



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

(11) PI 0519044-4 B1



(22) Data do Depósito: 14/12/2005

(45) Data de Concessão: 17/11/2020

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL DIRECIONADO CONTRA O ANTÍGENO CD20 E SEU USO

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/02; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: 15/12/2004 FR 0413320.

(73) Titular(es): LABORATOIRE FRANÇAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES.

(72) Inventor(es): CHRISTOPHE DE ROMEUF; JEAN-LUC TEILLAUD; JEAN-FRANÇOIS PROST; CHRISTINE GAUCHER.

(86) Pedido PCT: PCT FR2005003123 de 14/12/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/064121 de 22/06/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/06/2007

(57) Resumo: ANTICORPO CITOTÓXICO DIRECIONADO CONTRA PROLIFERAÇÕES HEMATOPOÉTICAS LINFÓIDES DO TIPO B. A presente invenção se refere a um anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20, onde a região de cada uma das cadeias leves do anticorpo é codificada por uma seqüência que compartilha pelo menos 70% de identidade com a seqüência de ácido nucléico murino SEQ ID No. 5, a região variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo é codificada por uma seqüência que compartilha pelo menos 70% de identidade com a seqüência de ácido nucléico murino SEQ ID No. 7, e as regiões constantes de cadeias leves e pesadas do anticorpo são regiões constantes de uma espécie não-murino, e se refere também à ativação de receptores FcγRIIIA em células efectoras imunológicas, e à fabricação de drogas especialmente para o tratamento da leucemia ou linfoma.

RELATÓRIO DESCRITIVO

Pedido de Patente de Invenção para “ANTICORPO MONOCLONAL DIRECIONADO CONTRA O ANTÍGENO CD20 E SEU USO”.

[001] A presente invenção se refere a um anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20 em que as regiões variáveis de cada uma das cadeias leves são codificadas por seqüências que compartilham ao menos 70% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 5, as regiões variáveis de cada uma das cadeias pesadas são codificadas por seqüências que compartilham ao menos 70% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 7, e as regiões constantes das cadeias leves e pesadas são regiões constantes de uma espécie não-murina; e se refere também ao uso de tal anticorpo para ativar receptores Fc γ RIII em células imunológicas efectoras e para a fabricação de uma droga, em particular para o tratamento de leucemia ou linfoma.

Introdução e Estado da Técnica

[002] O antígeno CD20 é uma proteína trans-membranosa hidrofóbica com um peso molecular de 35-37 kDa que está presente na superfície de linfócitos B maduros (Valentine et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (22): 8085-8089; Valentine et al. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264 (19): 11282-11287). Ele é expresso durante o desenvolvimento de linfócitos B (células B) a partir do estágio prematuro pré-B até a diferenciação em plasmócitos, um estágio no qual aquela expressão desaparece. O antígeno CD20 está presente tanto em linfócitos B normais como malignos. Mais especificamente, o antígeno CD20 é expresso na maior parte (80%) dos linfomas de fenótipo-B: por exemplo, ele é expresso em mais de 90% dos linfomas de célula B não-Hodgkin (NHL), e em mais do que 95% da Leucemia Linfocítica Crônica tipo-B (B-CLL). O antígeno CD20 não é expresso em células-tronco hematopoiéticas e em plasmócitos.

[003] A função do CD20 ainda não foi totalmente esclarecida, mas ele pode agir como um canal de cálcio e estar envolvido na regulação dos primeiros estágios da diferenciação (Golay et al. (1985) *J. Immunol.* 135 (6): 3795-3801) e da

proliferação (Tedder et al. (Ago. 1986) *Eur. J. Immunol.* 16(8): 881-887) de linfócitos B.

[004] Conseqüentemente, embora ainda haja alguma incerteza com relação ao seu papel na ativação e proliferação de células B, o antígeno CD20 é, devido à sua localização, um alvo importante para o tratamento de condições que envolvem células B tumorosas, tais como NHL ou B-CLL, por exemplo, utilizando-se anticorpos que reconhecem especificamente o CD20. Além disso, o antígeno é um alvo ideal porque é uma proteína membranosa da qual nenhuma modulação de expressão ou polimorfismo é conhecido.

[005] Apenas um anticorpo monoclonal anti-CD20 não radioativamente marcado, o Rituxan[®] (Genentech) está atualmente disponível comercialmente para o tratamento do linfoma de célula-B. Ele mostra resultados clínicos encorajadores em pacientes com NHL quando associado à quimioterapia. Sua eficiência, no entanto, permanece inconstante e freqüentemente medíocre quando ele é utilizado sozinho (Teeling *et al.* (2004) *Blood* 104 (6): 1793-1800).

[006] Além disso, o Rituxan[®] tem um efeito apenas medíocre em células B na B-CLL. Este baixo grau de eficiência foi correlacionado a vários fenômenos: por um lado, as células-B do B-CLL expressam o CD20 apenas em quantidades relativamente pequenas e, por outro lado, o Rituxan[®] induz níveis de atividade de ADCC (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo) muito baixos contra essas células *in vitro*. Essas duas observações podem explicar a correlação que foi observada entre o nível de expressão de CD20 em tumores (por citometria de fluxo quantitativa) e a reação aos tratamentos.

[007] Como a B-CLL é a forma mais comum de leucemia em países ocidentais, e tratamentos de quimioterapia de altas doses por vezes se mostram insuficientes e envolvem efeitos colaterais que levam à aplasia hematopoiética e imunodeficiência, os anticorpos monoclonais parecem ser uma abordagem inovadora. É portanto de grande importância o desenvolvimento de anticorpos que sejam capazes de alvejar especificamente o antígeno CD20, e que permitam que células tumorosas tais como a B-CLL, que apenas expressam este antígeno a um grau limitado, sejam destruídas.

[008] Os anticorpos 2F2 e 7D8 propostos pela Genmab (Teeling et al. (2004) Blood 104(6): 1793-1800) para o tratamento da B-CLL, têm uma capacidade de ativar o complemento maior do que a induzida pelo Rituxan[®]. Esses anticorpos, no entanto, têm uma baixa atividade de ADCC, semelhante à do Rituxan[®]. Ainda assim, alguns clínicos demonstraram que a ativação do complemento é causa de efeitos colaterais adversos, uma vez que os anticorpos geram um sistema de ativação que leva à produção de moléculas (em particular, anafilatoxinas) que realizam uma ampla variedade de atividades não específicas (reações inflamatórias, alérgicas ou vasculares, etc.). Além disso, estes anticorpos ainda se encontram em estágio de pesquisa e sua eficiência clínica ainda precisa ser avaliada.

[009] No pedido de patente FR03/02713 (WO 2004/029092), o presente Depositante descreve um anticorpo anti-CD20 que pode ser produzido na linhagem YB2/0 e que foi selecionado por sua habilidade de induzir uma alta atividade de ADCC e um alto nível de produção de IL-2 pela célula Jurkat-CD16 em comparação com o Rituxan[®]. Há uma necessidade significativa de novos anticorpos anti-CD20 que irão permitir que a faixa de doenças de célula-B tratadas utilizando-se as imunoterapias atualmente disponíveis seja estendida; este é particularmente o caso das doenças de célula-B nas quais o antígeno CD20 é expresso em um grau pequeno nas populações de células B envolvidas, e para as quais não existem imunoterapias satisfatórias.

[010] É com este propósito em mente que o presente Depositante desenvolveu novos anticorpos CD20 que apresentam uma atividade ADCC particularmente alta em comparação com o Rituxan[®].

Descrição

[011] Um primeiro objeto da invenção, portanto, se refere a um anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20 no qual a região variável de cada uma das cadeias leves é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 70% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 5, a região variável de cada uma das cadeias pesadas é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 70% de identidade seqüencial com a

seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 7, e as regiões constantes das cadeias leves e pesadas são regiões constantes de uma espécie não-murina.

