit pode ainda conter pelo menos um reagente adicional, como complemento, ou um ou mais anticorpos humanos adicionais da invenção (por exemplo um

25 anticorpo humano tendo uma atividade complementar que liga a um epítopo em antígeno EGFR distinto de primeiro anticorpo humano).

Em outras formas de realização, o indivíduo pode ser adicionalmente tratado com um agente que modula, por exemplo melhora ou inibe, a expressão ou atividade de receptores $Fc\ \gamma$ ou $Fc\ \alpha$ por exemplo por

tratamento do indivíduo com uma citocina. As citocinas preferidas para administração durante o tratamento com a molécula multi-específica incluem fator estimulante de colônia de granulócitos ("G-CSF"), fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos ("GM-CSF"), interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose de tumor (TNF).

Em outra forma de realização, o indivíduo pode ser adicionalmente tratado com uma preparação de linfocinas. As células de câncer que não expressam altamente EGFR podem ser induzidas a fazer isto usando preparações de linfocinas. As preparações de linfocinas podem provocar uma expressão mais homogênea de EGFRs dentre as células de um tumor que podem levar a uma terapia mais efetiva. As preparações de linfocinas apropriadas para administração incluem interferon-gama, fator de necrose de tumor, e combinações dos mesmos. Estes podem ser administrados intravenosamente. As dosagens apropriadas de linfocina são de 10.000 a 1.000.000 unidades/ paciente.

As composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção também podem ser usadas para marcar células expressando Fc γ R, e EGFR, por exemplo para rotular estas células. Para este uso, o agente de ligação pode ser ligado a uma molécula que pode ser detectada. Assim, a invenção provê métodos para localizar células *ex vivo* ou *in vitro* expressando receptores de Fc, como FC γ R ou EGFR. O rótulo detectável pode ser, por exemplo, um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator de enzima.

Em uma forma de realização, a invenção provê métodos para detectar a presença de antígeno EGFR em uma amostra, ou medindo a quantidade de antígeno EGFR, compreendendo contatar a amostra, e uma amostra de controle, com um anticorpo monoclonal humano, ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo, que especificamente liga a EGFR, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou

porção do mesmo e EGFR. A formação de um complexo é então detectada em que a formação de um complexo diferente entre a amostra comparada com a amostra de controle é indicativo da presença de antígeno EGFR na amostra.

5 Em ainda outra forma de realização, a invenção provê um método para detectar a presença ou quantificação da quantidade de células expressando Fc *in vivo* ou *in vitro*. O método compreende (i) a administração a um indivíduo de uma composição (por exemplo moléculas biespecíficas e multi-específicas) da invenção ou um fragmento da mesma, conjugada a um marcador detectável; (ii) expor o indivíduo a um meio para detectar o referido
10 marcador detectável para identificar áreas contendo células expressando Fc.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser construídos como ainda limitativos. Os conteúdos de todas as Figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados no pedido são expressamente incorporados por
15 referência.

EXEMPLOS

Materiais e métodos

Antígeno : camundongos transgênicos foram imunizados com a linhagem de célula de carcinoma epidermóide A431 (CRL-1555, lote 203945, ATCC Manassas, Virginia) e com receptor do fator de crescimento epidérmico solúvel (EGFR) obtido de Sigma Chemical Co (produto E 3641 lote 109H4108 e 20K4079). EGFR solúvel foi armazenado a -20 ° a -80° C até
20 uso.

Formulações de meio: (A) DMEM com elevado teor de glucose (Mediatech Cellgro # 10013) contendo 10% de FBS, penicilina-estreptomicina (Sigma P-7539), e 2-mercaptoetanol (GibcoBRL 21985-023) foi usado para cultivar células A431 e células de mieloma. Suplementos adicionais foram adicionados ao meio de crescimento de hibridoma que incluía: fator de clonagem de hibridoma de origem (Igen 21001), suplemento
25

OPI (Sigma O-5003), HAT ou HT (Sigma H 0262, H 0137). (B) meio sem soro contém DMEM, antibióticos e 2-mercaptoetanol apenas.

Células para imunização: as células para imunização foram cultivadas em DMEM (ver acima) para confluência em frascos de cultura de célula T-75 e foram coletadas com EDTA tripsina (Cellgrow, catálogo 25-053-CI) em solução 5-10 ml por frasco. As células recuperadas de frascos foram recolocadas em suspensão em 50 ml de meio completo e então lavadas por três ciclos de centrifugação (1000 G) e recolocadas em suspensão em 50 ml de PBS estéril. Os camundongos foram injetados com 1×10^7 células em suspensão em 0,5 ml de PBS estéril.

EGFR: EGFR solúvel foi misturado com adjuvante Ribi (Sigma, M 6536) em PBS estéril a uma concentração de 25 μg EGFR / 100 μl . As imunizações da veia de cauda finais foram realizadas com EGFR solúvel em PBS estéril.

Camundongos transgênicos: os camundongos foram alojados em gaiolas com filtro e avaliados como em boa condição física na data da fusão. Os camundongos que produziram os hibridomas selecionados eram machos com 6-8 semanas de idade do genótipo (CMD)⁺⁺; (HCo7) 11952 +; (JKD) ++; (KCo5) 9272 + (ver tabela 1).

Tabela 1

Dados * de Genótipo						
Camundongo	Sexo	Nascido em	Genótipo			
20241	Macho	21/9/99	CMD++	(HCo7) 11952 +	(JKD) ++	(KCo5) 9272
20242	Macho	21/9/99	CMD++	(HCo7) 11952 +	(JKD) ++	(KCo5) 9272
20243	Macho	21/9/99	CMD++	(HCo7) 11952 +	(JKD) ++	(KCo5) 9272

* Designações de transgênico individual estão em parêntese, seguido por números de linha para transgenes integrados aleatoriamente. Os símbolos ++ e + indicam homozigóticos e hemizigóticos; no entanto, porque os camundongos foram triados como rotina usando teste à base de PCR, que não permite distinguir entre heterozigosidade e homozigosidade para os transgenes Ig humanos integrados aleatoriamente, uma designação + pode ser dada aos camundongos que são realmente homozigóticos para estes elementos.

Anticorpos: Os seguintes MAbs anti-EGFR foram usados *in vitro* e *in vivo*: 2F8 (também referido como "EGFR Humax"), um anticorpo

antio EGFR IgG1 humano (Genmab, Utrecht, Holanda); o hibridoma produzindo m225, um anticorpo anti-EGFR IgG2a de camundongo, foi obtido de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, HB-8508); controle de isotipo IgG humano irrelevante (Genmab) que foi usado como um anticorpo IgG1 irrelevante, e fragmento F(ab')₂ conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) de IgG anti-camundongo de cabra (H+L) que foi usado como o anticorpo secundário para imunofluorescência indireta (Protos, San Francisco, CA), IgG humano- α - coelho F(ab')₂ conjugado a FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

O hibridoma 2F8 foi cultivado em DMEM (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escócia) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Hyclone, Logan, Utah) e 100 U/ml de penicilina e 100 U/ml de estreptomicina (ambos Gibco BRL) (pen/strep.). O hibridoma m225 foi cultivado em RPMI1640 (Gibco BRL) suplementado com 15% FBS (Hyclone) e pen/strep (ambos Gibco BRL). Todas as linhagens de célula foram mantida a 37 °C em uma atmosfera umedecida contendo 5% dióxido de carbono. Anticorpo Humax foi purificado usando cromatografia de afinidade de proteína A seguido por exclusão de tamanho em uma coluna HR200 (Pharmacia, New Jersey). Os anticorpos de camundongo foram purificados usando cromatografia de proteína G seguido por exclusão de tamanho em uma coluna HR200. A pureza de todos os anticorpos foi > 95% como determinado por eletroforese de gel poliacrilamida dodecil sulfato (SDS-PAGE). Os fragmentos F(ab') foram feitos via pepsina ou tratamento com β -mercaptoetanol seguido por purificação com proteína A/G. Os fragmentos isolados F(ab') foram > 95% puros como determinado por SDS-PAGE.

Linhagens de células : A431, um carcinoma epidermóide, que altamente super expressa EGFR, foi obtido de ATCC (Rockville, MD, CRL-155). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL), suplementado com 10% de FBS inativado com calor (Hyclone), 50 μ g/ml de

estreptomicina, 50 IU/ml de penicilina, e 4 mM de L-glutamina (todos da Gibco BRL). Como as células cresceram aderentes elas foram destacas usando tripsina-EDTA em PBS (Life Technologis, Paisley, Escócia). Em modelos de tumor, as células foram sempre usadas em fase log. As células foram testadas para expressão de EGFR estável e contaminação de micoplasma antes de cada experiência.

Procedimento de fusão: Os baços foram coletados de modo asséptico de camundongos recentemente submetidos a eutanásia, e colocados em meio sem soro frio 20-30 ml (SFM) em placa de petri. O tecido aderente foi removido e os baços enxaguados duas vezes em SFM. As células de baço foram coletadas por homogeneização em um triturador de tecido em SFM.

As células foram centrifugadas a 1000 g durante 10 min e as células vermelhas de sangue em pelota de célula foram lisadas por suspensão da pelota de célula de baço em 5 ml de NH_4Cl 0,17 M resfriado com gel durante 2-5 min. A mistura de célula foi então diluída com 20 ml de SFM e centrifugada a 1000 g durante 10 min. As células de mieloma foram coletadas em 50 ml de tubos de centrífuga. As células de baço e células de mieloma foram então lavadas por três ciclos de centrifugação a 1000 g e recolocadas em suspensão em 30-40 ml de SFM.

Após contagem das células, células de baço e mieloma foram misturadas a uma relação de 1:1 a 4:1 de baço / mieloma. A mistura de célula de célula / mieloma de baço foi pelotizada por centrifugação e o sobrenadante removido por aspiração. A fusão foi feita por adição de 1-2 ml de solução de PEG (Sigma # P-7181) em gotas para a pelota de célula durante 45 s e misturando com suavidade a solução durante 75 segundos. A solução PEG foi lentamente diluída por adição de 2 ml SFM em gotas durante um min. Isto foi repetido com mais 2 ml de sFm e a solução foi deixada permanecer durante 1 min.

A solução foi então lentamente diluída com mais 30 ml de

SFM durante 90 segundos. As células foram centrifugadas a 1000 g durante 10 min e recolocadas em suspensão em 30 ml de meio HAT. A mistura de fusão foi diluída a 200-300 ml em meio suplementado com HAG contendo 0% fator de clonagem de hibridoma Origin, e dispersos em placas de 96 reservatórios a $> 200 \mu\text{l}$ / reservatório (~ 10 -15 placas/baço). As placas de hibridoma foram examinadas após 3-7 dias para hibridomas. As placas foram alimentadas em 7 dias por substituição de metade do meio em cada reservatório com meio HT novo suplementado com 3% origin. As placas foram alimentadas a cada 3-4 dias após com meio HT.

10 Reagentes ELISA:

1. Solução salina tamponada fosfato (PBS), D-PBS sem Ca e Mg, Hyclone D-PBS # SH30013.03, ou Sigma P 3813.

2. PBS-T (tampão de lavagem) contendo 0,05% de Tween 20, Sigma P-1379.

15 3. PBS-T mais 1% de BSA (Sigma A 9647). Isto serve como o tampão de bloqueio e tampão de amostra.

4. Placas ELISA - placa Nunc Imuno F96 Maxisorp 442404.

5. anticorpo específico para cadeia γ IgG anti-humano, Jackson Immuno-Research 109-006 098.

20 6. IgG específico para cadeia γ anti-humano, de cabra, rotulado co fosfatase alcalina, Jackson Immuno-Research 109-006 098. Uma alternativa é usar κ anti-humano rotulado com fosfatase alcalina, Sigma A 3813.

25 7. IgG1 ou IgG3, anti-humano, rotulado com fosfatase alcalina, Southern Biotechnology # 9050-04 & 9210-04, para uso em ELISA específico para isotipo.

8. p. nitrofenil (pNPP), Sigma N2765, ou kit Sigma Fast N-2770.

9. substrato pNPP e tampão- duas opções:

ggg
D

A. Tampão dietanolamina: misturar 97 ml de dietanolamina, Sigma D-2286, mais 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 800 ml água DI. Ajustar o pH a 9,8 e volume final a 1,0 L com água DI. Adicionar um tablete de 20 mg de pNPP, Sigma N-2765, por 20 ml de tampão dietanolamina.

5 B. Comprimido Sigma Fast pNPP : Sigma N-2770: dissolver 1 comprimido de tampão e 1 comprimido de 1 pNPP em 20 ml H_2O .

10. Leitora de placa ELISA com filtro de 405 nm

11. Receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) Sigma E 3641, EGF rotulado com biotina (EGF-B), Molecular Probes E-3477

10 12. anticorpos humanos ou MAbs anti-EGFR rotulado com biotina

13. anticorpos humanos não específicos para controles negativos, ou IgG1 κ humano purificado, Sigma I-113889.

14. Lavadora automatizada de placa ELISA : Tittek MAP C.

15 IgG anti-humano, ELISA de κ : Para triar placas de hibridoma de IgG humano, MAbs produzindo κ , placas ELISA foram revestidas com 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticorpo específico para cadeia γ IgG anti-humano, Jackson Immuno-Research 109-006-098, durante a noite ou mais a 4 °C. As placas foram lavadas e 100 μl /reservatório PBS-T 1 BSA foram adicionados. As

20 placas foram incubadas durante pelo menos 15 min e 10-50 μL de sobrenadantes de cultura de célula foram adicionados a reservatório de placa ELISA com alguns reservatório s em cada placa incubados com IgG como um controle positivo e o meio de cultura de célula como controle negativo. As

25 placas foram incubadas 1-2 h em temperatura ambiente, lavadas e anticorpo κ anti-humano rotulado com fosfatase alcalina (Sigma A- 3813) 1:5000 em PBS-T mais 1% BSA foram adicionados. As placas foram incubadas durante 1 h a temperatura ambiente, lavadas 4 vezes em lavadora, e substrato pNPP adicionado. As placas foram incubadas 10-60 min e a absorbância foi lida a 405 nm em leitora de placa ELISA.