[012] Os anticorpos são feitos de cadeias pesadas e leves unidas entre si por ligações dissulfeto. Cada cadeia é composta, na posição N-terminal, por uma região (ou domínio) variável (codificada por genes V-J rearranjados para as cadeias leves e por genes V-D-J rearranjados para as cadeias pesadas) específica do antígeno contra o qual o anticorpo se direciona e, na posição C-terminal, por uma região constante composta por um domínio singular CL para as cadeias leves, ou por vários domínios para as cadeias pesadas.

[013] Para os propósitos da invenção, as expressões “anticorpos monoclonais” ou “composição de anticorpo monoclonal” se referem a uma preparação de moléculas de anticorpo que possuem especificidades idênticas e únicas.

[014] O anticorpo de acordo com a invenção, no qual as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas são de uma espécie que é diferente daquela das regiões constantes das cadeias leves e pesadas, é chamado de anticorpo “quimérico”.

[015] As seqüências de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 5 e SEQ ID No. 7 provêm códigos para o domínio variável de cada uma das cadeias leves e para o domínio variável de cada uma das cadeias pesadas respectivamente, do anticorpo produzido pelo hibridoma murino CAT-13.6E12, disponível no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)* sob o número ACC 474. Este hibridoma produz um anticorpo monoclonal IgG2a, tipo-k murino direcionado contra o CD20.

[016] Estas seqüências murinas foram escolhidas para a derivação das seqüências das regiões variáveis dos anticorpos de acordo com a invenção por causa da especificidade do anticorpo murino CAT-13.6E12 para o antígeno CD20, sendo o antígeno reconhecido também pelo Rituxan[®]. As regiões variáveis dos anticorpos de acordo com a invenção compartilham ao menos 70% de identidade com as seqüências SEQ ID No. 5 e SEQ ID No. 7, com essa identidade seqüencial provendo os anticorpos de acordo com a invenção com uma especificidade que é idêntica à do anticorpo murino CAT-13.6E12. Preferivelmente, esta identidade

seqüencial também provê o anticorpo de acordo com a invenção com uma afinidade ao alvo que é idêntica à do anticorpo murino CAT-13.6E12.

[017] Adicionalmente, o presente Depositante demonstrou surpreendentemente que o anticorpo murino CAT-13.6E12 tem a habilidade de induzir a secreção de IL-2 na presença de células Jurkat-CD16 que expressam ectodomínios do receptor Fc γ R11A (como mostrado na Figura 11), indicando uma forte ligação entre o anticorpo murino e o CD16 (Fc γ R11A) humano, o que mais uma vez motivou a escolha feita pelo presente Depositante.

[018] Adicionalmente, nos anticorpos de acordo com a invenção, as regiões constantes das cadeias leves e pesadas são de uma espécie não murina. Assim, todas as espécies e famílias de mamíferos não murinos podem ser utilizadas, em particular humanos, macacos, murinos (com exceção de camundongos), porcinos, bovinos, eqüinos, felinos, caninos, e também pássaros.

[019] Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser construídos utilizando-se técnicas convencionais de DNA recombinante, bem conhecidas por aqueles versados na técnica, e mais particularmente utilizando-se as técnicas de construção de anticorpos “quiméricos” descritas, por exemplo, em Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855, onde a tecnologia de DNA recombinante é utilizada para substituir a região constante de uma cadeia pesada e/ou a região constante de uma cadeia leve em um anticorpo de um mamífero não humano, pelas regiões correspondentes em uma imunoglobulina humana. Uma modalidade particular será ilustrada abaixo.

[020] Vantajosamente, a região variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 80% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 5, e a região variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 80% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 7.

[021] Vantajosamente, a região variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 90% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos

nucleicos murinos SEQ ID No. 5, e a região variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 90% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7.

[022] Vantajosamente, a região variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 95% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 5, e a região variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 95% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7.

[023] Vantajosamente, a região variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 99% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 5, e a região variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência que compartilha ao menos 99% de identidade seqüencial com a seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7.

[024] Vantajosamente, a invenção também se refere a qualquer anticorpo no qual as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas incluem uma ou mais substituições, inserções ou remoções de um ou mais aminoácidos, com estas modificações seqüenciais se conformando aos níveis percentuais de identidade seqüencial definidos acima, sem afetar a afinidade ou a especificidade do anticorpo com relação ao alvo.

[025] Os anticorpos da invenção são também quaisquer anticorpos que incluam os RDCs (Regiões Determinantes Complementares) do anticorpo CAT-13.6E12, em combinação com regiões FU (fundamentais) (regiões altamente conservadas das regiões variáveis, também conhecidas como regiões “estruturais”). Tais anticorpos possuem afinidades e especificidades que são comparáveis, e preferivelmente idênticas, às do anticorpo murino CAT-13.6E12.

[026] Preferivelmente, a região variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência de ácidos

nucleicos murinos SEQ ID No. 5 ou por uma seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 25, e a região variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção é codificada por uma seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7.

[027] Em uma modalidade da invenção, um anticorpo de acordo com a invenção é conseqüentemente um anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20, no qual a região variável de cada uma das cadeias leves é codificada por uma seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 5, a região variável de cada uma das cadeias pesadas é codificada por uma seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7, e as regiões constantes das cadeias leves e pesadas são regiões constantes de uma espécie não-murina.

[028] Em uma segunda modalidade, o anticorpo de acordo com a invenção é conseqüentemente um anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20, no qual a região variável de cada uma das cadeias leves é codificada por uma seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 25, a região variável de cada uma das cadeias pesadas é codificada por uma seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7, e as regiões constantes das cadeias leves e pesadas são regiões constantes de uma espécie não-murina.

[029] Em ambas as modalidades, os anticorpos diferem em suas seqüência nucleotídicas em um único nucleotídeo: o nucleotídeo localizado na posição 318 na SEQ ID No. 5 e na SEQ ID No. 25, que corresponde a uma citosina e a uma adenina respectivamente.

[030] Os anticorpos da invenção de acordo com estas modalidades possuem especificidades e afinidades com relação ao antígeno alvo, o CD20, que são comparáveis, e preferivelmente idênticas, às do anticorpo murino CAT-13.6E12.

[031] Preferivelmente, as regiões constantes de cada uma das cadeias leves e de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção são regiões constantes humanas. Nesta modalidade preferida da invenção, a imunogenicidade do anticorpo é reduzida em humanos e, conseqüentemente, a eficiência dos anticorpos é melhorada após administrações terapêuticas em humanos.

[032] De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a região constante de cada uma das cadeias leves do anticorpo da invenção é do tipo κ . Quaisquer alótipos são adequados para a implementação da invenção, por exemplo, $Km(1)$, $Km(1, 2)$, $Km(1, 2, 3)$ ou $Km(3)$, mas o alótipo preferido é o $Km(3)$.

[033] De acordo com uma outra modalidade adicional, a região constante de cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é do tipo λ .

[034] De acordo com um aspecto específico da invenção, e em particular quando as regiões constantes de cada uma das cadeias leves e de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção são regiões humanas, a região constante de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo de acordo com a invenção é do tipo γ . De acordo com esta alternativa, a região constante de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo pode ser do tipo γ_1 , γ_2 ou γ_3 , com estes três tipos de região constante exibindo a característica específica de união ao complemento humano, ou até mesmo do tipo γ_4 . Anticorpos que possuem regiões constantes de tipo γ para cada uma das cadeias pesadas pertencem à classe IgG. As imunoglobulinas G (IgG) são hetero-dímeros compostos por 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves, unidas entre si por ligações de di-sulfeto. Cada cadeia é composta, na posição N-terminal, por uma região variável ou domínio (codificado por genes V-J rearranjados para as cadeias leves e por genes V-D-J para as cadeias pesadas) específica ao antígeno contra o qual o anticorpo é direcionado e, na posição C-terminal, por uma região constante composta por um domínio singular CL para a cadeia leve, ou por 3 domínios (CH_1 , CH_2 e CH_3) para a cadeia pesada. A combinação dos domínios variáveis e dos domínios CL e CH_1 das cadeias pesadas e leves compõe os fragmentos Fab que são ligados às regiões Fc através de uma região altamente flexível de articulação que permite que cada fragmento Fab se ligue a seu antígeno alvo enquanto que a região Fc, mediadora das propriedades efectoras do anticorpo, permanece acessível às moléculas efectoras tais como os receptores $Fc\gamma R$ e C1q. A região Fc, composta por ambos os domínios globulares CH_2 e CH_3 , é glicosilada no domínio CH_2 , com um N-glicano biantenário de tipo lactosamina ligado à Asn 297 presente em cada uma das 2 cadeias.

[035] Preferivelmente, a região constante de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo é do tipo $\gamma 1$, porque tal anticorpo exibe a habilidade de induzir atividade ADCC na maior parte dos indivíduos (humanos). Neste aspecto, qualquer alótipo é adequado para a implementação da invenção, por exemplo, G1m(3), G1m(1, 2, 17), G1m(1, 17) ou G1m(1, 3). Preferivelmente, o alótipo é o G1m(1, 17).

[036] De acordo com um aspecto particular da invenção, a região constante de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo é do tipo $\gamma 1$, e é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 23, com a região constante de cada uma das cadeias leves sendo codificada pela seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 21. Tal anticorpo conseqüentemente inclui uma região variável murina e uma região constante humana, com cadeias pesadas do tipo $\gamma 1$. Este anticorpo, portanto, pertence à sub-classe IgG1. De acordo com a modalidade do anticorpo de acordo com a invenção, o anticorpo possui duas cadeias leves, das quais o domínio variável é codificado pela seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 5 ou seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 25., e da qual a região constante humana é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos SEQ ID No. 21, e duas cadeias pesadas, das quais o domínio variável é codificado pela seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7 e das quais a região constante é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 23.

[037] Preferivelmente, cada uma das cadeias leves do anticorpo de acordo com a invenção é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 13 ou pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 27, e cada uma das cadeias pesadas é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19. A seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 13, que provê código para cada uma das cadeias leves do anticorpo, é obtida pela fusão da seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 5, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo, com a seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 21, que provê código para a região constante de cada uma das cadeias leves do anticorpo.

[038] A seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 27, que provê código para cada uma das cadeias leves do anticorpo, é obtida pela fusão da seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 25, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo, com a seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 21, que provê código para a região constante de cada uma das cadeias leves do anticorpo.

[039] A seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19, que provê código para cada uma das cadeias pesadas do anticorpo, é obtida pela fusão da seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 7, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo, com a seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 23, que provê código para a região constante de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo.

[040] De acordo com um aspecto particular da invenção, quando cada uma das cadeias leves do anticorpo é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 13, e cada uma das cadeias pesadas do anticorpo é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19, a seqüência peptídica de cada uma das cadeias leves, deduzidas da seqüência de ácidos nucleicos SEQ ID No. 13, é a seqüência SEQ ID No. 14, e a seqüência peptídica de cada uma das cadeias pesadas, deduzidas da seqüência de ácidos nucleicos SEQ ID No. 19, é a seqüência SEQ ID No. 20.

[041] De acordo com um aspecto particular adicional da invenção, quando cada uma das cadeias leves do anticorpo é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 27, e cada uma das cadeias pesadas do anticorpo é codificada pela seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19, a seqüência peptídica de cada uma das cadeias leves, deduzidas da seqüência de ácidos nucleicos SEQ ID No. 27, é a seqüência SEQ ID No. 28, e a seqüência peptídica de cada uma das cadeias pesadas, deduzidas da seqüência de ácidos nucleicos SEQ ID No. 19, é a seqüência SEQ ID No. 20.

[042] As seqüências peptídicas SEQ ID No. 14 e SEQ ID No. 28 diferem apenas no aminoácido presente na posição 106 de em cada uma destas duas

seqüências. O aminoácido localizado na posição 106 é a lisina (K) na seqüência SEQ ID No. 28; ele é a asparagina (N) na seqüência SEQ ID No. 14.

[043] A invenção também se refere a anticorpos nos quais cada uma das cadeias leves codificadas pela seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos compartilha ao menos 70% de homologia ou identidade com a seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 13, e cada uma das cadeias pesadas codificadas pela seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos compartilha ao menos 70% de homologia ou identidade com a seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19, sendo que estas modificações não prejudicam adversamente a especificidade do anticorpo nem as suas atividades efectoras, tais como a atividade ADCC (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo).

[044] Em uma maneira particularmente vantajosa, o anticorpo da invenção é produzido por uma linhagem de células de hibridoma de rato. A linhagem que produz o anticorpo de acordo com a invenção é uma característica importante já que provê o anticorpo com algumas de suas propriedades particulares. Com efeito, o método de produção do anticorpo induz as modificações de glicosilação, que podem variar de uma linhagem celular para a outra, e conseqüentemente provê anticorpos que possuem estruturas primárias idênticas com propriedades funcionais diferentes.

[045] Em uma modalidade preferida, o anticorpo é produzido na linhagem de hibridomas de rato YB2/0 (célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, registrada no *American Type Culture Collection under ATCC* número CRL-1662). Esta linhagem foi escolhida por causa de sua habilidade em produzir anticorpos com atividade ADCC melhorada em comparação com anticorpos com as mesmas estruturas primárias produzidas, por exemplo, em células CHO.

[046] De acordo com uma modalidade específica, um anticorpo preferido de acordo com a invenção é o anticorpo EMAB6 produzido pelo clone R509, registrado em 8 de Novembro de 2004 sob o número de registro CNCM I-3314 no *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)*. Cada uma das cadeias leves do anticorpo EMAB6 é codificada pela seqüência de ácidos nucléicos

quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 13, e cada uma das cadeias pesadas é codificada pela seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19. Este anticorpo quimérico compete com o anticorpo murino CAT-13.6E12 na união com o CD20 e possui uma atividade citotóxica que é muito maior do que a do Rituxan®, o que pode ser atribuído em parte à glicosilação específica do N-glicano da cadeia pesada destes anticorpos (ver Exemplo 4). Com efeito, uma característica específica do clone R509 é que ele produz uma composição de anticorpos EMAB6 com uma razão fucose/galactose menor do que 0,6, o que foi demonstrado, no pedido de patente FR 03 12229, ser ideal para prover o anticorpo com forte atividade ADCC. Este anticorpo é, portanto, particularmente interessante como uma ferramenta terapêutica para o tratamento de condições nas quais as células alvo expressam o CD20.

[047] Em uma modalidade adicional específica, um outro anticorpo preferido de acordo com a invenção é o anticorpo EMAB603 produzido pelo clone R603, registrado em 29 de Novembro de 2005 sob o número de registro CNCM I-3529 no *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)*. Cada uma das cadeias leves do anticorpo EMAB603 é codificada por uma seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 27, e cada uma das cadeias pesadas é codificada pela seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19. Este anticorpo quimérico compete com o anticorpo murino CAT-13.6E12 na união com o CD20 e possui uma atividade citotóxica que é muito maior do que a do Rituxan®, o que pode ser atribuído em parte à glicosilação específica do N-glicano da cadeia pesada destes anticorpos (ver Exemplo 3). Com efeito, uma característica específica do clone R603 é que ele produz uma composição de anticorpos EMAB6 com uma razão fucose/galactose menor do que 0,6 (ver Exemplo 4), o que foi demonstrado, no pedido de patente FR 03 12229, ser ideal para prover o anticorpo com forte atividade ADCC. Este anticorpo é, portanto, particularmente interessante como uma ferramenta terapêutica para o tratamento de condições nas quais as células alvo expressam o CD20.