Procedimento ELISA para testar especificidade de anticorpos humanos anti-EGFR - ligação direta a anticorpo para placa ELISA revestida com EGFR

Para verificar quais anticorpos anti-EGFR especificamente ligam a EGFR, placas Nunc Maxisorp foram revestidas com 100 µg/reservatório de EGFR a 0,4 µg/ml em PBS durante a noite a 4 °C ou durante 2 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas em PBS-T três vezes, 100 µl/ reservatório de PBS-T mais 1% BSA foi adicionado para bloquear sítios não específicos da superfície de plástico e incubadas pelo menos 15 min antes de carregar as amostras. As diluições de amostras a serem testadas foram carregadas em PBS-T mais 1% BSA. Os sobrenadantes foram diluídos um mínimo de 1:3 em PBS-T 1% BSA para carga em placa ELISA. As amostras e padrões foram carregados a 100 µl reservatório, incubadas durante 1 h em temperatura ambiente, e as placas lavadas três vezes em PBS-T. 100 µl / reservatório de PBS-T 1% BSA contendo anticorpo específico para γ anti-humano rotulado com fosfatase alcalina a uma diluição de 1:3000 a 1:5000 foram adicionados. Alternativamente, o κ anti-humano rotulado com fosfatase alcalina pode ser usado. As placas foram incubadas 1 h em temperatura ambiente, lavadas 4 vezes e substrato pNPP adicionado. Uma absorbância foi lida a 405 nm.

Procedimento ELISA para teste de especificidade de anticorpos humanos anti-EGFR - teste de bloqueio ELISA/EGF/EGFR : Para verificar que o anticorpo anti-EGFR liga a EGFR e adicionalmente bloqueia a ligação de fator de crescimento epidérmico rotulado com biotina para o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), placas Nunc Maxisorp foram revestidas com 100 µg/reservatório de EGFR a 0,4 µg/ml em PBS durante a noite a 4 °C ou durante 2 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas em PBS-T três vezes, 100 µl/ reservatório de PBS-T mais 1% BSA foi adicionado para bloquear sítios não específicos da superfície de

plástico e incubadas pelo menos 15 min antes de carregar as amostras. As diluições de amostras a serem testadas foram carregadas em PBS-T mais 1% BSA. Os sobrenadantes foram diluídos um mínimo de 1:3 em PBS-T 1% BSA para carga em placa ELISA. As amostras e padrões foram carregados a 100 µl reservatório, incubadas durante 30 min em temperatura ambiente, e 20 µl reservatório de EGF rotulado com biotina, a 0,5 µg / ml foram adicionados e as placas foram incubadas durante 1 h (isto foi adicionado à solução de amostra já nas placas.). Alternativamente, as amostras podem ser incubadas durante 1 h, lavadas e 100 µl/ reservatório de EGF-biotina a 0,1 µg /ml adicionados e incubadas durante 1 h. As placas foram lavadas três vezes em PBS-T. 100 µl / reservatório de PBS-T 1% BSA contendo fosfatase alcalina estreptavidina a 1:2000 diluição foram adicionadas, e incubadas 1 h. As placas foram lavadas 4 vezes e substrato pNPP adicionado e a absorbância foi lida a 405 nm.

ELISA competitiva para a determinação de especificidade de epítopo de anticorpos humanos anti-EGFR - competição com MABs 225, 528, AB5 e 29,1 de murinos comerciais: O teste foi realizado para determinar quais MABs são os anticorpos 225, 528, AB5 e 29.1 mais parecidos. MABs 225, 528 e AB5 bloqueiam a ligação de EGF para seu receptor e inibem a atividade de tirosina quinase endógena in vivo de EGFR. Mab 29.1 é um MAb de não bloqueio que liga a um resíduo de carboidrato de EGFR. As placas foram revestidas durante pelo menos 2 h em temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C com 0,4 µg/ ml de EGFR em PBS e lavadas e bloqueadas com 100 µl/ reservatório de PBS-T 1% BSA. A solução de bloqueio foi tirada e 100 µl/reservatório de PBS-T 1% BSA foi adicionado a colunas 1-6 na esquerda da placa enquanto um MAb de camundongo não rotulado a 1 µg/ml (100 µl/reservatório) foi adicionado à direita da placa nas colunas 7-12. As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante 1 h e 25 µl de sobrenadante de cultura de célula foram adicionados à posição

equivalente de cada metade da placa de modo que cada sobre é carregado em um reservatório com PBS-T 1% BSA e um reservatório com MAb de camundongo. As placas foram incubadas 1 h, lavadas e anticorpo Fc de IgG anti-humano, rotulado com fosfatase alcalina foi adicionado. As placas foram incubadas 1 h. As placas foram lavadas e substrato adicionado. A absorbância foi lida a 405 nm. A % de competição de MAb foi determinada pela seguinte fórmula: (sobrenadante OD sem competição - sobrenadante OD com competição MAb / sobrenadante OD sem competição) x 100

ELISA competitivo para a determinação de especificidade de epítipo de anticorpos humanos anti-EGFR - ELISA competitiva com anticorpos humanos rotulados com biotina: Testes ELISA competitivos foram realizados para determinar a especificidade de anticorpos humanos anti-EGFR. As placas foram revestidas durante pelo menos 2 h em temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C com 0,4 µg/ ml de EGFR em PBS. As placas foram lavadas e bloqueadas com 100 µl/ reservatório de PBS-T 1% BSA. 50 µl de (10-30 µg /ml) de anticorpos humanos não rotulados ou MAbs de camundongo foram adicionados aos reservatórios de topo da coluna de placa e 50 µl foram seqüencialmente transferidos e misturados em série em cada coluna para criar uma série de diluição de três vezes de cada anticorpo. 50 µl foram descartados do reservatório de fundo após misturação. As placas foram incubadas durante 1 h e 20 µ/reservatório de anticorpo humano anti-EGFR biotinilado ou anticorpos EGFR anti-humano de camundongo não rotulado foram adicionados para a placa de modo que a concentração final de anticorpo de competição foi de aproximadamente 0,1- 0,2 µg/ml. As placas foram incubadas durante 1 h em temperatura ambiente, lavadas e 100 µl/ reservatório de fosfatase alcalina estreptavidina (1: 2000 em PBS-T-BSA) ou IgG anti-camundongo de cabra rotulado com fosfatase alcalina. As placas foram incubadas 1 h, lavadas e o substrato adicionado. A absorbância foi lida a 405 nm.

Procedimento FACS para testar especificidade de anticorpos humanos anti-EGFR (bloqueio EGF / EGFR : Este teste foi usado para verificar que o anticorpo anti-EGFR liga a EGFR na superfície da célula e assim bloqueia a ligação de fator de crescimento epidérmico rotulado com biotina (EGF-B) para o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Este método à base de FACS usa a linhagem de célula de carcinoma epidérmico humano A431 que expressa cerca de 10^6 moléculas EGFR /célula.

Materiais para testes FACS de EGFR

1. Células A431 (ATCC CRL 1555) confluentes em um ou mais frascos T-175. Células 431 são cultivadas em DMEM mais 10% FCS

2. solução tripsina-EDTA, Sigma T 3924.

3. EGF rotulado com biotina. Preparar uma solução de carga de cerca de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, usar 10 μl /reservatório.

4. Placas de 96 reservatórios de fundo redondo

5. PBS, estéril.

6. PBS mais 1% BSA mais 0,02% sódio azida (tampão FACS).

7. Estreptavidina rotulada PE, Sigma S 3402. Diluir 1:20 em tampão FACS.

8. IgG anti-humano rotulado com FITC ou rotulado PE, FC específico para γ , Pharminigen 34164X, 34165X.

9. Centrífuga em baixa velocidade com cestos oscilantes e adaptador para placas de 96 reservatório s (Beckman).

10 FACS

11. Tubos FACS BD

Procedimento: Células A431 foram coletadas por tratamento EDTA tripsina. Meio de frasco de cultura de tecido foi removido e secado com 10-20 ml PBS estéril ou HBSS. 5-10 ml de EDTA tripsina foram adicionados e o frasco voltou ao incubador por alguns minutos. À medida que as células começaram a se destacar da superfície do plástico, uma pipeta de 10

ml foi usada para tirar com cuidado as células da superfície de plástico e para gerar uma suspensão única de célula sem muitos aglomerados de células. As células foram transferidas para um tubo de 50 ml com 20-30 ml de meio de cultura de célula (com FBS), centrifugadas durante 10 min a 1000 g, e lavadas duas vezes por centrifugação e recolocação em suspensão de células em tampão FACS frio. A solução de célula foi filtrada em malha de náilon para remover os aglomerados (o topo de tubos FACS BD são equipados). As células foram contadas e o volume ajustado de modo a estar entre 1 a 5×10^6 célula ml. As células foram distribuídas em uma placa redonda de 96 reservatório s em cerca de 200.000 células /reservatório e centrifugadas durante cerca de 1 min a 1000 g e então o líquido foi tirado (as células ficando no fundo do reservatório). As placas foram mantidas em gelo ou a 4°C . Em uma placa de 96 reservatórios separada, as diluições de amostra de anticorpo em tampão FACS foram preparadas por série de diluição em três vezes de anticorpo partindo a $10\ \mu\text{g/ml}$ e diminuindo a $4,5\ \text{ng/ml}$. $100\ \mu\text{l}$ de cada diluição de anticorpo, controles de isotipo e controles de tampão foram adicionados à placa redonda. As amostras e controles de anticorpo foram misturados com as células e incubados durante 30 min em gelo. $10\ \mu\text{l}$ de EGF rotulado com biotina foram adicionados à solução de célula de anticorpo e incubados por mais 30 min. As células foram lavadas 3 vezes por centrifugação e re-suspensão em tampão FACS. $50\ \mu\text{l}$ de estreptavidina PE foram adicionados, misturados e incubados durante 30 min em gelo. As células foram lavadas 3 vezes e re-colocadas em suspensão em $50\ \mu\text{l}$ tampão FACS. Os conteúdos de cada reservatório foram transferidos pra um tubo contendo $300\text{-}400\ \mu\text{l}$ tampão FACS. $5.000\text{-}10.000$ células foram analisadas em cada amostra por FACS no canal FL-2. A concentração de MCF versus anticorpo foi traçada em gráfico.

Materiais derivados de humanos ou animais - Linhagem de célula de carcinoma epidermóide humano A431 (CRL-1555, lote 203945,

ATCC Manassas, Virginia). Tripsina EDTA (Cellgrow Cat # 25-053-CI). Linhagem de célula mieloma P3 X63 ag8.653 : ATCC CRL 1580, lote F-15183 Origin- fator de clonagem de hibridoma Origin (Igen 21001). Suplemento OPI (Sigma O- 5003) Soro de bovino fetal (SH30071 Lote ALE10321 e AGH6843) de Hyclone Logan, Utah. Meio Origen (Igen # 210002)

ELISA - Para determinar a ligação de anticorpos humanos a EGFR, um ELISA com EGFR (Sigma, St Louis, M) revestido durante a noite em uma concentração de 1 µg/ml em PBS em uma placa de microtitulação de 96 reservatórios (Greiner, Frickenhausen, Alemanha) foi usado. Após bloquear a placa com tampão ELISA (PBS / 0,05% Tween 20 e 1% soro de galinha (Gibco BRL)) a uma concentração de 100 µl/reservatório, anticorpo monoclonal diluído em tampão ELISA foi adicionado e incubado durante 1 h a 37 °C. As placas foram subsequentemente lavadas 3 vezes e incubadas com IgG anti-humano de cabra rotulado com peroxidase específico para Fc (Jackson, West Grace, P) durante 1 hora a 37 °C. O teste foi revelado com ABTS (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) durante 30 minutos. A absorbância foi medida com uma leitura de microplaca (Biotek, Winooski, Canadá) a 415 nm. Com relação aos estudos de bloqueio, as placas foram pré-incubadas durante 10 min com 50 µl de agente de bloqueio em tampão ELISA antes de adicionar 50 µl de anticorpo completamente humano. Para a determinação de IgG humano em soro de camundongo, placas ELISA foram revestidas com cadeias leves kappa anti-humano, de coelho, (DAKO) durante a noite em PBS em placa de microtitulação de 96 reservatórios (Greiner). Após bloquear a placa com tampão ELISA (PBS / 0,05% Tween 20 e 1% soro de frango), 100 µl/reservatório, soro de camundongo diluído em tampão ELISA foi adicionado e incubado durante 1 h a 37 °. As placas foram subsequentemente lavadas 3 vezes e incubadas com IgG anti-humano de fragmento F(ab')₂ de coelho rotulado com peroxidase (DAKO) durante 1 h a

37 °C. O teste foi revelado com ABTS (Roche) durante 30 min. A absorbância foi medida com leitora (Biotek) a 415 nm.

Citometria de fluxo: Células de tumor super-expressando EGFR foram incubadas com MAb durante 30 min a 4 °C. As células foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada com fosfato suplementada com 1% albumina de soro bovino (Roche) e 0,01% azida. A contra-coloração foi realizada com fragmentos F(ab')₂ conjugados a FITC de um anticorpo anti-camundongo de cabra ou com fragmentos F(ab')₂ conjugados com FITC de um anticorpo IgG anti-humano de coelho. Com relação a experiências de inibição, as células foram pré-incubadas com EGF ou TGF- α durante 10 min a 4 °C. Todas as amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Estudos de fosforilação : Culturas sub-confluentes de células A431 em placas de 24 reservatórios (NUNC, Kamstrup, Dinamarca) foram tratadas durante a noite com baixas condições de soro (0,5%). Diluições de anticorpo diferentes foram adicionadas aos reservatórios e incubadas durante 30min a 37 °C e 5% dióxido de carbono. AS células foram estimuladas com ou sem 5 ng/ml EGF (Prepotech, Rocky Hill, NJ) durante 5 minutos a 37 °C e 5% de dióxido de carbono. Os extratos de célula foram preparados como descrito por Tomic *et al.* (Tomic *et al.*, 1995) usando 100 μ l de tampão de lise por reservatório. 50 μ l de A431 extrato de célula foram analisados por SDS-PAGE de sódio e imunoblot com anticorpos anti-fosfo-tirosina (PY20, Transduction Laboratories, Kentucky), anticorpos IgG HRP anti-camundongo de cabra (Transduction Laboratories), e detecção de ECL. Para estímulo com TGF- α (Prepotech, Rocky Hill, NJ) culturas sub-confluentes de células A431 em placas de 42 reservatórios (Nunc) foram tratadas durante a noite com meio de soro baixo (0,5%). Os anticorpos foram adicionados em uma dose fixa de 10 ou 0 μ g/ml e incubados como acima. As células foram estimuladas com uma quantidade crescente de TGF- α . As células foram tratadas como acima.



Inibição de crescimento de célula *in vitro*: Os aspectos de inibição de crescimento de célula de anticorpos completamente humanos foram avaliados com um teste de inibição não radioativo. Brevemente, 100 µl de 2×10^4 /ml células A431 foram adicionados a uma placa de cultura de fundo redondo e colocados em incubador de cultura. As células foram incubadas durante 6-7 dias, sobrenadantes foram decantados, e 100 µl de 0,25% glutaraldeído em PBS foram adicionados a cada reservatório. Após incubação durante 45 min em temperatura ambiente, os reservatórios foram lavados duas vezes com pouca água. 50 µl de 1% violeta cristal em água adicionados e incubados durante 15 min em temperatura ambiente. Após lavar a placa duas vezes, elas foram reveladas com 100% metanol durante 30 min em um agitador. A absorbância foi medida com uma leitora de microplaca usando um filtro de 550 nm com um filtro de referência de 650 nm. A inibição foi medida em triplicatas. A porcentagem de proliferação de célula relativa foi determinada por divisão de absorbância média da triplicata de uma concentração de anticorpo particular pela absorbância média dos reservatórios que não tinham anticorpo adicionado, então vezes 100.