[048] Um outro objeto da invenção se refere ao vetor pEF-EMAB6-K para a expressão da cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção, contendo a seqüência SEQ ID No. 12. Este vetor é o vetor que permite um anticorpo de acordo com a invenção, do qual a cadeia leve é codificada pela seqüência de ácidos nucléicos SEQ ID No. 13, da qual a seqüência peptídica deduzida é a seqüência SEQ ID No. 14, a ser expressa. Este vetor é uma molécula de ácido nucléico dentro da qual a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 5, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo, e a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 21, que provê código para as regiões constantes de cada uma das cadeias leves do anticorpo, foram inseridas para serem introduzidas e mantidas em uma célula hospedeira. Ele permite que fragmentos de ácidos nucléicos estranhos sejam expressos na célula hospedeira já que ele possui seqüências (promotores, seqüência de poliadenilação, genes de seleção) que são essenciais a esta expressão. Tais vetores são bem conhecidos por aqueles versados na arte e podem ser, sem a implicação de limitação, um adeno-vírus, um retro-vírus, um plasmídeo ou um bacteriófago. Além disso, qualquer célula mamária pode ser utilizada como uma célula hospedeira, ou seja, como uma célula que expresse o anticorpo de acordo com a invenção, por exemplo, YB2/0, CHO, CHO dhfr- (por exemplo, CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NSO, 293, BHK or COS.

[049] Um outro objeto da invenção se refere ao vetor pEF-EMAB6-H para a expressão da cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção, contendo a seqüência SEQ ID No. 18. Este vetor é o vetor que permite um anticorpo de acordo com a invenção, do qual a cadeia pesada é codificada pela seqüência de ácidos nucléicos SEQ ID No. 19, da qual a seqüência peptídica deduzida é a seqüência SEQ ID No. 20, a ser expressa. Este vetor é uma molécula de ácido nucléico dentro da qual a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 7, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo, e a seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 23, que provê código para as regiões constantes de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo, foram inseridas para serem introduzidas e mantidas em uma célula hospedeira. Ele permite que estes fragmentos de ácidos nucléicos estranhos sejam expressos na célula

hospedeira já que ele possui seqüências (promotores, seqüência de poliadenilação, genes de seleção) que são essenciais a esta expressão. Da mesma forma indicada anteriormente, este vetor pode ser, por exemplo, um plasmídeo, um adeno-vírus, um retro-vírus ou um bacteriófago, e a célula hospedeira pode ser qualquer célula mamária, por exemplo, YB2/0, CHO, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NS0, 293, BHK or COS.

[050] Um anticorpo produzido pela co-expressão dos vetores pEF-EMAB6-K e pEF-EMAB6-H na célula YB2/0 é ilustrado pelo anticorpo anti-CD20 EMAB6, produzido pelo clone R509 (registrado sob o número de registro CNCM I-3314 no CNCM). Este anticorpo induz uma citotoxicidade que é muito maior do que a induzida pelo Rituxan[®], tanto em células de pacientes com B-CLL (nas quais o antígeno CD20 é expresso em níveis baixos) como em células Raji utilizadas como modelo e que expressam o CD20 em densidades mais altas em comparação com pacientes com B-CLL. Além disso, o anticorpo EMAB6 induz uma secreção de IL-2 (interleucina 2) em células Jurkat-CD16 que se encontra em níveis muito mais altos do que com Rituxan[®]. Como o anticorpo EMAB6 pode ser produzido pelo desenvolvimento do clone R509 em um meio de cultura e sob condições que permitam que os vetores descritos acima sejam expressos, ele é, portanto, uma ferramenta interessante para o avanço da terapia e do diagnóstico das doenças de célula-B nas quais o antígeno CD20 está envolvido, mais especificamente a B-CLL, assim como para pesquisas nesta área.

[051] Um objeto particular da invenção é uma linhagem celular estável que expresse o anticorpo de acordo com a invenção.

[052] Vantajosamente, a linhagem celular estável que expressa o anticorpo de acordo com a invenção é selecionada de um grupo consistindo em: SP2/0, YB2/0, IR983F, mielomas tais como o Namalwa ou qualquer outra célula de origem humana tal como a PERC6, as linhagens CHO, em particular CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), ou outras linhagens escolhidas a partir de Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K⁶H⁶, NSO, SP2/0-Ag 14 e P3X63Ag8.653.

[053] A linhagem utilizada é preferivelmente a linhagem de células de hibridoma de rato YB2/0. Esta linhagem foi escolhida por causa de sua habilidade

em produzir anticorpos com atividade ADCC melhorada em comparação com anticorpos com a mesma estrutura primária produzida, em células CHO.

[054] De acordo com um aspecto particular da invenção, a linhagem celular estável que expressa um anticorpo de acordo com a invenção e que é mais especificamente escolhido a partir do grupo descrito acima, possui os dois vetores de expressão pEF-EMAB6-K e pEF-EMAB6-H incorporados conforme descrito acima.

[055] Um aspecto específico da invenção se refere ao clone R509, registered sob o número de registro CNCM I-3314 no *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)*.

[056] Um aspecto específico da invenção se refere ao clone R603, registered sob o número de registro CNCM I-3529 no *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)*.

[057] Um outro objeto da invenção se refere a um fragmento de DNA contendo a seqüência SEQ ID No. 19 que provê código para a cadeia pesada de um anticorpo de acordo com a invenção. A seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 19 provê código para cada uma das cadeias pesadas do anticorpo. Ela é obtida pela fusão da seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 7, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo, com a seqüência de ácidos nucléicos humanos SEQ ID No. 23, que provê código para a região constante de cada uma das cadeias pesadas do anticorpo.

[058] Um outro objeto específico da invenção se refere a um fragmento de DNA contendo a seqüência SEQ ID No. 13, que provê código para a cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção. A seqüência de ácidos nucléicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 13 provê código para cada uma das cadeias leves do anticorpo. Ela é obtida pela fusão da seqüência de ácidos nucléicos murinos SEQ ID No. 5, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo, com a seqüência de ácidos nucléicos humanos SEQ ID No. 21, que provê código para a região constante de cada uma das cadeias leves do anticorpo.

[059] Um outro objeto específico da invenção se refere a um fragmento de DNA contendo a seqüência SEQ ID No. 27, que provê código para a cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção. A seqüência de ácidos nucleicos quiméricos murinos-humanos SEQ ID No. 27 provê código para cada uma das cadeias leves do anticorpo. Ela é obtida pela fusão da seqüência de ácidos nucleicos murinos SEQ ID No. 25, que provê código para o domínio variável de cada uma das cadeias leves do anticorpo, com a seqüência de ácidos nucleicos humanos SEQ ID No. 21, que provê código para a região constante de cada uma das cadeias leves do anticorpo.

[060] Um objeto específico da invenção se refere ao uso do anticorpo de acordo com a invenção para ativar, *in vivo* ou *in vitro*, os receptores FcγRIIIA de células imunológicas efetoras. Com efeito, os anticorpos da invenção possuem a característica específica e a vantagem de serem citotóxicos. Assim, eles exibem a atividade de ativar receptores FcγRIIIA com suas regiões Fc. Isto é de considerável interesse já que este receptor é expresso na superfície das células conhecidas como “células efetoras”: a união da região Fc do anticorpo com o seu receptor carregado pela célula efetora causa a ativação dos receptores FcγRIIIA e a destruição das células alvo. São células efetoras, por exemplo, células NK (Assassinas Naturais), macrófagos, neutrófilos, linfócitos CD8, linfócitos Tγδ, células NKT, eosinófilas, basófilas ou mastócitos.