Isolamento de célula efetuator. Células brancas de sangue periférico foram isoladas por um método um pouco modificado do descrito em Repp, *et al.* (1991) Blood 78: 885 - 889. Em resumo, sangue anticoagulado com heparina foi colocado em gradiente ficoll. Após centrifugação, as células efetuidoras foram coletadas da interfase e os eritrócitos restantes foram removidos por lise hipotônica. As preparações de citospina foram usadas para avaliar a pureza de células isoladas que foi maior que 95%. A viabilidade de células, determinada por exclusão de azul tripano, excedeu 95%.

Testes ADCC: A capacidade de anticorpos completamente humanos de lisar células de tumor foi avaliada em testes de liberação de ⁵¹ cromo (Valerius, *et al.* (1993) Blood, 82: 931 - 939). As células brancas de

sangue humano, isoladas, foram usadas como fonte de efetuator. Em resumo, marcações de tumor foram incubadas com 100 μCi ^{51}Cr durante 2 h. Após uma lavagem de três vezes com meio de cultura, células de marcação 5×10^3 foram adicionadas a placas de cultura de tecido com fundo redondo contendo 50 μl de células efetuatoras isoladas e MAb sensibilizante em diferentes concentrações e diluídas em meio de cultura. O volume final foi de 200 μl e a relação de célula de marcação para efetuatora (E:T) foi de 80:1. Os testes foram incubados durante a noite a 37 °C e parados por centrifugação. A liberação de cromo foi medida em sobrenadantes em triplicatas. A porcentagem de citotoxicidade celular foi calculada usando a fórmula:

$$\% \text{ Lise específica} = \frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm espontâneo}}{\text{cpm máximo} - \text{cpm espontâneo}}$$

com liberação de ^{51}Cr determinada por adição de ZAP-oglobin® (10% concentração final) para células de marcação e liberação basal medida na ausência de anticorpos de sensibilização e células efetuatoras. Somente níveis muito baixos de citotoxicidade não celular, mediada por anticorpo (sem células efetuatoras) foram observados sob estas condições de teste (< 5% lise específica).

Medidas de afinidade usando tecnologia SPR : A afinidade de ligação de anticorpos anti-EGFR foi determinada usando BIAcore 300 (Biacore, Upsala, Suécia). EGFR purificado de célula A431 adquirido de Sigma foi imobilizado em um chip CM5 de acordo com as instruções dos fabricantes. As medidas foram feitas com fragmentos de anticorpo F(ab') em diferentes concentrações. As constantes de associação e dissociação foram determinadas usando software BIAevaluation (versão 3.1).

Modelos de tumor e camundongos: Camundongos Balb/c Nude (NuNu) foram adquiridos de Harlan (Horst, Holanda). Todas as experiências descritas foram realizadas com camundongos fêmeas de oito a doze semanas de idade. Os camundongos foram alojados em instalações para camundongos transgênicos de Central Laboratory Animal Facility (Utrecht,

Holanda) e experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Utrecht University. Quando participando em uma experiência, os camundongos foram verificados três vezes por semana para sinais de toxicidade e desconforto incluindo nível de atividade, anormalidades da pele, diarreia, e aparência geral. Um modelo de tumor subcutâneo (s.c.) bem estabelecido foi usado. Brevemente, as células A431 expressando alto teor de EGFR foram inoculadas, no lado direito do camundongo, em uma dose de 3×10^6 células. Os tumores crescem uniformes e podem ser facilmente medidos por compassos vernie. O volume do tumor é registrado como comprimento x largura x altura (em mm^3). Os anticorpos monoclonais foram injetados intraperitonealmente (i.p.) de acordo com o protocolo de estudo. As células de tumor foram testadas para expressão de EGFR estável após passagem *in vivo* por citometria de fluxo e imuno-histoquímica. A fim de determinar a farmacocinética, camundongos, com e sem tumores, foram injetados i.p. com anticorpo 2F8. As amostras de sangue semanais foram tomadas via a veia da cauda antes e durante seis semanas após a injeção. As amostras foram analisadas por ELISA de IgG humano.

Análise estatística. Os dados de grupos foram registrados como erro padrão $\pm$ médio da média (SEM). As diferenças entre grupos foram analisadas por teste - *t* de Student não em pares (ou quando apropriado, em pares). Os níveis de significância são indicados. A significância foi aceita, no nível de $p < 0,05$.

Exemplo 1 - Geração de camundongos marcados com Cmu para a produção de anticorpos humanos anti-EGFR, também referidos como "HuMAbs".

Construção de um vetor de marcação CMD

O plasmídeo pICEmu contém um fragmento EcoRI/XhoI de local de cadeia pesada Ig de murinos, se estendendo ao gene mu, que foi obtido de uma biblioteca genômica de fagos lambda Balb/C (Marcu *et al.* Cell

22: 187, 1980). Este fragmento genômico foi subclonado nos sítios XhoI/EcoRI do plasmídeo pICEMI9H (Marsh *et al.*; Gene 32, 481 - 485, 1984). As seqüências de cadeia pesada incluiria a extensão pICEmu a jusante do sítio EcoRI localizado logo 3' do melhorador intrônico mu, para o sítio XhoI localizado aproximadamente 1 kb a jusante do último exon de transmembrana do gene mu; no entanto, uma porção apreciável da região de repetição de mudança mu foi deletada por passagem em *E coli*. O vetor de marcação foi construído como a seguir. Um fragmento HindIII/SmaI de 1,3 kb foi excisado de pICEmu e subclonado em pBluescript digerido com HindIII/SamI (Stratagene, La Jolla, CA). Este fragmento pICEmu se estende do sítio HindIII localizado aproximadamente 1 kb 5' do Cmu1 para o sítio SmaI localizado dentro de Cmu1. O plasmídeo resultante foi digerido com SamI/SpeI e o fragmento SamI/XbaI de aproximadamente 4 kb de pICEmu, se estendendo de sítio SamI em Cmu1 3' para o sítio XbaI localizado logo a jusante do último exon Cmu, foi inserido. O plasmídeo resultante, pTAR1, foi linearizado no sítio SamI, e o cassete de expressão neo inserido. O cassete consiste de um gene neo sob o controle transcripcional de promotor de fosfoglicerato quinase (pgk) de camundongos (fragmento XbaI/TaqI, Adra *et al.* (1987) Gene 60: 65 - 74) e contendo o sítio de poliadenilação pgk (fragmento PvuII/HindIII; Boer *et al.* (1990) Biochemical Genetics 28: 299 - 308). Este cassete foi obtido do plasmídeo pKJ1 (descrito por Tybulewicz *et al.* (1991) Cell 65: 1153 - 1163) do qual o cassete neo foi excisado como um fragmento EcoRI/HindIII e subclonado em pGEM-7Zf digerido com EcoRI/HindIII (+) para gerar pGEM-7 (KJ1). O cassete neo foi excisado de pGEM-7 (KJ1) por digestão EcoRI/SalI, terminado de modo obtuso e subclonado em sítio SmaI do plasmídeo pTAR1, na orientação oposta das seqüências Cmu genômicas. O plasmídeo resultante foi linearizado para permitir o enriquecimento de clones ES contendo recombinantes homólogos, como descrito por Mansour *et al.* (1988) Nature 336: 348 - 352. Este cassete

consiste da sequência de codificação do gene tk agrupado pelo promotor de pgk de camundongo e sítio de poliadenilação, como descrito por Tybulewicz *et al.* (1991) Cell 65: 1153 - 1163. O vetor de marcação CMD resultante contém um total de aproximadamente 5,3 kb de homologia para o local de cadeia pesada e é designado para gerar um gene mu mutante em que foi inserido um cassete de expressão neo no sítio SmaI único do primeiro exon Cmu. O vetor de marcação foi linearizado com PvuI, que se encontra dentro das sequências de plasmídeo, antes da eletroporação em células ES.

Geração e análise de células ES marcadas

As células AB-1 ES (McMahon, A. P. e Bradley, A., (1990) Cell 62: 1073 - 1085) foram cultivadas em camadas de alimentador de célula SNL 76/7 mitoticamente inativas (ibid). essencialmente como descrito (Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 71 - 112). O vetor de marcação CMD linearizado foi eletroporado em células AB-1 pelos métodos descritos em Hasty *et al.* (Hasty, P. R. *et al.* (1991) Nature 350: 243 - 246). As células eletroporadas foram colocadas em discos de 100 mm a uma densidade de $1-2 \times 10^6$ células/disco. Após 24 horas, G418 (200 microgramas/ml de componente ativo) e FIAU (5×10^{-7} M) foi adicionado ao meio, e clones resistentes a drogas foram deixados se desenvolver em 8-9 dias. Os clones foram tomados, tripsinizados, divididos em duas porções, e ainda expandidos. Metade das células derivadas de cada clone foi então congelada e a outra metade analisada para recombinação homóloga entre sequências de vetor e marcação.

A análise de DNA foi realizada por hibridização Southern blot. DNA foi isolado dos clones como descrito por Laird *et al.* (Laird, P. W. *et al.*, (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293). DNA genômico isolado foi digerido com SpeI e sondado com um fragmento SacI de 915 bp, sonda A, que hibridiza para uma sequência entre o melhorador intrônico mu e a região de

gzb
h

mudança mu. A sonda A detecta um fragmento SpeI de 9,9 kb do local de tipo selvagem, e uma banda diagnóstica de 7,6 kb de um local mu que foi recombinação homologamente com o vetor de marcação CMD (o cassete de expressão neo contém um sítio SpeI). Dentre os 1132 clones resistentes FIAU e G418 triados por análise southern blot, 3 demonstraram a banda SpeI de 7,6 kb indicativa de recombinação homóloga no local mu. Estes 3 clones foram ainda digeridos com as enzimas BglI, BstXI, e EcoRI, para verificar que o vetor integrou homologamente no gene mu. Quando hibridizados com sonda A, os Southern blots de DNA de tipo selvagem digeridos com BglI, BstXI ou EcoRI produzem fragmentos de 15,7, 7,3 e 12,5 kb, respectivamente, enquanto a presença de alelo mu marcado é indicada por fragmentos de 7,7, 6,6 e 14,3 kb, respectivamente. Todos os 3 clones positivos detectados por digestos SpeI mostraram os fragmentos de restrição BglI, BstXI e EcoRI, diagnósticos para inserção do cassete neo no éxon Cmu1.

15 Geração de camundongos contendo o gene mu mudado

Os três clones ES marcados, designados número 264, 272 e 408, foram descongelados e injetados em blastocistos C57BL/6J como descrito por Bradley (Bradley, A. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113 - 151). Os blastocistos injetados foram transferidos do útero de fêmeas pseudogravídas para gerar camundongos quiméricos representando uma mistura de células derivadas de células ES de entrada e o blastócito hospedeiro. A extensão de contribuição de célula ES para as quimeras pode ser visualmente estimada pela quantidade de coloração do pêlo das cotias, derivadas de linhagem de célula ES, no fundo preto de C57BL/6J. Os clones 272 e 408 produziram somente quimeras de baixa porcentagem (isto é, cotia com baixa porcentagem de pigmentação) mas o clone 264 produziu uma alta porcentagem de quimeras machos. Estes quimeras foram cruzados com fêmeas C57BL/6J e uma ninhada de roedores cotias foi gerada, indicativa de

transmissão da linhagem germinal de genoma de célula ES. A triagem para o gene mu marcado foi realizada por análise Southern Blot de DNA digerido com BglII de biópsias da cauda (como descrito para análise de DNA de célula ES). Aproximadamente 50% da ninhada das cotias mostrou uma banda BglII hibridizando de 7,7 kb em adição à banda de tipo selvagem de 15,7 kb, demonstrando uma transmissão de linhagem germinal do gene mu marcado.

Análise de camundongos transgênicos para inativação funcional de gene mu

Para determinar se a inserção do cassete neo em Cmu1 foi inativada pelo gene de cadeia pesada Ig, 264 quimeras de clone foram cruzados com um camundongo homozigótico para a mutação JHD, que inativa a expressão de cadeia pesada como resultado de deleção de segmentos de gene JH (Chen *et al.*, (1993) Immunol. 5: 647 - 656). Foram geradas quatro ninhadas de cotias. Soro foi obtido destes animais na idade de 1 mês e testados por ELISA pela presença de IgM de murinos. Duas das quatro ninhadas estavam completamente faltando IgM (ver tabela 2). A genotipagem dos quatro animais por análise Southern blot de DNA de biópsias da cauda por digestão BglII e hibridização com sonda A (ver figura 1) e por digestão StuI e hibridização com um fragmento EcoRI/StuI de 475 bp (ibid) demonstrou que os animais que deixam de expressar IgM no soro são os em que um alelo do local de cadeia pesada transporta a mutação JHD, o outro alelo a mutação Cmu1. Os camundongos heterozigóticos para a mutação JHD demonstram níveis de tipo selvagem de Ig no soro. Estes dados demonstram que a mutação Cmu1 inativa a expressão do gene mu.

Tabela 2

Camundongo	IgM no Soro (microgramas/ml)	Genotipo de cadeia H Ig
42	<0,002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0,002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	<0,002	JHD/JHD

A tabela 2 mostra os níveis de IgM no soro, detectados por

238

ELISA, para camundongos transportando tanto as mutações CMD como JHD (CMD/JHD), para camundongos heterozigóticos para a mutação JHD (+/JHD), para camundongos de tipo selvagem (129Sv x C57BL/6J)F1 (+/+) e para camundongos deficientes em células B homozigóticos para a mutação JHD (JHD/JHD).

Exemplo 2 - Geração de camundongos transgênicos HCO12 para a produção de anticorpos humanos anti-EGFR

Transgene de cadeia pesada humano HCO12

O transgene HCO12 foi gerado por co-injeção do inserto de 80 kb de pH2 (Taylor *et al.*, 1994, Int. Immunol., 6: 579 - 591) e o inserto de 25 kb de pVx6. O plasmídeo pVx6 foi construído como descrito abaixo.

Um fragmento de DNA HindIII/SalI de 8,5 kb compreendendo o gene de linhagem germinal humana VH1-18 (DP-14) junto com aproximadamente 2,5 kb de flanco 5', e 5 kb de sequência genômica de flanco 3' foi subclonado em vetor plasmídeo pSP72 (Promega, Madison, WI), para gerar o plasmídeo p343.7.16. Um fragmento de DNA BamHI/HindIII de 7 kb, compreendendo o gene VH5-51 (DP-73) humano de linhagem germinal junto com aproximadamente 5 kb de flanco 5' e 1 kb de sequência genômica de flanco 3', foi clonado no vetor de clonagem pGP1f de plasmídeo com base em pBR322 (Taylor *et al.* 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287 - 6295), para gerar o plasmídeo p251f. Um novo vetor de clonagem derivado de pGP1f, pGP1K (SEQ ID No: 13) foi digerido com EcoRV/BamHI e ligado em um fragmento de DNA EcoRV/BamHI de 10 kb, compreendendo o gene VH3-23 (DP47) humano de linhagem germinal, junto com aproximadamente 4 kb de flanco 5' e 5 kb de sequência genômica de flanco 3'. O plasmídeo resultante, p112.2RR.7, foi digerido com BamHI/SalI e ligado com o inserto BamHI/SalI purificado de 7 kb de p251f. O plasmídeo resultante, pVx4, foi digerido com XhoI e ligado com o inserto XhoI/SalI de 8,5 kb de p343.7.16. Um clone foi obtido com o gene VH1-18 na mesma orientação que os outros

dois genes V. Este clone, designado pVx6, foi então digerido com NotI e o inserto de 26 kb purificado co-injetado - junto com o inserto NotI de 80 kb purificado de pHc2 em uma relação molar 1:1, no pronúcleo de embriões de um meio-dia (C57BL/6J x DBA/2J) F2, como descrito por Hogan *et al.* (B. Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, segunda edição, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY). Três linhagens independentes de camundongos transgênicos compreendendo seqüências de tanto Vx6 como HC2 foram estabelecidas de camundongos que se desenvolveram de embriões injetados. Estas linhagens são designadas (HCO12) 14881, (HCO12) 15083, e (HCO12) 15087. Cada uma das três linhagens foi então cruzada com camundongos compreendendo a mutação CMD descrita no exemplo 1, a mutação JKD (Chen *et al.* 1993, EMBO J. 12: 811 - 820), e o transgene (KCo5) 9272 (Fishwild *et al.* 1996, Nature Biotechnology 14: 845 - 851). Os camundongos resultantes expressam transgenes de cadeia leve kappa e pesada de imunoglobulina humana em um fundo homozigótico para ruptura dos locais de cadeia leve kappa e pesada de camundongos endógenos.

Exemplo 3 - Produção de anticorpos monoclonais humanos contra EGFR

Duas diferentes cepas de camundongos foram usadas para gerar anticorpos monoclonais humanos reativos para EGFR. Cepa ((CMD)⁺⁺; (JKD)⁺⁺; (HCo7) 11952^{+/++}; (KCo5) 9272^{+/++}) (referida aqui como "camundongos HCO7") e cepa ((CMD)⁺⁺; (JKD)⁺⁺; (HCo12) 15087^{+/++}; (KCo5) 9272^{+/++}) (referida aqui como "camundongo HCO12"). Cada uma destas cepas é homozigótica para rupturas dos locais de cadeia pesada endógena (CMD) e cadeia leve kappa. Ambas as cepas também compreendem um transgene de cadeia leve kappa humana (Hco7), com animais individuais ou hemizigóticos ou homozigóticos para inserção # 11952. As duas cepas diferem no transgene de cadeia pesada humano usado. Os camundongos foram hemizigóticos ou homozigóticos para Hco7 ou o transgene Hco12. A

mutação CMD é descrita acima no exemplo 1. A geração de camundongos (Hco12) 15087 é descrita no exemplo 2. A mutação JKD (Chen *et al.* 1993, EMBO J. 12: 811 - 820) e os camundongos (KCo5) 9272 (Fishwild *et al.* 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845 - 851) e (HCo7) 11952, são descritos na patente U.S. números 5.770.429 e 5.545.806 (Lonberg & Kay, 6/23/98).

O esquema de imunização usado é relacionado na tabela 3 abaixo. Os camundongos foram imunizados com células A 431 seguido por antígeno em solução em adjuvante Ribi. O título de soro específico para EGFR foi determinado por ELISA após a terceira imunização. Três diferentes imunizações foram feitas para os reforços finais após a fusão. Estes incluíram dois ou três reforços intravenosos (iv) sequenciais via a veia da cauda com 10 µg de antígeno em 50 µl PBS ou dois reforços intraperitoneais (i.p.) sequenciais com 25 µg de EGFR solúvel em adjuvante Ribi (ver tabela 3). Os três camundongos que foram usados na fusão foram parte de um grupo maior de camundongos que incluía ambos os genótipos Hco7 e Hco12.

Esquema de imunização : Tabela 3

Esquema de imunização								
	Células A431	Células A431	ELISA Título	EGFR Em ip Ribi	ELISA Título	Fusão	EGFR Emip RIBI	Fusão
Camundongo	Dia 1	Dia 20	Dia 30	Dia 33	Dia 43	Dia 46	Dia 50	Dia 53
20241	2 X 10 ⁶	1 X 10 ⁷	0	25 µg	4050		25 µg	Ribi 2 x 25 µg***
20242	2 X 10 ⁶	1 X 10 ⁷	0	25 µg	4050		25 µg	2 iv x 10 µg*
20243	2 X 10 ⁶	1 X 10 ⁷	450	25 µg	12150	3 iv x 10 µg*		
* EGFR em PBS (10 µg) iv em dias -4, -3, e -2								
** EGFR em PBS (10 µg) iv em dias -4 e -3								
*** EGFR em Ribi (25 µg) i.p. em dias -4 e -3								

A estratégia de imunização usada pelas primeiras duas injeções, 2-10 X 10⁶ células A431 vivas i.p., resultou em fracos títulos anti-EGFR (ver tabela 2). No entanto, quando estes camundongos receberam uma terceira imunização com 25 µg/camundongo de EGFR solúvel em adjuvante Ribi, títulos de soro aumentaram em mais do que 30 vezes. Estes resultados

demonstram claramente que as células expressando uma grande quantidade de EGFR sobre a superfície da célula foram muito mais efetivas para iniciar uma resposta imune primária do que quando foram muito aumentadas com somente uma dose de antígeno purificado em adjuvante.

5 O reforço final antes da fusão para camundongo 20243 foi feito como reforços na veia da cauda i.v. com 10 µg de EGFR solúvel em PBS em dias -4, -3, e -2. O Triton X-100 no EGFR solúvel causou uma irritação na cauda do camundongo. Assim, para reduzir a possibilidade de irritação, camundongo 20242 recebeu somente dois reforços na veia i.v. com EGFR solúvel nos dias -4 e -3, e camundongo 20242 recebeu somente dois reforços na veia i.v. com EGFR solúvel em dias -4 e -3, e camundongo 20241 recebeu duas imunizações i.p. em dias -4 e -3 com 25 µg de EGFR no adjuvante Ribi. As três fusões resultaram em 46 hibridomas humanos, positivos para antígeno γ, -κ, (ver tabela 4). O camundongo 20241 sozinho, 15 que recebeu os reforços i.p. com adjuvante, produziu 35 anticorpos kappa gama humanos, específicos para antígeno.

Tabela 4

Camundongo	γκ+	γ/κ+ EGFR +	γ1κ+ EGFR +	γ3κ+ EGFR +
20243	120	14	13	1
20242	35	2	2	0
20241	*	30	28	2

Exemplo 4 - Preparação de hibridoma

20 A linhagem de célula de mieloma P3 X63 ag8.653 (ATCC CRL 1580, lote f-15183) foi usada para as fusões. O frasco de ATCC original foi descongelado e expandido em cultura. Uma carga de semente de frascos congelados foi preparada a partir desta expansão. Um frasco novo de células foi descongelado uma a duas semanas antes das fusões.

25 DMEM de alto teor de glucose (Mediatech, Cellgro # 10013) contendo 10% de FBS, penicilina-estreptomicina (Sigma, P-7539), e $5,5 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol (GibcoBRL, 21985-023) foi usado para cultivar células

A431 e células mieloma. Suplementos de meio adicional foram adicionados ao meio de crescimento de hibridoma, que incluía 3% fator de clonagem de hibridoma Origin (Igen, 21001), suplemento OPI (Sigma, O-5003), $1,1 \times 10^{-3}$ M de ácido acético oxalo, $4,5 \times 10^{-4}$ M de piruvato de sódio, e 24 unidades internacionais/insulina bovina L, HAT (Sigma, H 0262) $1,0 \times 10^{-4}$ M de hipoxantina, $4,0 \times 10^{-7}$ M de aminopterina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina, ou HT (Sigma, H0137) $1,0 \times 10^{-4}$ M de hipoxantina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina.

Soro bovino fetal caracterizado (SH3007 1 lotes # AJE10321 e AGH6843) foi obtido de Hyclone, Logan, Utah. Meio isento de soro continha DMEM, antibióticos e 2-mercaptoetanol apenas.

Os baços de todos os três camundongos eram de tamanho normal e deram de 2×10^7 a 1×10^8 esplenócitos. Os esplenócitos foram fundidos.

A triagem ELISA inicial para anticorpos κ IgG humanos foi realizada 7-10 dias após a fusão. Os reservatórios positivos para κ , IgG humano, foram triados em placas ELISA revestidas com EGFR. Os hibridomas positivos para antígenos foram transferidos para placas de 24 reservatórios e eventualmente para frascos de cultura de tecido. Os hibridomas específicos para EGFR foram subclonados por limitação da diluição para assegurar monoclonalidade. Os hibridomas positivos para antígeno foram conservados em vários estágios no processo de desenvolvimento por congelamento de células em DMEM 10% FBS mais 10% DMSO (Sigma, D2650) ou em meio de congelamento Origen (Igen # 210002). As células foram armazenadas a -80°C ou em LN_2 .

Os hibridomas específicos para EGFR iniciais foram subsequentemente avaliados para especificidade de epítomos e sua capacidade para bloquear a ligação de EGF para receptor de EGFR. Os anticorpos anti-EGFR monoclonais de camundongo 225 e 528 demonstraram previamente ligar a EGFR, bloquear a ligação de EGF para EGFR e para ser os agentes

imunoterapêuticos anti-câncer em estudos sobre animais e humanos. Assim, estes anticorpos foram usados, além de um anticorpo não bloqueador, em um formato ELISA competitivo para identificar anticorpos humanos que tem características imunoterapêuticas.

5 **Exemplo 5 - Afinidade de ligação**

A afinidade de ligação para hibridoma 2F8 foi determinada usando BIAcore 3000 (Biacore, Upsula, Suécia). EGFR purificado de célula A431 adquirido de Sigma foi imobilizado em um chip CM5 de acordo com as instruções dos fabricantes. O anticorpo 2F8 tinha uma constante de associação de equilíbrio (K_A) de $5,47 (\pm 0,52) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

10 **Exemplo 6 - Testes ELISA competitivos**

Os testes ELISA competitivos foram usados como o teste qualificador inicial logo que os hibridomas positivos para antígeno foram estabelecidos em placas de 24 reservatórios. Em geral, competição forte (80-15 100%) indica que um anticorpo liga ao mesmo epítipo ou a uma região do antígeno em proximidade íntima com o anticorpo de competição. Competição mais fraca de menos que 50% indica que o anticorpo e seu competidor ligam a regiões do antígeno não em proximidade íntima. Os testes iniciais foram feitos com sobrenadantes de hibridomas não clonados, muitos dos quais 20 continham mais do que um hibridoma por reservatório. Os últimos testes foram feitos com subclones dos reservatórios originais. As Figuras 1 e 2 mostram (os dados na figura 1 e 2 são dispostos com base no grau de competição com MAb 225) que mesmo com sobrenadantes de cultura de célula em bruto, os anticorpos podem ser identificados que ligam a epítipos 25 similares ou idênticos como os anticorpos 225 e 528. Também é evidente nesta experiência que a distribuição diferente em padrões de ligação competitivos de anticorpos derivados de camundongo 20241 ou de camundongo 20242 e 20243. Por exemplo, os primeiros sete anticorpos de camundongo # 20241 (figura 1) competem fortemente com ambos MAb 225 e

528. Os restantes dos anticorpos de 20241 competiram moderadamente ou fracamente com os anticorpos 225 e 528. Cinco anticorpos (1H6 2F8, 1A8, 5C5, e 8E1) de camundongos 20242 e 20243 mostraram uma forte competição com anticorpo 225 e nenhuma competição ou competição fraca de MAb 528 (figura 2). Os anticorpos 2F6, 8A12, 5F12, 6B3 e 6D9 de camundongo 20242 e 20243 competiram com ambos MAb 225 e 528, apesar da competição ser mais forte contra o anticorpo 225. Outros anticorpos destes camundongos não competem ou foram fracamente competitivos com os MAbs comerciais.

Estes resultados ELISA competitivos, iniciais, foram verificados com anticorpos purificados produzidos por células subclonadas. As Figuras 3 e 4 mostram que anticorpos 5F12 e 6B3 competem fortemente com tanto MAb 225 como 528, e também demonstram competição recíproca entre si. Estes dados indicam que os anticorpos ligam ao mesmo epítopo ou a uma região da molécula EGFR em proximidade íntima com o sítio de ligação 225 ou 528. O anticorpo 2F8 compete moderadamente com MAb 225 e não compete de modo significativo com o anticorpo 528 (Figuras 3 e 4). No entanto, o anticorpo 2F8, 6B3 e 5F12 mostram forte competição cruzada. Este dado sugere que o anticorpo 2F8 está ligado a um epítopo separado dos anticorpos 225 e 528 e liga a uma região do receptor de EGFR que é adjacente a ou sobrepõe com o epítopo ao qual HuMAbs 6B3 e 5F12 se ligam. Os anticorpos 2A2 e 6E9 não competem com um dos MAb e ligam a epítopos EGFR não relacionados aos sítios de ligação de MAbs 225 e 528 (Figuras 3 e 4).

Exemplo 7 - Testes de bloqueio de EGF/EGFR

Os subclones positivos para antígeno foram ainda avaliados em testes de bloqueio de EGF/EGFR. Estes testes incluíram subclones de anticorpos que competem fortemente com MAb 225 e/ou 528, assim como anticorpos que são fracos ou não competitivos com 225 ou 528. Vários

gml
m

anticorpos foram expandidos em meio de cultura e purificados por cromatografia de proteína A. As Figuras 5 e 6 mostram que anticorpos 2F8, 5F12 e 6B3, que foram competidores moderados a fortes do anticorpo 225 em ELISA, são bloqueadores fortes de EGF ligando a EGFR. Isto é evidente em testes feitos em formato ELISA ou por FACS em células de câncer epidermóide A431 humanas. Em ambos os testes, os anticorpos humanos foram tão bons ou melhores que MAb 225. Os anticorpos 2F8, 5F12, 6B3 e 6E9 também tem características de ligação similares sobre a superfície de célula A431 (Figura 7).