[061] Em um aspecto específico, o anticorpo da invenção é utilizado como uma droga. Vantajosamente, tal droga é utilizada para o tratamento de condições nas quais as células-alvo são células que expressam o CD20, tais como o linfoma maligno de célula B.

[062] De acordo com um aspecto vantajoso, o anticorpo de acordo com a invenção é utilizado para fabricar uma droga para o tratamento de leucemia ou de linfoma.

[063] Um objeto específico da invenção é o uso do anticorpo de acordo com a invenção para a fabricação de uma droga para o tratamento de uma patologia selecionada a partir do grupo consistindo em: leucemia linfoblástica aguda B, linfoma de célula B, linfoma de célula B madura, incluindo Leucemia Linfocítica Crônica Tipo B (B-CLL), linfoma de célula B pequena, leucemia prolinfocítica de

célula B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de célula manto, linfoma folicular, linfoma de zona marginal tipo MALT, linfoma de zona marginal de nódulo com ou sem células B monocitóides, linfoma de zona marginal esplênica (com ou sem linfócitos agressores), leucemia tricoleucocítica, linfoma de célula B grande difusa, linfoma de Burkitt, assim como qualquer disfunção imunológica envolvendo células linfóides B, incluindo doenças auto-imunológicas.

[064] Um outro objeto da invenção é o uso do anticorpo de acordo com a invenção para a fabricação de uma droga para o tratamento de leucemia linfóide.

[065] Um outro objeto da invenção é o uso do anticorpo de acordo com a invenção para a fabricação de uma droga para o tratamento de Leucemia Linfóide Crônica tipo B (B-CLL). Além disso, o anticorpo de acordo com a invenção é particularmente adequado para o tratamento das condições nas quais o antígeno CD20 é expresso menos fortemente em células B e, preferivelmente, da B-CLL (Leucemia Linfóide Crônica tipo B). Neste aspecto, o anticorpo de acordo com a invenção pode ser utilizado em combinação com um ou mais anticorpos adicionais, por exemplo, anticorpos monoclonais direcionados contra um ou mais antígenos expressos em células linfóides, tais como, por exemplo, os antígenos HLA-DR, CD19, CD23, CD22, CD80, CD32 e CD52, para a fabricação de uma droga para o tratamento de leucemia ou de linfoma. Portanto, o anticorpo humanizado Campath-1H[®] (*alentuzumab*, *MabCampathR[®]*) que se direciona a uma molécula que é abundantemente expressa em células linfóides, o antígeno CD52, e que induz a lise celular pela mobilização dos mecanismos efetores hospedeiros (união de complemento, citotoxicidade dependente de anticorpo), é utilizado no tratamento da CLL (Moreton P., Hillmen P. (2003) *Semin. Oncol.* 30(4): 493-501; Rawstron A.C. *et al*, (2004) *Blood* 103(6): 2027-2031; Robak T. (2004) *Leuk. Lymphoma* 45(2): 205-219; Stanglmaier M. *et al*, (2004) *Ann. Hematol.* 83(10): 634-645). Testes clínicos estão também em andamento para avaliar anticorpos ou imunotoxinas que se direcionem aos antígenos HLA-DR, CD22, CD23, CD80 em pacientes com CLL (Mavromatis B.H., Cheson B.D. (2004) *Blood Rev.* 18(2): 137-148; Mavromatis B., Cheson B.D. (2003) *J. Clin. Oncol.* 21(9): 1874-1881, Coleman M. *et al*, (2003) *Clin. Cancer Res.* 9: 3991S-3994S; Salvatore G. *et al*, (2002) *Clin. Cancer Res.* 8: 995-1002).

[066] Em uma modalidade adicional, o anticorpo de acordo com a invenção pode ser utilizado em combinação com células que expressam FcγRs, tais como as célula NK, células NKT (Assassinas Naturais T), linfócitos Tγδ, macrófagos, monócitos ou células dendríticas, ou seja, em combinação com uma terapia celular (Peller S., Kaufman S. (1991) *Blood* 78: 1569, Platsoucas C.D. *et al*, (1982) *J. Immunol.* 129: 2305; Kimby E. *et al*, (1989) *Leukaemia* 3(7): 501-504; Soorskaar D. *et al*, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 87(2): 159-164; Ziegler H.W. *et al*, (1981) *Int. J. Cancer* 27(3): 321-327; Chaperot L. *et al*, (2000) *Leukaemia* 14(9): 1667-1677; Vuillier F., Dighiero G. (2003) *Bull. Cancer.* 90(8-9): 744-750).

[067] Adicionalmente, o anticorpo de acordo com a invenção permite vantajosamente que as doses administradas aos pacientes sejam reduzidas: vantajosamente, a dose de anticorpo administrada ao paciente é 2 vezes, 5 vezes, ou mesmo 10 vezes, 25, vezes, 50 vezes, ou particularmente vantajosas 100 vezes menor do que uma dose de Rituxan[®]. Vantajosamente, a dose de anticorpo administrada ao paciente é entre 2 e 5 vezes, entre 5 e 10 vezes, entre 5 e 25 vezes, entre 5 e 50 vezes, ou mesmo entre 5 e 100 vezes menor do que uma dose de Rituxan[®]. Portanto, o anticorpo de acordo com a invenção, por exemplo o anticorpo EMAB6, pode vantajosamente ser administrado a uma dose menor do que 187,5 mg/m², 75 mg/m², 37,5 mg/m², 15 mg/m², 7,5 mg/m², ou particular e vantajosamente menor do que 3,75 mg/m². A dose administrada é vantajosamente entre 187,5 mg/m² e 75 mg/m², ou entre 75 mg/m² e 37,5 mg/m², entre 75 mg/m² e 15 mg/m², entre 75 mg/m² e 7,5 mg/m², ou mesmo entre 75 mg/m² e 3.75 mg/m².

[068] Portanto, a invenção também se refere a um método para o tratamento de doenças em que as células alvo são células que expressam o CD20, tais como linfoma maligno de célula B, consistindo na administração ao paciente de uma dose eficiente de uma composição contendo um anticorpo de acordo com a invenção. Mais especificamente, o método de tratamento é particularmente adequado para o tratamento de leucemia ou de linfoma. Ainda mais especificamente, ele é um método para o tratamento de uma patologia escolhida a partir de leucemia linfoblástica aguda B, linfoma de célula B, linfoma de célula B madura, incluindo Leucemia Linfocítica Crônica Tipo B (B-CLL), linfoma de

célula B pequena, leucemia prolinfocítica de célula B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de célula manto, linfoma folicular, linfoma de zona marginal tipo MALT, linfoma de zona marginal de nódulo com ou sem células B monocitóides, linfoma de zona marginal esplênica (com ou sem linfócitos agressores), leucemia tricoleucocítica, linfoma de célula B grande difusa, linfoma de Burkitt, assim como qualquer disfunção imunológica envolvendo células linfóides B, incluindo doenças auto-imunológicas, consistindo na administração de uma dosagem eficiente de um anticorpo ou composição de anticorpos de acordo com a invenção.

[069] Um objeto particular da invenção é o uso de um anticorpo de acordo com a invenção para a fabricação de uma droga para o tratamento da doença do enxerto-versus-hospedeiro de forma a tratar sintomas que envolvam as células B dos receptores.

[070] Finalmente, um último objeto da invenção é o uso de um anticorpo de acordo com a invenção para a fabricação de uma droga para o tratamento de rejeição em transplantes de órgãos, em particular do rim.

[071] Estudos recentes (Ratanatharathorn *et al*, (Aug 2003) *Biol. Blood Marrow Transplant* 9(8): 505-511; Becker *et al*, (Jun 2004) *Am. J. Transplant.* 4(6): 996-1001) demonstraram de fato os benefícios dos anticorpos anti-CD20 no tratamento de tais condições.