Os estudos de competição ELISA e de bloqueio EGF/EGFR *in vitro* demonstraram que os anticorpos 2F8, 5F12 e 6B3 tem propriedades similares para outros anticorpos humanos e murinos anti-EGFR que foram mostrados como sendo agentes imunoterapêuticos (Sato, *et al.* (1983) Mol. Biol. Med. 511 - 529; Gill, *et al.* (1984) J. of Biol. Chem. 259 (12): 7755 - 7760). O anticorpo 2F8 foi equivalente a ou melhor do que os anticorpos 6B3 e 5F12 no global em várias avaliações.

Exemplo 8 - Inibição de ligação EGF/TGF- α para o receptor EGF usando anticorpos monoclonais humanos para o receptor de EGF

Os estudos de inibição foram realizados em células A431 usando citometria de fluxo, ELISA e inibição de autofosforilação induzida por ligando. MAbs 225 ou 525 de murinos foram usados como controles positivos. Um controle de isotipo IgF humano, irrelevante, foi usado como um controle de isotipo. Um único anticorpo humano, 2F8, foi escolhido para todos os outros estudos. Este anticorpo é também referido como "Humax-EGFR[®]". Figura 8 mostra a capacidade de bloqueio de EGF de 2F8 em um modo dependente da concentração. 2F8 e m225 bloqueiam na mesma extensão enquanto a capacidade de bloqueio de EGF é menor.

A Figura 9 ainda mostra a capacidade de bloqueio de 2F8 em que ela inibe, de modo eficiente, a ligação de EGF e TGF- α a células A431

(células derivadas de um carcinoma epidermóide ovariano e expressam em excesso de 1×10^6 moléculas de EGFR em sua superfície celular). A inibição de ligação de 2F8 a células A431 foi determinada usando análise de citometria de fluxo. As células foram pré-incubadas com ligando de 5 (barras abertas) ou 50 $\mu\text{g/ml}$ (barras fechadas) antes de adição de 2F8. A ligação de anticorpo sem ligando (grupo PBS) foi designada como 100%. Estes resultados indicam que 2F8 liga próximo a, ou no mesmo sítio, em EGFR como os ligandos.

Exemplo 9 - Inibição de ativação de célula de tumor usando anticorpos monoclonais humanos para o receptor de EGF

Para avaliar a capacidade de 2F8 para inibir a ativação de célula de tumor, o efeito de 2F8 em respostas celulares ativadas por EGF, como ativação de atividade de tirosina quinase intrínseca e proliferação celular concomitante, foi examinado. Um dos primeiros eventos após ligação de EGF ou TGF- α para o EGFR é a indução de autofosforilação do receptor. A incubação de EGF com células A431 resulta em fosforilação de tirosina do EGFR (M_r , 170.000) (Figura 10A). Apesar de 2F8 não ativar a atividade de receptor quinase sozinho, a fosforilação de tirosina de EGFR ativada por EGF, bloqueada por anticorpo, em um modo dependente da dose, com uma inibição completa em uma concentração de 16.6 nM (relação molar anticorpo: EGF, 20:1, Figura 10A). As células foram tratadas com anticorpo e TGF- α mostraram que a fosforilação de tirosina foi completamente bloqueada por 2F8 em uma concentração de 66 nM (relação molar anticorpo: TGF- α , 7,3:1, Figura 10B).

O compromisso de EGF/TGF- α com o receptor resulta em ativação celular que é refletiva na proliferação celular. Assim, o efeito inibidor de 2F8 no crescimento de células de tumor (células A431, MDA-MD-468 e HN5) foi avaliado. As experiências foram realizadas na ausência de EGF exógeno. Os anticorpos de camundongos foram usados como uma

JMX

comparação. Humax-EGFR inibiu o crescimento de células A431 em um modo dependente da concentração com uma inibição máxima de 50%, um nível similar ao obtido com anticorpo de camundongo 225 (Figura 14). O anticorpo de controle não teve efeito sobre a proliferação celular (Figura 14).

- 5 A inibição do crescimento foi também obtida com duas outras linhagens de células em níveis similares (HN5 e MDA-MB468, painéis B e C). Como nenhum EGF exógeno foi adicionado à cultura, estes resultados indicam a capacidade de 2F8 de bloquear estimulação autócrina e assim inibir a ativação de células de tumor induzida por EGF/TGF- α .

10 **Exemplo 10 - Anticorpos monoclonais humanos para o receptor EGF induzem ADCC**

- ADCC é um mecanismo efetador imune potente ativado pelo reconhecimento de células de tumor por anticorpos. Para avaliar a capacidade de células PMN humanas para matar células A431 na presença de 2F8, células A431 foram carregadas com ^{51}Cr e subseqüentemente incubadas com células efetadoras e anticorpos (PMN) durante a noite. Após incubação, a liberação de cromo foi medida. Como mostrado na Figura 14, 2F8 é capaz de induzir ADCC contra células A431 usando PMN humano. 2F8 é capaz de mediar a lise induzida por PMN de 45% das células de marcação A431, que é maior quando observada com o MAb 425 (Figura 14).
- 15
- 20

Como importante, apesar de capaz de recrutar células efetadoras e induzir ADCC, 2F8 é incapaz de induzir a lise mediada por complemento de células de tumor.

25 **Exemplo 11 - Anticorpos monoclonais humanos para o receptor EGF evitam a formação de tumor**

Para mostrar a capacidade de HuMAb 2F8 de evitar a formação de tumor em um modelo de murinos atímico, grupos de seis (6) camundongos foram injetados subcutaneamente no flanco com 3×10^6 células de tumor em 200 μl PBS em dia zero (0). subseqüentemente, os camundongos

gms

foram injetados i.p. em dias 1 (75 µg/200 µl), 3 (25 µg/200 µl), e 5 (25 µg/200 µl) (setas) com ou HuMAb 2F8 (quadrados fechados) i.p. de IgG1-κ MAb humano, como um controle (círculos abertos) (Figura 14). Os dados são apresentados com volume de tumor médio + SEM, e são representativos de 3 experiências individuais, dando resultados similares.

A erradicação de xenoinxertos de tumor A431 estabelecidos por HuMAb 2F8 em comparação com m225, é mostrada na Figura 14. Os camundongos foram injetados subcutaneamente no flanco com 3×10^6 células de tumor em 200 µl BPS no dia zero (0). No dia 10, os camundongos foram alocados aleatoriamente para grupos de tratamento e tratados nos dias 12 (75 µg/200 µl), 14 (25 µg/200 µl), e 16 (25 µg/200 µl) (setas) com HuMAb 2F8 (quadrados fechados, 2F8 a curto prazo), ou com anti-EGFR MAb m225 de murinos (triângulos fechados, m225 curto prazo). Além disso, os grupos foram incluídos recebendo 75 µg /200 µl HuMAb 2F8 ou m225 no dia 12, continuados por 25 µg/200 µl HuMAb 2F8 ou m225 em dias 14, 16, 19, 22, 26, 29, 33, 36, e 40 (quadrados abertos, 2F8 longo prazo; triângulos abertos, m225, longo prazo). Os dados são apresentados como volume de tumor médio +SEM, e são representativos de 3 experiências individuais, dando resultados similares. As setas pretas indicam dias de tratamento para o tratamento a curto prazo, setas abertas indicam dias de tratamento para o tratamento a longo prazo.

Equivalentes

Os versados na técnica irão reconhecer, ou ser capazes de determinar, usando experimentação apenas rotineira, muitos equivalentes das formas de realização específicas da invenção aqui descrita. Estes equivalentes se destinam a serem englobados pelas seguintes reivindicações.

Incorporação por referência

Todas as patentes, pedidos de patente pendentes, e outras publicações citadas aqui são incorporados por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano isolado, que liga a EGFR humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região de determinação de complementariedade CDR1 de cadeia pesada que possui a
5 sequência de aminoácido TYGMH, uma região CDR2 de cadeia pesada que possui a sequência de aminoácido VIWDDGSYKYYGDSVKG, uma região CDR3 de cadeia pesada que possui a sequência de aminoácido DGITMVRGVMKDYFDY, uma região CDR1 de cadeia leve que possui a sequência de aminoácido RASQDISSALV, uma região CDR2 de cadeia leve
10 que possui a sequência de aminoácido DASSLES, e uma região CDR3 de cadeia leve que possui a sequência de aminoácido QQFNSYPLT.

2. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que possui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 2 e
15 uma região variável de cadeia leve que possui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 4.

3. Anticorpo monoclonal humano isolado, que liga a EGFR humano com uma constante de associação de equilíbrio (K_A) de pelo menos cerca de $10^8 M^{-1}$, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma
20 região de determinação de complementariedade CDR1 de cadeia pesada que possui a sequência de aminoácido TYGMH, uma região CDR2 de cadeia pesada que possui a sequência de aminoácido VIWDDGSYKYYGDSVKG, uma região CDR3 de cadeia pesada que possui a sequência de aminoácido DGITMVRGVMKDYFDY, uma região CDR1 de cadeia leve que possui a
25 sequência de aminoácido RASQDISSALV, uma região CDR2 de cadeia leve que possui a sequência de aminoácido DASSLES, e uma região CDR3 de cadeia leve que possui a sequência de aminoácido QQFNSYPLT.

4. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que compreende uma região CDR3 de cadeia

pesada que possui a sequência de aminoácido DGITMVRGVMKDYFDY e uma região CDR3 de cadeia leve que possui a sequência de aminoácido QQFNSYPLT.

5 5. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo IgG1.

6. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que é um fragmento Fab ou um anticorpo de cadeia única.

10 7. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que inibe a ligação de ligando EGFR a EGFR humano.

15 8. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que bloqueia a ligação de ligando EGFR a EGFR humano em pelo menos cerca de 50%.

9. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o ligando EGFR é EGF ou TGF- α .

20 10. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que liga o EGFR humano com uma constante de associação de equilíbrio (K_A) de pelo menos cerca de 10^9 M^{-1} .

11. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o anticorpo não ativa o complemento.

25 12. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que inibe a autofosforilação induzida por EGF ou TGF- α de EGFR.

13. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que liga a células

expressando EGFR e (a) inibe o crescimento das células, (b) induz a lise (ADCC) das células na presença de células efetadoras humanas ou (c) não induz a lise mediada por complemento das células.

14. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 13,
5 caracterizado pelo fato de as células expressando EGFR são (a) células de tumor selecionadas dentre célula de bexiga, uma célula de mama, uma célula de cólon, uma célula de rim, uma célula ovariana, uma célula de próstata, uma célula renal, uma célula escamosa, e uma célula de pulmão não pequena, (b) célula de fibroblasto sinovial ou (c) queratinócitos.

10 15. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser produzido por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano fundido em uma célula
15 imortalizada ou por um transfectoma compreendendo ácidos nucleicos codificando uma cadeia pesada humana e uma cadeia leve humana.

16. Molécula biespecífica, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma primeira especificidade de ligação para EGFR e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo, em que
20 a primeira especificidade de ligação compreende o anticorpo humano como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

17. Método *in vitro* para inibir o crescimento de uma célula expressando EGFR, caracterizado pelo fato de compreender contatar a célula com uma quantidade efetiva de anticorpo como definido em qualquer uma das
25 reivindicações 1 a 15, de modo que o crescimento da célula expressando EGFR é inibido, em que o anticorpo inibe a ligação de ligando EGFR a EGFR humano.

18. Método *in vitro* para induzir a citólise de uma célula expressando EGFR, caracterizado pelo fato de compreender contactar uma

célula expressando EGFR com o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 na presença de uma célula efetuidora, de modo que a citólise da célula expressando EGFR ocorre.

19. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a célula é selecionada dentre uma célula de bexiga, uma célula de mama, uma célula de cólon, uma célula de rim, uma célula ovariana, uma célula de próstata, uma célula renal, uma célula escamosa, uma célula de pulmão não pequena, uma célula de fibroblasto sinovial e um queratinócito.

20. Anticorpo humano de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que é para tratar ou prevenir uma doença mediada por expressão de EGFR, em que a doença é câncer ou uma doença autoimune.

21. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado dentre câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de rim, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer renal e câncer da cabeça e pescoço e a doença autoimune envolve hiperproliferação epitelial ou é artrite inflamatória.

22. Anticorpo humano de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humano é conjugado a uma especificidade de ligação para um receptor Fc ou uma citotoxina.

23. Método para detectar a presença de antígeno EGFR ou uma célula expressando EGFR em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende contactar a amostra com o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo, ou porção do mesmo, e EGFR, e detectar a formação de um complexo.

24. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender as sequências definidas pelas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 3

ligadas de modo operativo às sequências promotora e terminadora heterólogas.

25. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de ainda compreender uma sequência de nucleotídeo codificando a região constante de uma cadeia leve, cadeia pesada ou tanto
5 cadeia leve como pesada de um anticorpo humano que liga EGFR.

26. Vetor de expressão de acordo com as reivindicações 24 ou 25, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de ácido nucleico codificando uma região variável de cadeia pesada que possui a sequência de
10 nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia leve que possui a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 3.

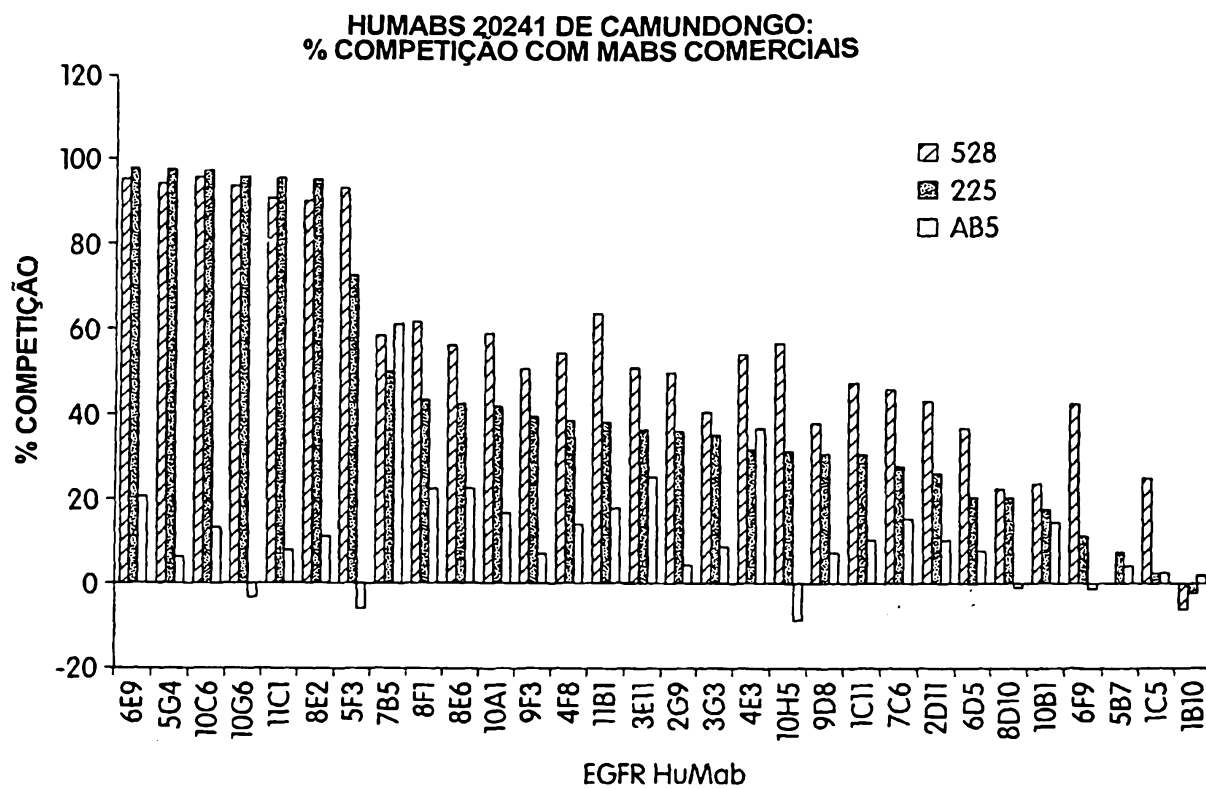
gff
2

Fig. 1

8/19/20

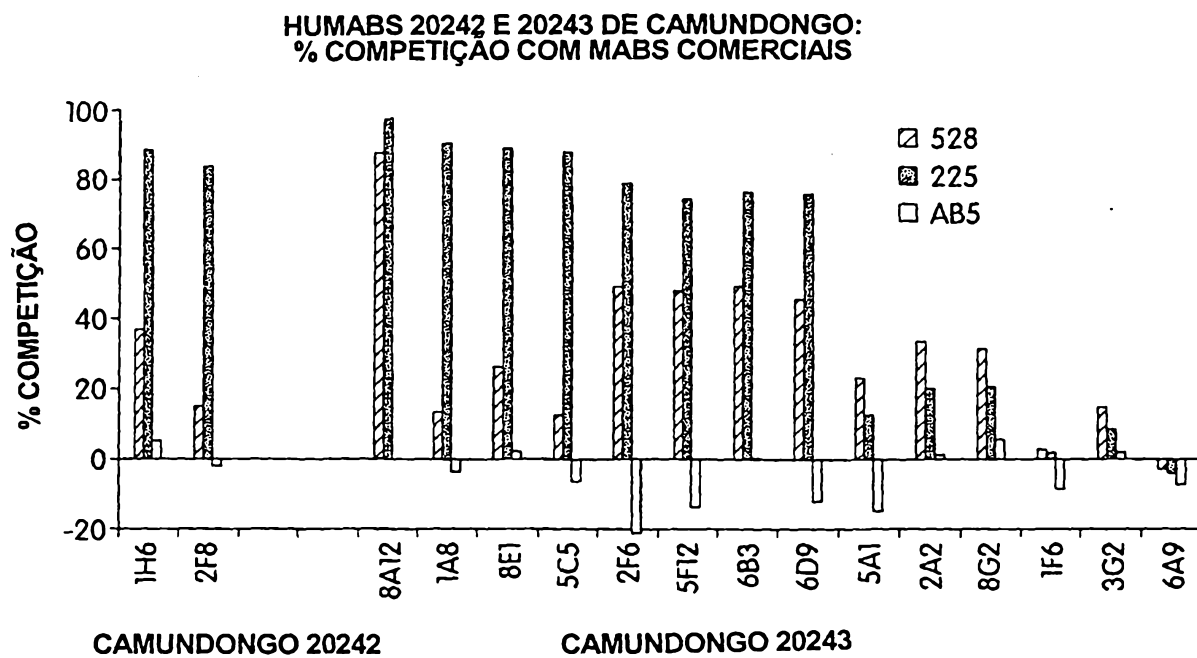


Fig. 2

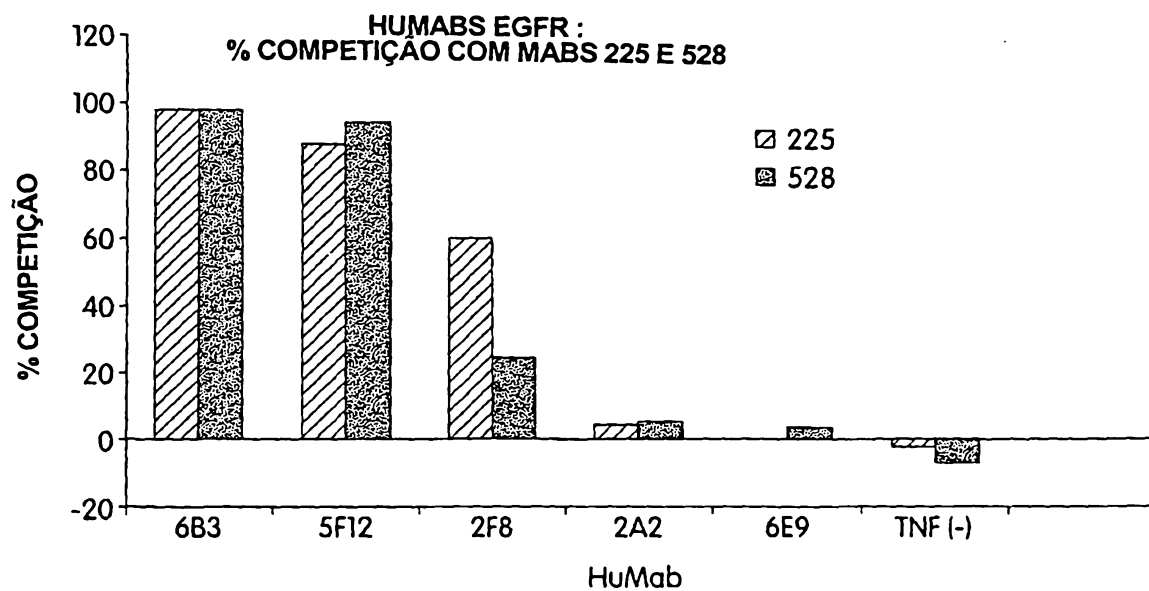
gbo
N

Fig. 3

261/2

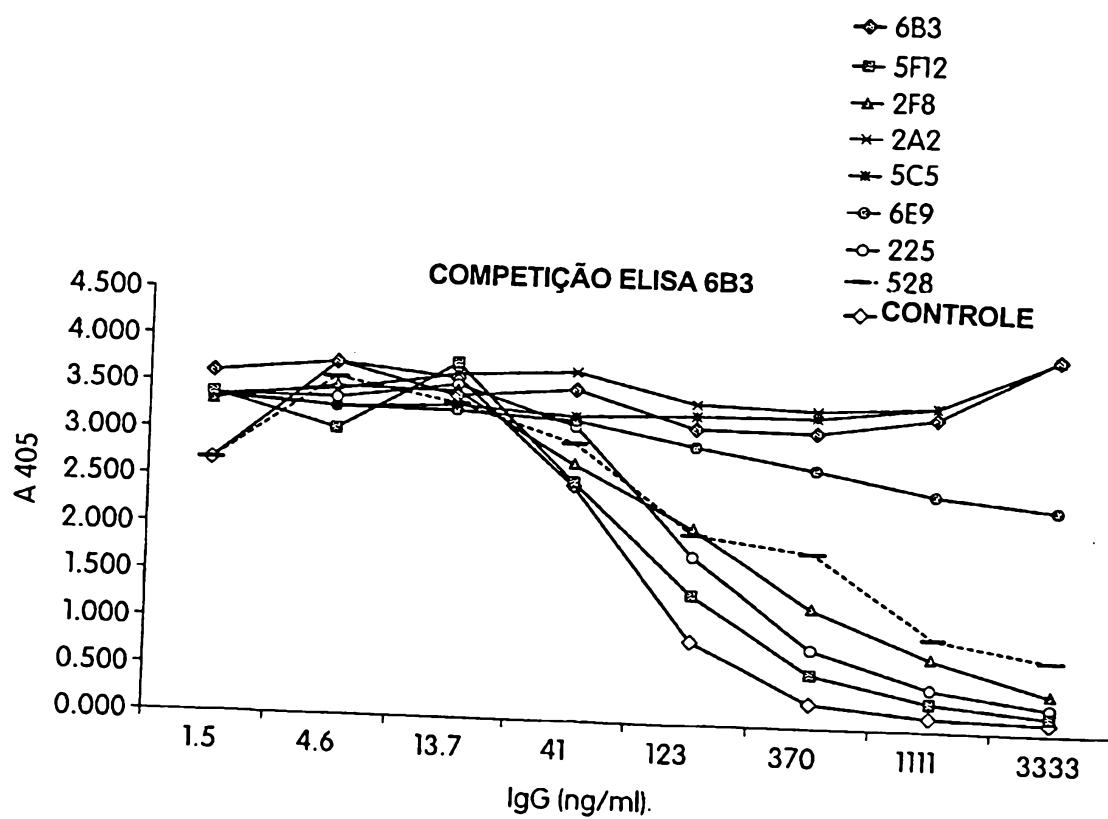


Fig. 4A

862/5

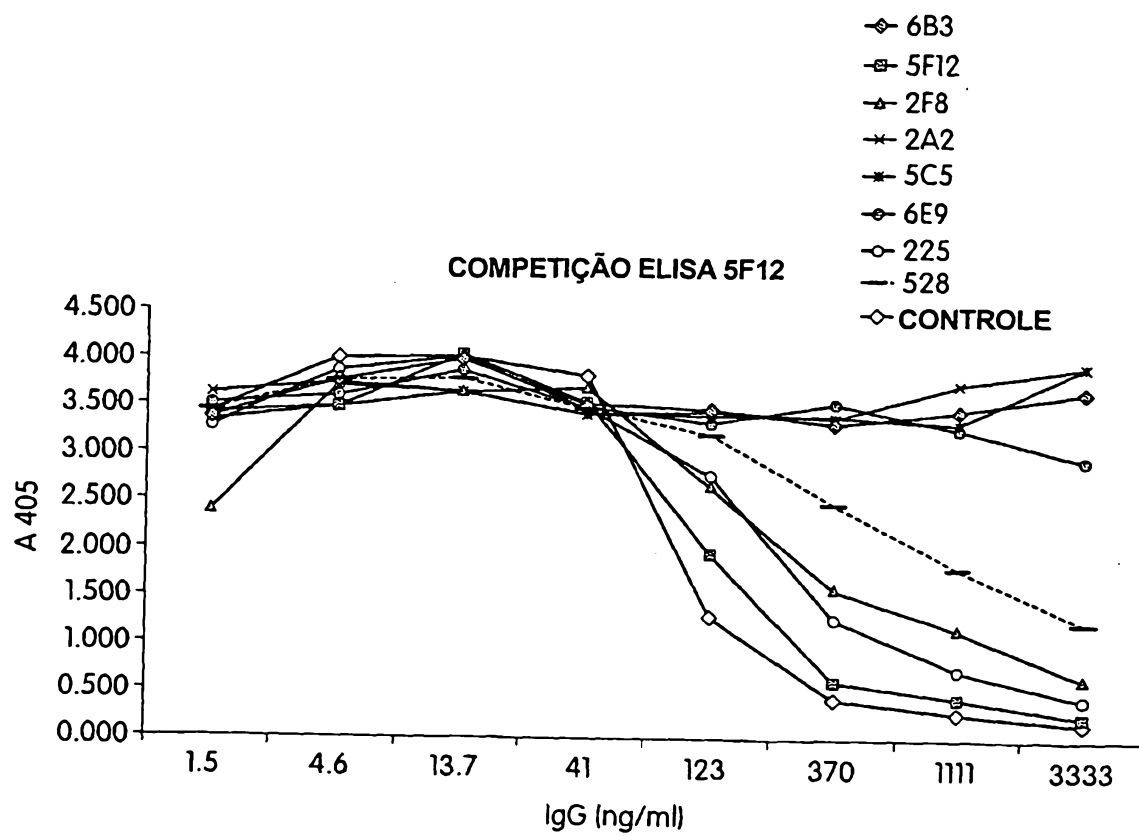


Fig. 4B

263

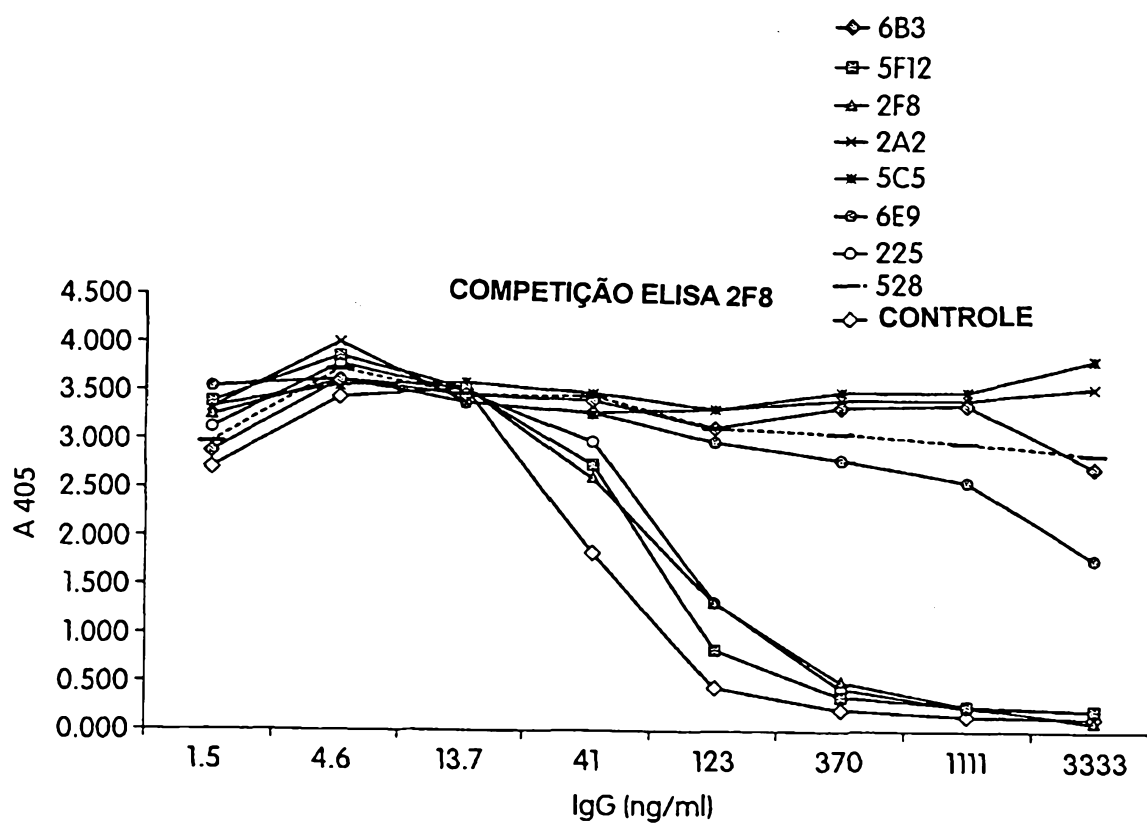


Fig. 4C

JBY

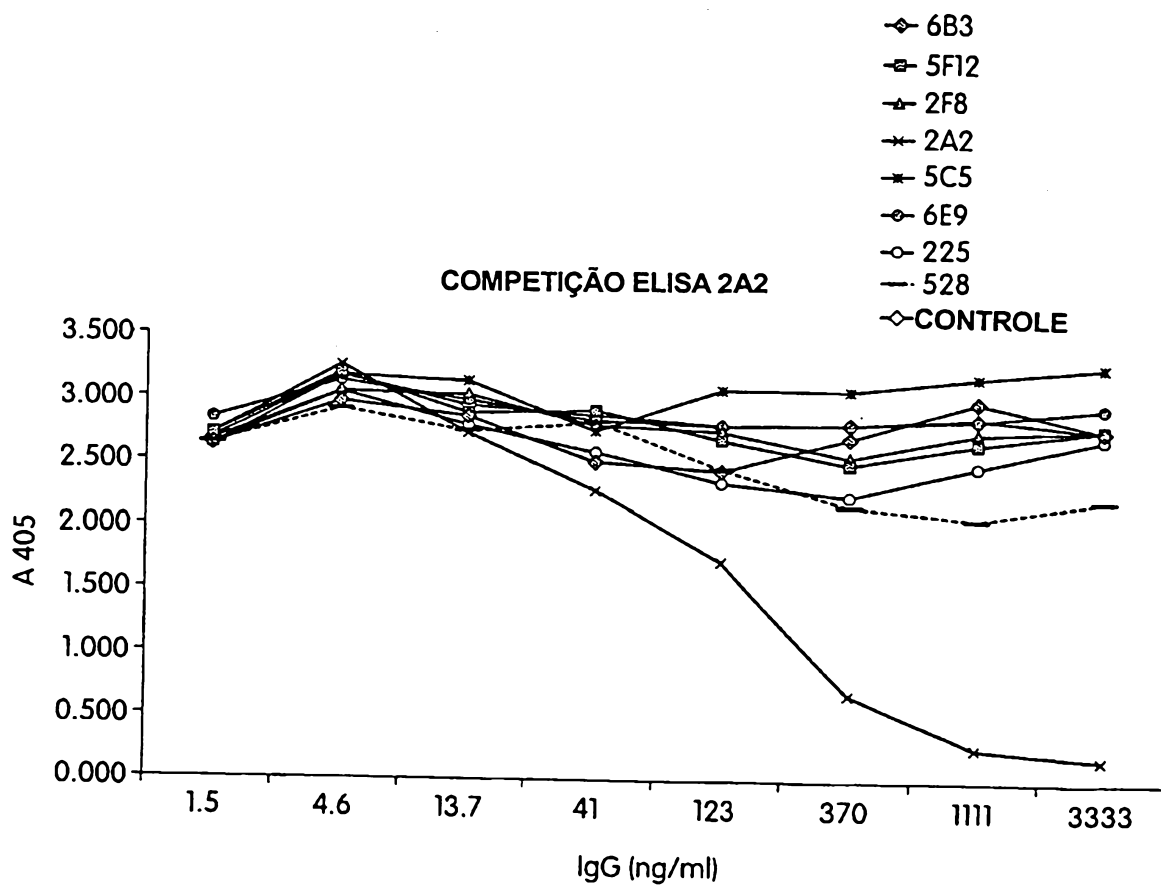


Fig. 4D

gof

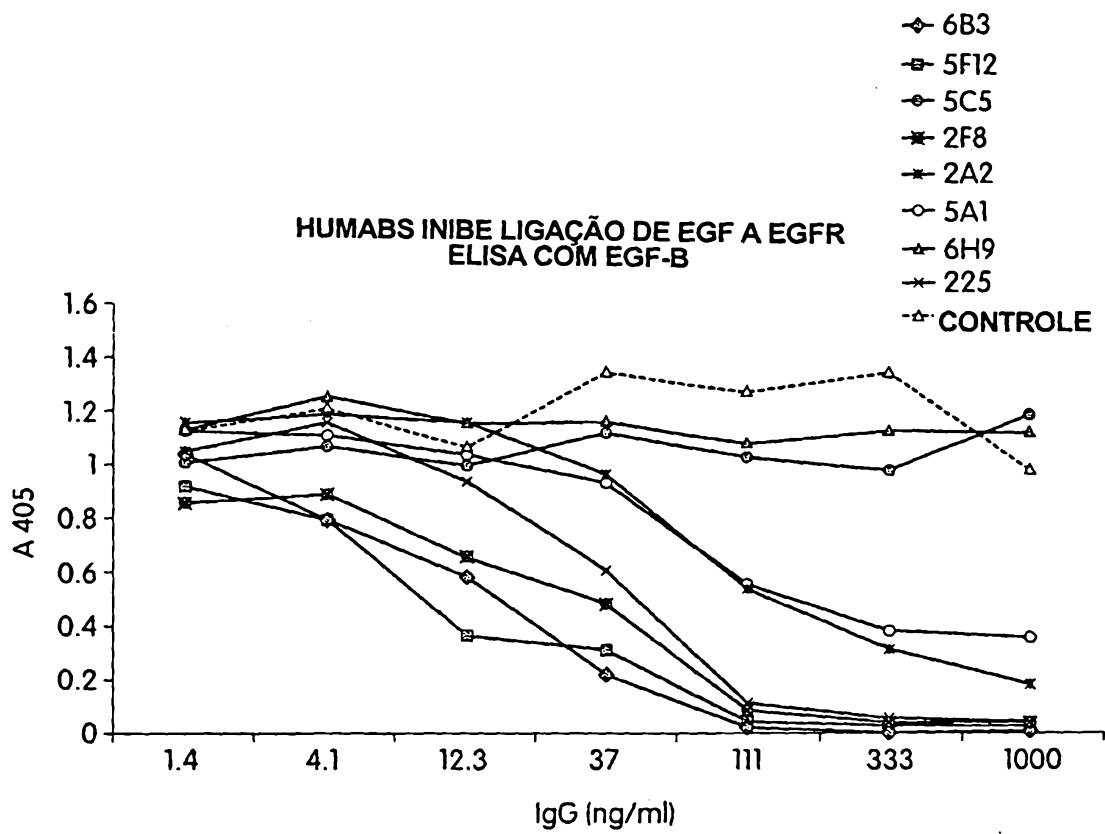


Fig. 5A

gbb

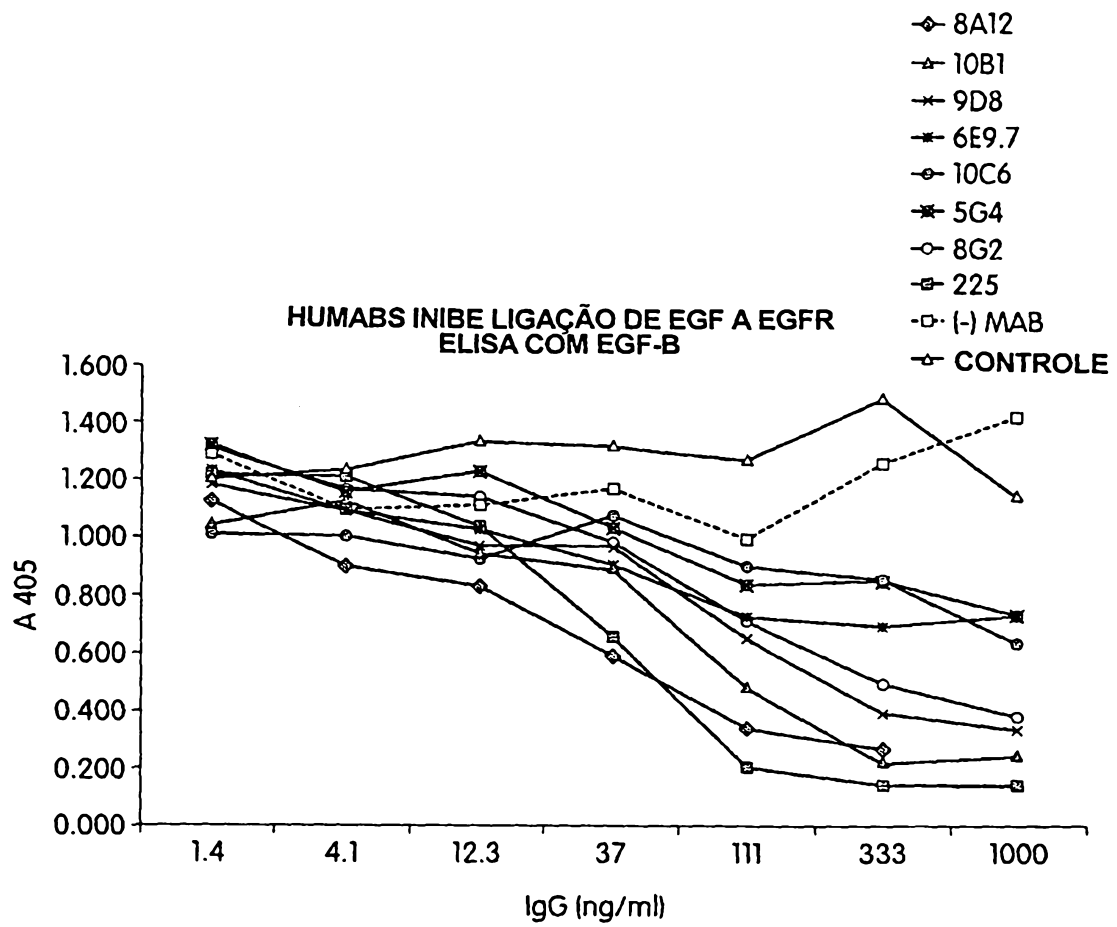


Fig. 5B

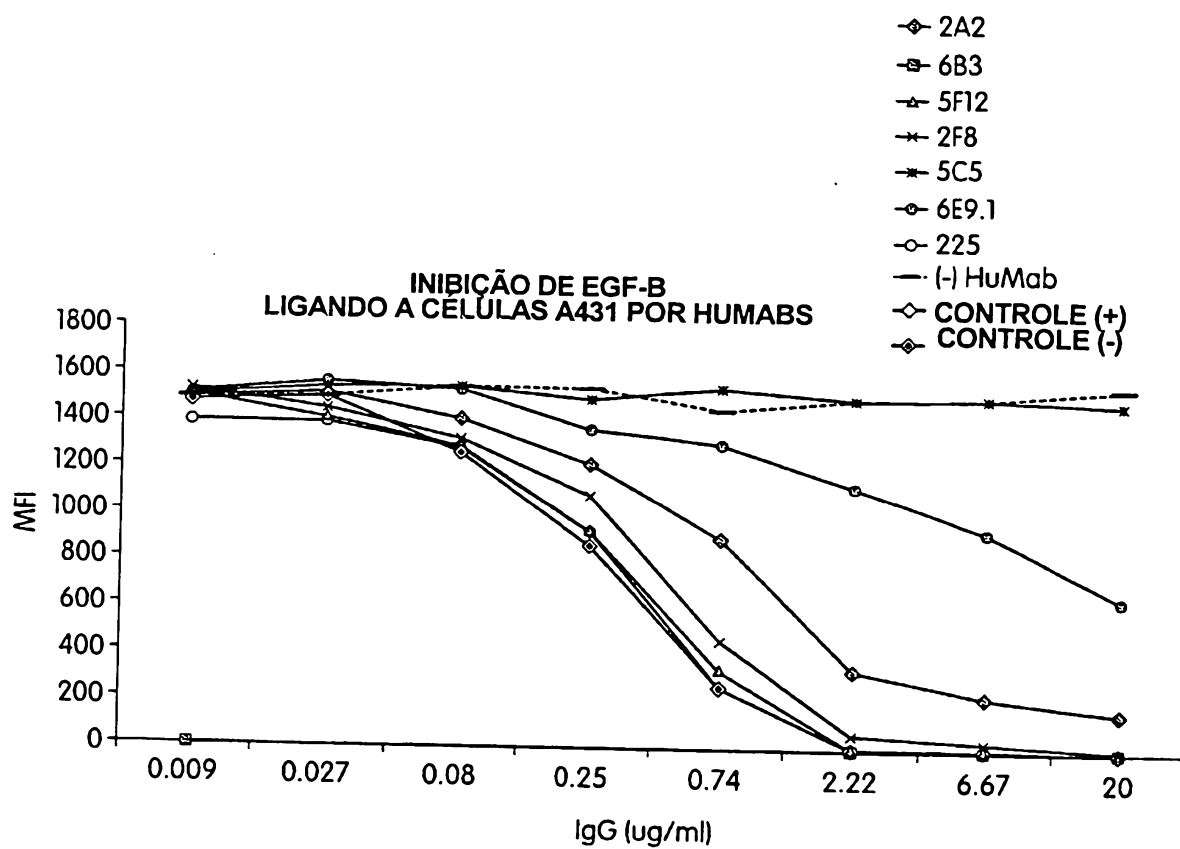
867
m

Fig. 6

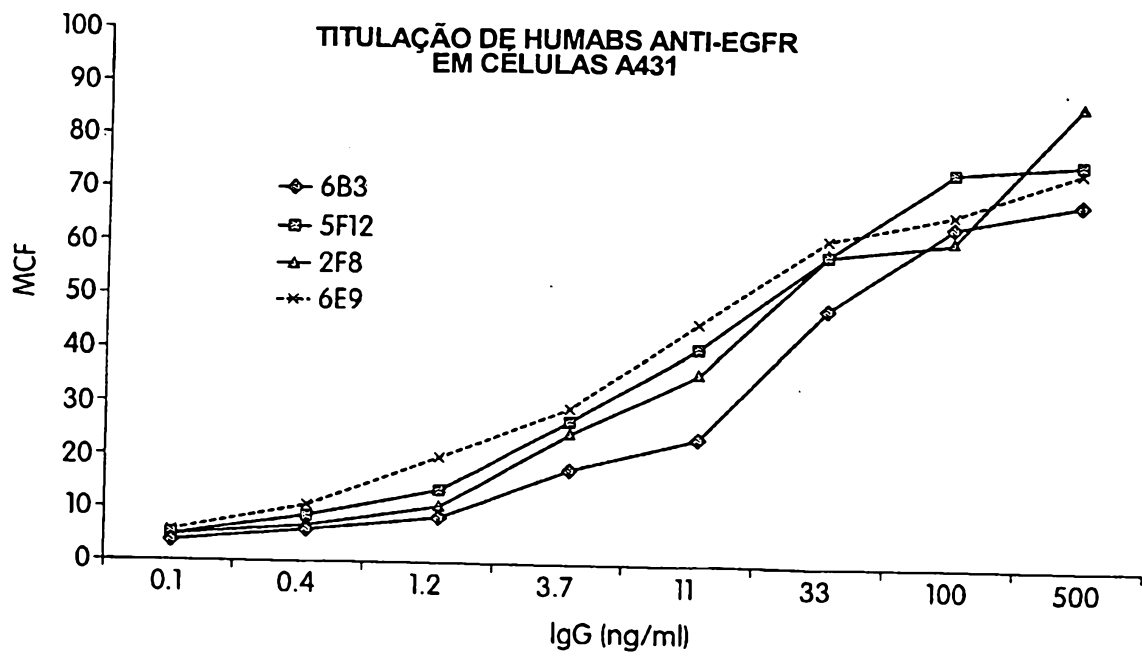
268
M

Fig. 7

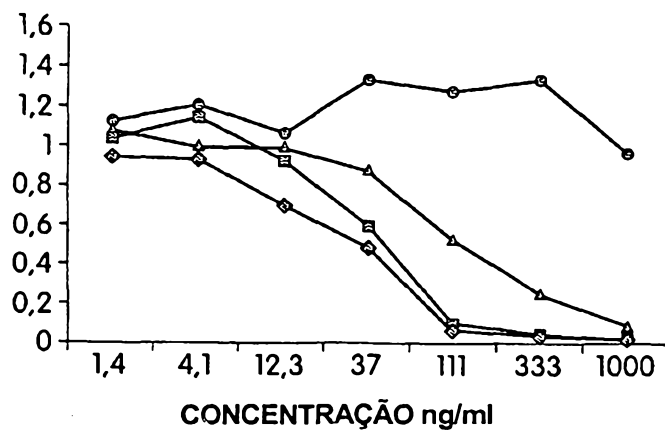
269
M

Fig. 8

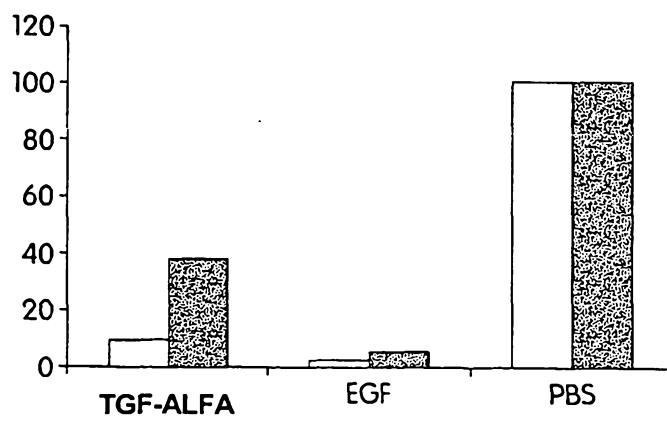


Fig. 9

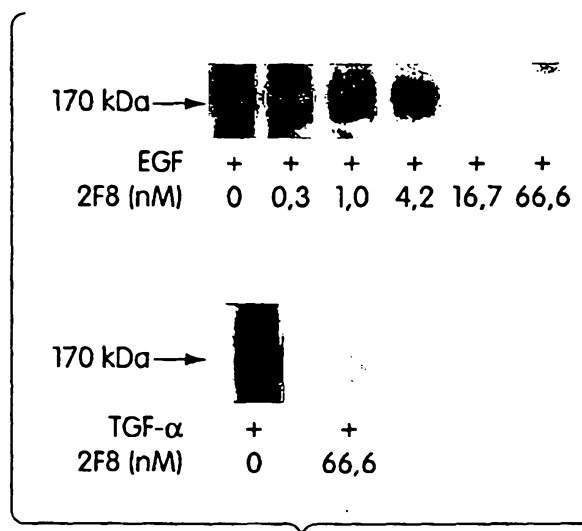


Fig. 10

JH

PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO (%)

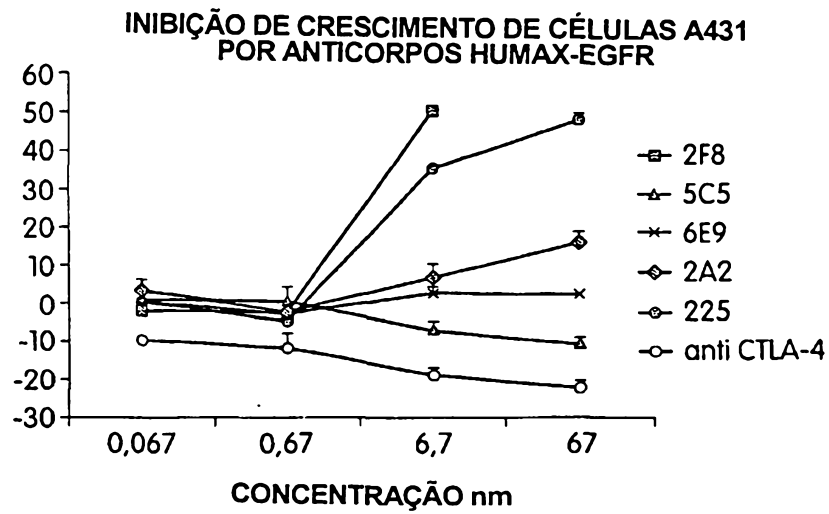


Fig. 11A

PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO (%)

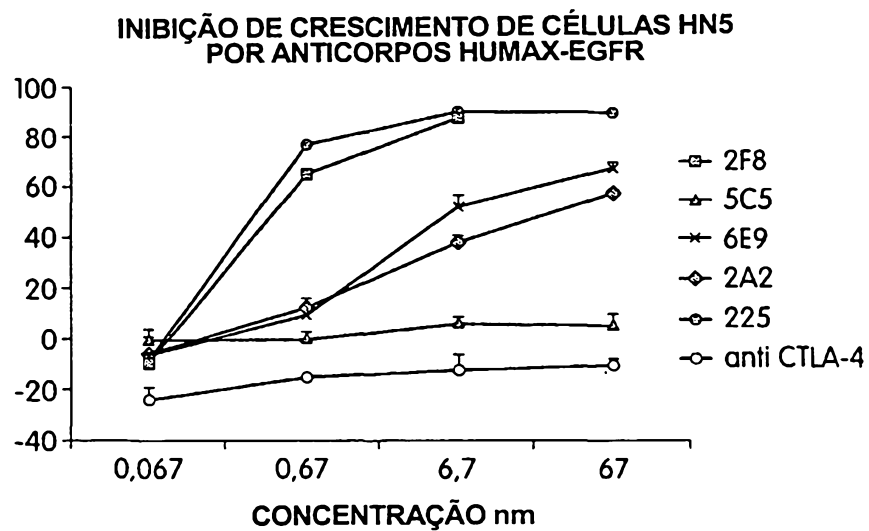


Fig. 11B

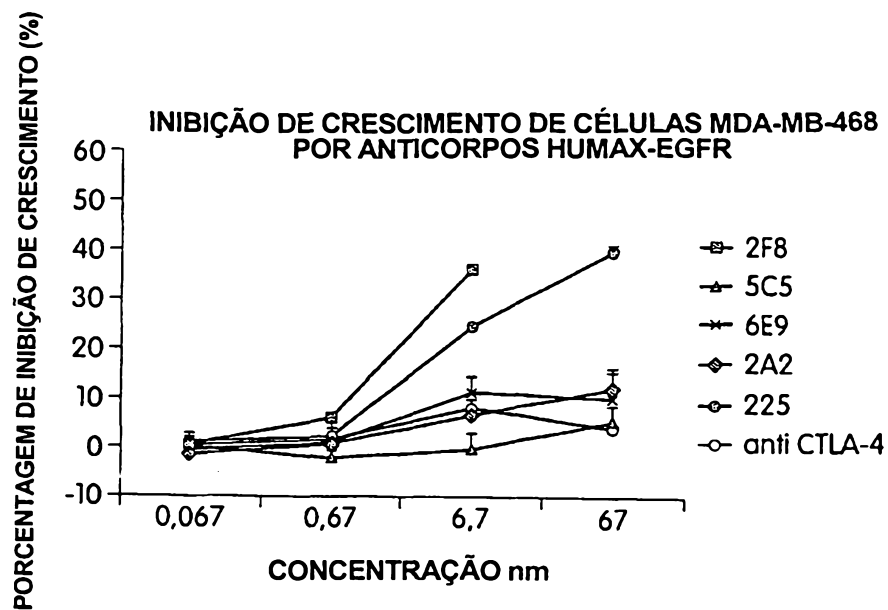


Fig. 11C

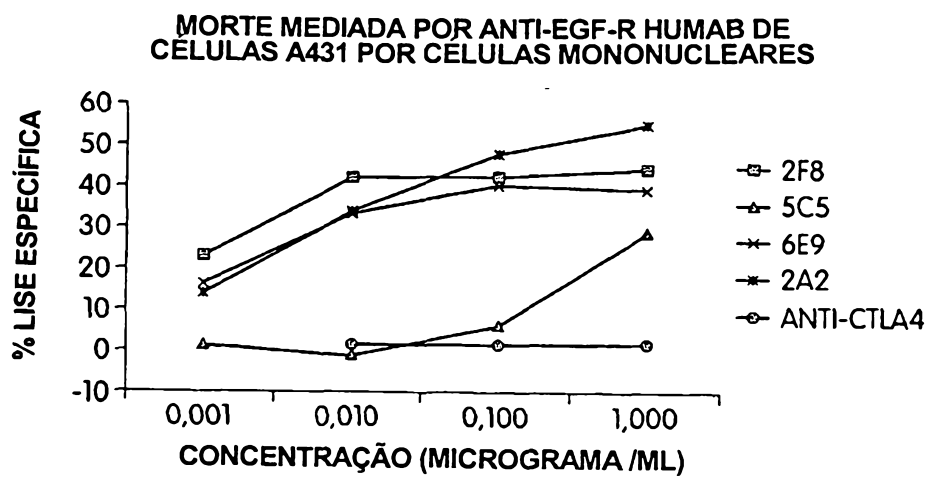


Fig. 12

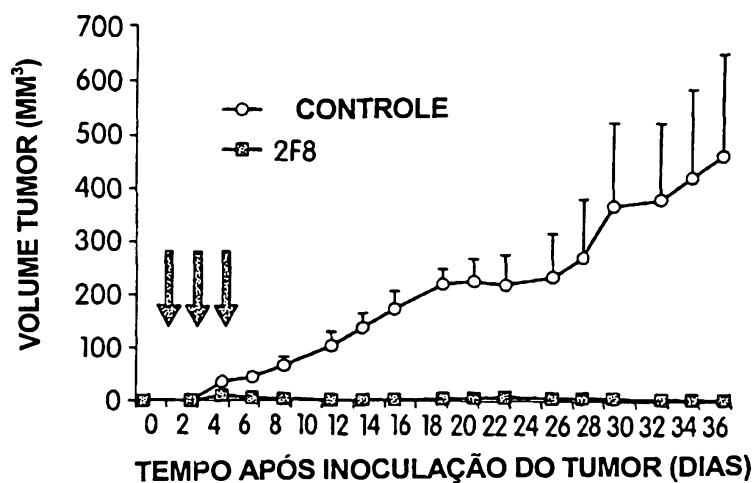


Fig. 13

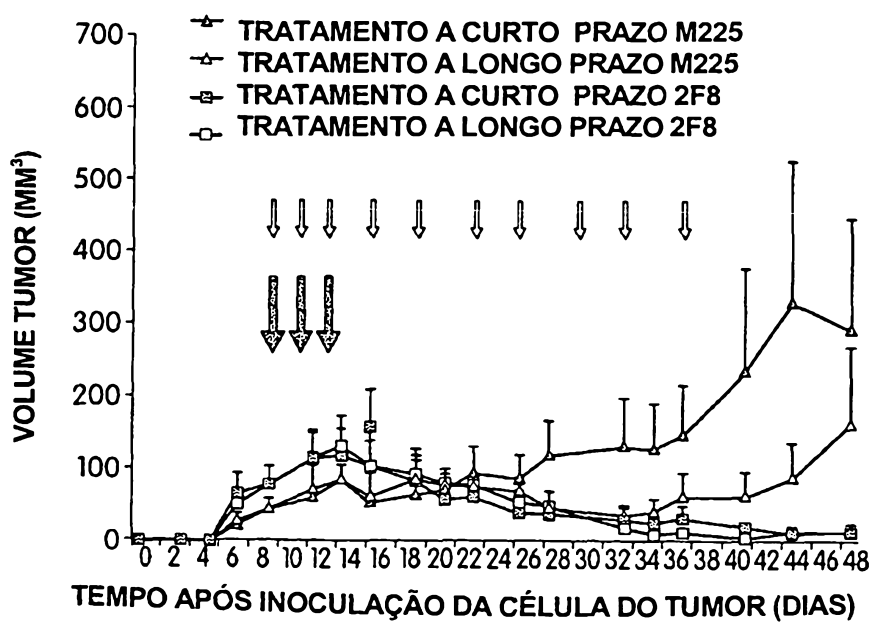


Fig. 14

ANTI-EGFR 2F8 VL

SEGMENTO -V : L18
 SEGMENTO J : JK4

```

      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   D   I   S   S   A   L   V   W   Y
55  GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AGT GCT TTA GTC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   E   S   G   T   D   F   T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GAA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      -----
      F   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
  
```

Fig. 15A

ANTI- EGFR 2F8 VL

SEGMENTO -V: VH3-33

SEGMENTO D: D3-10

SEGMENTO J: JH4B

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

55 R L S C A A S G F T F S T Y G M H W
 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG CAC TGG

CDR2

109 V R Q A P G K G L E W V A V I W D D
 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

CDR2

163 G S Y K Y Y G D S V K G R F T I S R
 GGA AGT TAT AAA TAC TAT GGA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

CDR3

271 T A V Y Y C A R D G I T M V R G V M
 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGT ATT ACT ATG GTT CGG GGA GTT ATG

CDR3

325 K D Y F D Y W G Q G T L V T V S S
 AAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

Fig. 15B