[072] Aspectos e vantagens adicionais da invenção serão descritos nos exemplos seguintes que devem ser vistos como exemplos ilustrativos e não limitativos do escopo da invenção.

Descrição dos Desenhos

[073] Figura 1: Representação esquemática do vetor CKHu utilizado para a quimerização da cadeia leve kappa dos anticorpos EMAB6 e EMAB603.

[074] Figura 2: Representação esquemática do vetor de expressão pEF-EMAB6-K de cadeia leve utilizado para a produção do anticorpo EMAB6.

[075] Figura 3: Representação esquemática do vetor G1Hu utilizado para a quimerização da cadeia pesada dos anticorpos EMAB6 e EMAB603.

[076] Figura 4: Representação esquemática do vetor de expressão pEF-EMAB6-K de cadeia pesada utilizado para a produção do anticorpo EMAB6.

[077] Figura 5: Competição do anticorpo quimérico EMAB6 para a união do anticorpo murino produzido por CAT-13.6E12 (CAT13) ao CD20 expresso em células Raji.

[078] Figura 6: Atividade citotóxica dependente do complemento dos anticorpos anti-CD20 em células Raji. (A) Rituxan[®]: triângulo aberto, EMAB6: losango fechado. A lise celular é estimada pela medição de LDH intracelular liberado ao sobrenadante. Os resultados são expressos como porcentagens de lise, sendo 100% o valor obtido com Rituxan[®] (a 5.000 ng/mL de anticorpo anti-CD20). Média entre 5 testes. (B) Comparação entre as atividades citotóxicas dependentes de complemento do EMAB6 (losango fechado) e do EMAB603 (losango aberto).

[079] Figura 7: Atividade ADCC induzida por anticorpos anti-CD20 na presença de células Raji. (A) Rituxan[®]: triângulo aberto, EMAB6: losango fechado. A lise celular é estimada pela medição de LDH intracelular liberado ao sobrenadante. Os resultados são expressos como porcentagens de lise, sendo 100% o valor obtido com Rituxan[®] (a 250 ng/mL de anticorpo anti-CD20). Média entre 3 testes. (B) Comparação entre a ADCC induzida por EMAB6 (losango fechado) e por EMAB603 (losango aberto).

[080] Figura 8: Atividade ADCC induzida por anticorpos anti-CD20 na presença de linfócitos B de pacientes com B-CLL. Rituxan[®]: triângulo aberto, EMAB6: losango fechado. Razão E/T = 15. A lise celular é estimada pela medição de calceína liberado ao sobrenadante. Os resultados são expressos como porcentagens de lise, sendo 100% o valor obtido com Rituxan[®] (a 500 ng/mL de anticorpo anti-CD20). Média entre 4 experimentos correspondentes a 4 pacientes diferentes.

[081] Figura 9: Ativação de CD16 (FcγRIIIA) induzida por anticorpos anti-CD20 na presença de células Raji. (A) Rituxan[®]: triângulo aberto, EMAB6: losango fechado. Os resultados são expressos como uma porcentagem de IL-2, conforme medidos em sobrenadantes utilizando-se ELISA; sendo 100% o valor obtido com Rituxan[®] (a 2.500 ng/ml anticorpo anti-CD20). Média entre 4 testes (B). Comparação entre a ativação de CD16 (FcγRIIIA) sendo induzido por EMAB6 (losango fechado) e por EMAB603 (losango aberto).

a. *Primer* de sentido contrário específico para Kappa murino (SEQ ID No. 3)

5' - TTGTTCAAGAAGCACACGACTGAGGCAC -3'

b. *Primer* de sentido contrário específico para G2a murino (SEQ ID No. 4)

5' - GAGTTCAGGTCAAGGTCCTGGCTCAG -3'

[086] Os produtos de VH e V_k PCR resultantes foram clonados para o vetor pCR4Blunt-TOPO (kit de clonagem Zero blunt TOPO PCR, Invitrogen, ref. K2875-20) e seqüenciados. A seqüência de nucleotídeos da região V_k do anticorpo murino CAT-13.6E12 é mostrada como a seqüência SEQ ID No. 5 e a seqüência de peptídeos deduzida é a seqüência SEQ ID No. 6. O gene V_k pertence à classe V_{k4} [Kabat *et al.* (1991) "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*". NIH Publicação 91-3242].

[087] A seqüência de nucleotídeos da região VH do anticorpo murino CAT-13.6E12 é a seqüência SEQ ID No. 7 e a seqüência de peptídeos deduzida é a seqüência SEQ ID No. 8. O gene VH pertence à classe VH1 [Kabat *et al.* (1991) "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*". NIH Publicação 91-3242].

B. Construção de Vetores de Expressão de Cadeias Pesadas e Leves para Anticorpos Quiméricos EMAB6 e EMAB603

1. Vetor Kappa de Cadeia Leve

1.1. Vetor de Cadeia Leve para Anticorpo EMAB6

A seqüência V_k clonada no vetor seqüencial pCR4Blunt-TOPO foi ampliada utilizando-se os seguintes *primers* clonantes:

Primer de sentido de V_k (SEQ ID No. 9)

5' - CTCAGTACTAGT**GCCGCCACC**ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG -3'

A seqüência sublinhada corresponde ao local de restrição SpeI, a seqüência em negrito corresponde à seqüência de consenso Kozak, o iniciador ATG está em itálico.

Primer de sentido contrário de V_k (SEQ ID No. 10)

5' - **TGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGT***CCGGTTTATTTCCAGCCTGGT* -3'

[088] Este *primer* se une às seqüências murinas V_k (em itálico). A seqüência sublinhada corresponde ao local de restrição DraIII.

[089] O produto de V_k PCR contém a seqüência que provê código para o peptídeo de sinal natural do anticorpo murino CAT-13.6E12. Este produto V_k PCR foi então clonado entre os locais SpeI and DraIII da cadeia leve de vetor de quimerização (Fig. 1), que corresponde à seqüência SEQ ID No. 11, em 5' na região constante humana C_k , da qual a seqüência de ácidos nucleicos é a seqüência SEQ ID No. 21, e da qual a seqüência de peptídeos deduzida é a seqüência SEQ ID No. 22. A seqüência humana C_k deste vetor de quimerização havia sido modificada anteriormente por mutagênese silenciosa de forma a criar um local de restrição DraIII para permitir que a clonagem de seqüências murinas V_k ocorressem. Este vetor de quimerização contém um promotor RSV e uma seqüência de poliadenilação de bGH (Hormônio de Crescimento bovino) junto com o gene de seleção dhfr (dihidrofolato reductase).

[090] A seqüência de cadeia leve do anticorpo quimérico EMAB6 codificada por este vetor é mostrada como SEQ ID No. 13 para a seqüência de nucleotídeos e corresponde à seqüência de peptídeos deduzida SEQ ID No. 14.

1.2. Vetor de Cadeia Leve para o Anticorpo EMAB603

[091] O protocolo é o mesmo daquele do vetor de cadeia leve para o anticorpo EMAB6 (ver Exemplo 1, B-1.1), a não ser pelo primer de anti-senso de V_k que é:

b') *Primer* de sentido contrário V_k (SEQ ID No. 29)

5' - **TGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGT** CCGTTTATTTCCAGCCTGGT -3'

[092] Este *primer* une as seqüências de V_k murino (em itálico) à região constante humana (C_k) (em negrito). A seqüência sublinhada corresponde ao local de restrição DraIII.

[093] Este *primer* também introduz a mutação AAC -> AAA (nucleotídeo enquadrado na seqüência de *primers* de sentido contrário SEQ ID No. 29), que corresponde à mutação N106K (ver a seqüência de nucleotídeos e a seqüência de peptídeos deduzida SEQ ID No. 25 e SEQ ID No. 26) com relação à seqüência de V_k natural do CAT-13.6E12 (ver SEQ ID No. 5 e SEQ ID No. 6).

[094] A seqüência de cadeia leve do anticorpo quimérico EMAB603 codificada por este vetor é mostrada como SEQ ID No. 27 para a seqüência de nucleotídeos e corresponde à seqüência de peptídeos deduzida SEQ ID No. 28.

2. Vetor de Cadeia Pesada

[095] Uma abordagem semelhante foi aplicada à quimerização das cadeias pesadas dos anticorpos EMAB6 e EMAB603.

[096] A seqüência de VH clonada no vetor pCR4Blunt-TOPO foi primeiramente antes de tudo ampliada utilizando-se os seguintes primers de clonagem:

a) *Primer* de sentido VH (SEQ ID No. 15)

5' - CTCAGTACTAGT**GCCGCCACC**ATGGGATTCAGCAGGATCTTTCTC -3'

A seqüência sublinhada corresponde ao local de restrição SpeI, a seqüência em negrito corresponde à seqüência de consenso Kozak, o iniciador ATH em itálico.

b) *Primer* de sentido contrário VH (SEQ ID No. 16)

5' - **GACCGAT**GGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC -3'

[097] Este *primer* une as seqüências de VH murino (em itálico) à região constante G1 humana (em negrito). A seqüência sublinhada corresponde ao local de restrição ApaI.

[098] O fragmento de VH ampliado contém a seqüência que provê código para o peptídeo de sinal natural do anticorpo murino CAT-13.6E12. Este produto de VH PCR foi então clonado entre os locais SpeI e ApaI no vetor de quimerização de cadeia pesada (Fig. 3) que corresponde à seqüência SEQ ID No. 17, em 5' da região constante humana γ 1, da qual a seqüência de ácidos nucleicos é a seqüência SEQ ID No. 23 e da qual a seqüência de peptídeos deduzida é a seqüência SEQ ID No. 24. Este vetor de quimerização contém uma seqüência de poliadenilação de promotor RSV e de bGH (Hormônio de Crescimento bovino) assim como um gene de *neo* seleção.

[099] As seqüências de cadeia pesada dos anticorpos quiméricos EMAB6 e EMAB603 codificadas por este vetor são mostradas como SEQ ID No. 19 para a cadeia de nucleotídeos e como SEQ ID No. 20 para a seqüência de peptídeos deduzida.

3. Vetores de Expressão Finais

3.1. Vetores de Expressão do Anticorpo EMAB6

[100] Para a expressão do anticorpo EMAB6, o promotor RSV do vetor de quimerização de cadeia leve kappa (ver Exemplo 1, B-1.1) foi substituído pelo promotor EF-1 alfa humano. O vetor de expressão final de cadeia leve pEF-EMAB6-K é mostrado na Fig. 2 e corresponde à seqüência SEQ ID No. 12.

[101] A seqüência de cadeia leve do anticorpo quimérico EMAB6 codificada por este vetor é mostrada como a SEQ ID No. 13 para a seqüência de nucleotídeos e corresponde à seqüência peptídica deduzida SEQ ID No. 14.

[102] Para a expressão do anticorpo EMAB6, o promotor RSV do vetor de quimerização de cadeia pesada (ver Exemplo 1, B-2) foi substituído pelo promotor EF-1 alfa humano. O vetor de expressão final de cadeia pesada pEF-EMAB6-H assim obtido é mostrado na Fig. 4 e corresponde à seqüência SEQ ID No. 18.

3.2. Vetor de Expressão do anticorpo EMAB603

[103] Um vetor de expressão único contendo unidades de transcrição tanto de cadeias leves como de cadeias pesadas do anticorpo anti-CD20 EMAB603 foi construído a partir de dois vetores de quimerização de cadeia leve e pesada (ver Exemplo 1, B-1.2 e B2 respectivamente) por sub-clonagem no local XhoI do vetor de cadeia pesada, um fragmento BglII-PvuII do vetor de cadeia leve contendo a unidade de transcrição de cadeia leve e o gene *dhfr*. Este vetor de expressão pRSV-HL-EMAB603 inclui dois genes de seleção, ou seja, *neo* (neofosfotransferase II) and *dhfr* (dihidrofolato reductase), junto com duas unidades de transcrição de cadeia leve e pesada sob o controle de um promotor RSV (Figura 12).

Exemplo 2: Produção de Linhagens de Células Derivadas da Linhagem YB2/0 que Produz os Anticorpos Anti-CD20 Quiméricos EMAB6 e EMAB603

[104] A linhagem celular YB2/0 (ATCC # CRL-1662) foi cultivada em meio EMS (Invitrogen, ref. 041-95181M) contendo 5% de plasma de vitelo fetal (JRH Biosciences, ref. 12107). Para transfecção, 5 milhões de células foram eletroporadas (eletroporador Biorad, modelo 1652077) em meio Optimix Equibio, ref. EKITE 1) com 25 µg do vetor de cadeia leve pEF-EMAB6-K (Fig. 2), linearizado com AatII, e 27 µg do vetor de cadeia pesada pEF-EMAB6-H (Fig. 4), linearizado com ScaI, para a expressão do anticorpo EMAB6, ou com o vetor

pRSV-HL-EMAB603, para a expressão do anticorpo EMAB603. As condições de eletroporação aplicadas foram de 230 Volts e 960 microFarads em uma *cuvette* de 0.5-mL. Cada *cuvette* de eletroporação foi então distribuída sobre pratos 5 P96 a uma densidade de 5.000 células/poço.

[105] A colocação em um meio RPMI (Invitrogen, ref 21875-034) contendo 5% de plasma dialisado (Invitrogen, ref. 10603-017), 500 µg/mL de G418 (Invitrogen, ref. 10131-027) e 25 nM de metotrexato (Sigma, ref. M8407), foi realizada 3 dias após a transfecção.

[106] Os sobrenadantes dos poços de transfecção resistentes foram revistados para a presença de imunoglobulina quimérica (Ig) pela aplicação de um exame ELISA específico às seqüências Ig humanas.

[107] Os 10 transfectantes que produzem as maiores quantidades de anticorpos foram ampliados em pratos P24 e seus sobrenadantes re-examinados utilizando-se ELISA para estimar sua produtividade e selecionar, por diluição limitada (40 cells/plate), os três melhores produtores para clonagem.

[108] Após a clonagem, o clone R509.6A4 (R509-33903/046-6H1(1)6A4, produtividade: 17 µg/10⁶ células), aqui chamado de "R509", assim como o clone R603 foram selecionados para a produção dos anticorpos quiméricos EMAB6 e EMAB603 respectivamente e progressivamente aclimatados ao meio de produção de hibridoma CD (Invitrogen, ref. 11279-023).

[109] A produção dos anticorpos quiméricos EMAB6 e EMAB603 foi alcançada pela expansão, em meio de hibridoma CD, da cultura aclimatada obtida pela diluição a 3x10⁵ células/mL em frascos de 75-cm² e de 175-cm² e então diluição a 4.5x10⁵ cells/mL em frascos rolantes. Após o volume máximo ser atingido (1 L), o cultivo foi mantido até que a viabilidade celular fosse de apenas 20%. Após a produção, os anticorpos quiméricos EMAB6 e EMAB603 foram purificados utilizando-se cromatografia de afinidade de proteína A (pureza estimada de HPLC < 95%) e verificados eletroporese de gel de poliacrilamida.

Exemplo 3: Caracterização da Atividade Funcional dos Anticorpos Quiméricos EMAB6 e EMAB603

A. Especificidade

[110] A especificidade do reconhecimento do anticorpo quimérico EMAB6 foi avaliada através do estudo da competição com o anticorpo murino CAT-13.6E12 (CAT13) pela ligação com o antígeno CD20 expresso por células Raji.

[111] Com este propósito, o anticorpo EMAB6 (10 μ L a 0,5 até 50 μ g/mL) foi incubado a 4°C com uma quantidade fixa do anticorpo murino CAT-13.6E12 (10 μ L a 5 μ g/mL) por 20 minutos na presença de células Raji (50 μ L a 4×10^6 células/mL). Após uma lavagem, um anticorpo anti-IgG de camundongo acoplado a ficoeritrina (PE) foi adicionado às células Raji de forma a detectar especificamente a ligação do anticorpo murino CAT-13.6E12. As Intensidades de Fluorescência Médias (MFIs) obtidas na presença de várias concentrações de EMAB6 são convertidas em porcentagens, com 100% correspondendo a ligação a células CAT-13.6E12 na ausência do anticorpo EMAB6.

[112] Uma curva de inibição é conseqüentemente obtida para a ligação do anticorpo CAT-13.6E12 (CAT13) a células Raji na presença de concentrações crescentes de EMAB6 (Fig. 5).

[113] Este estudo demonstra que o processo de quimerização não afetou adversamente a especificidade do anticorpo EMAB6, que de fato compete com o anticorpo murino CAT-13.6E12 paterno pela ligação ao CD20 expresso na superfície de células Raji.

[114] A especificidade de reconhecimento de antígeno do anticorpo EMAB603 é comparável à do anticorpo EMAB6.

B. Atividade Citotóxica Dependente do Complemento

[115] A atividade citotóxica dependente do complemento dos anticorpos EMAB6 e EMAB603 foi examinada com células Raji na presença de plasma de coelho como fonte do complemento. O anticorpo quimérico anti-CD20 Rituxan[®] foi incluído em um teste, para comparação.

[116] Para este teste, as células Raji foram ajustadas para 6×10^5 células/mL em IMDM (Meio de Dulbecco Modificado por Iscove) 5% FCS (Plasma de Vitelo Fetal). Os anticorpos foram diluídos com IMDM+0.5% FCS. A mistura reativa foi composta por 50 μ L de anticorpo, 50 μ L de plasma de filhote de coelho (1/10 IMDM+0.5% FCS diluição de reagente Cedarlane CI. 3441). 50 μ L de células

alvo e meio de 50 μ L IMDM+0.5% FCS. As concentrações finais de anticorpos foram de 5.000, 1.250, 250 e 50 ng/mL. Um controle sem anticorpos foi incluído no teste. Após 1 hora de incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, os pratos foram centrifugados e os níveis de LDH intracelular liberados no sobrenadante estimados utilizando-se um reagente específico (Kit Detector de Citotoxicidade Kit 1 644 793).

[117] A lise percentual foi estimada utilizando-se uma faixa de calibragem obtida utilizando-se várias diluições de células alvo em lise por Triton X100 (2%), correspondentes a 100, 50, 25, e 0% de lise respectivamente.

[118] Os resultados mostrados na Figura 6(A) que tanto o EMAB6 como o Rituxan[®] induzem a lise dependente do complemento das células Raji. Entretanto, a atividade de complemento do EMAB6 foi aparentemente ligeiramente menor do que a do Rituxan[®]. Esta diferença é maior nas baixas concentrações de anticorpos utilizadas nesse teste. Assim, para as concentrações de 50 e 250 ng/mL, a atividade do EMAB6 é da ordem de 45% daquela do Rituxan[®]. Esta diferença se torna menor à medida que a concentração de anticorpos é aumentada, com a % de atividade citotóxica dependente do complemento do anticorpo EMAB6 representando 92% daquela do Rituxan[®] na maior concentração testada, ou seja, 5.000 ng/mL.

[119] Esta menor atividade citotóxica dependente do complemento do anticorpo EMAB6 em comparação com o Rituxan[®] pode ser vista como uma vantagem, uma vez que limita a toxicidade *in vivo* potencial do EMAB6 em comparação com o Rituxan[®], associada à ativação do caminho de passagem de complemento adicional, o que leva à produção de várias moléculas com atividades inflamatórias, alérgicas e vasculares indesejáveis.

[120] A atividade de complemento do anticorpo EMAB603 é mostrada na Fig. 6(B).

C. Atividade ADCC

[121] A citotoxicidade do anticorpo quimérico EMAB6 foi avaliada na presença de células Raji ou de linfócitos B de pacientes com CLL. O anticorpo quimérico anti-CD20 do Rituxan[®] é incluído nos testes para comparação.

[122] A técnica de medição de ADCC de sinalização de calceína utilizada foi a seguinte:

[123] Células NK foram isoladas de PBMCs utilizando-se a técnica de separação em contas magnéticas (MACs) da Myltenyi. As células foram lavadas e re-suspendidas em IMDM+5% FCS (45×10^5 células/mL). As células efectoras e as células alvo foram utilizadas em uma razão de 15/1. As células Raji ou os PBMCs (Células Mononucleares de Sangue Peiférico) de pacientes com B-CLL obtidas após o tratamento Ficoll (> 95% de células B) foram sinalizadas anteriormente com calceína (1 mL de células a 3×10^6 células/mL em IMDM+5% FCS+20 μ L calceína (20 μ M), 20 min de incubação a 37°C e então lavagem com HBSS (Solução Salina Tamponada de Hank)) e ajustadas para 3×10^5 células/mL em IMDM+5% FCS. Os anticorpos foram diluídos com IMDM+0.5% FCS (concentrações finais: 500; 50; 5; 0,5; 0,05 e 0,005 ng/ml).

[124] A mistura reativa foi composta por um meio IMDM de 50 μ L em um prato de microtitração P96. Dois controles negativos foram utilizados:

[125] - Lise sem NK: células efectoras NK foram substituídas com with IMDM+5% FCS.

[126] - Lise sem anticorpos (Ab): anticorpos foram substituídos com with IMDM+5% FCS.

[127] Após 4 horas de incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, os pratos foram centrifugados e a fluorescência associada ao sobrenadante foi medida utilizando-se um fluorímetro (excitação: 485nm, emissão: 535nm).

[128] A lise percentual foi estimada utilizando-se uma faixa de calibragem obtida utilizando-se várias diluições de células alvo em lise por Triton X100 (2%), correspondentes a 100, 50, 25, e 0% de lise respectivamente.

[129] Os resultados foram primeiramente calculados através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ lise} = (\% \text{ lise com Anticorpo e NK}) - (\% \text{ lise sem Anticorpo}) - (\% \text{ lise sem NK})$$

e então expressos como porcentagens relativas, sendo 100% o valor obtido na maior concentração de Rituxan®.

[130] Os resultados obtidos para o anticorpo EMAB6 nas células de linhagem Raji mostrados na Figura 7(A) demonstram que, independentemente da concentração sendo testada, a citotoxicidade induzida pelo anticorpo EMAB6 é

maior do que a induzida por Rituxan[®]. Esta diferença é particularmente grande em baixas concentrações de anticorpos. Assim, a 0,5 ng/mL, as porcentagens de lise foram de 96% e 4% para EMAB6 e Rituxan[®] respectivamente. Aumentando-se a dose em quinhentas vezes (250ng/ml), a diferença é ainda apreciável uma vez que as porcentagens de ADCC são de 164% e 100% para EMAB e Rituxan[®] respectivamente. Quando as EC50s foram calculadas (concentração de anticorpos correspondente a 50% de E Max, a eficiência máxima obtida na maior concentração de anticorpos e no *plateau*) por estimação gráfica (em ng/ml) e assumindo-se que o Rituxan[®] e o EMAB6 alcançam o mesmo E Max, a razão EC50/EMAB6 EC50 do Rituxan[®] neste teste foi então igual a 300.

[131] A citotoxicidade do anticorpo quimérico EMAB603 foi avaliada na presença de células Raji através do mesmo procedimento utilizado para os anticorpos EMAB6. Sua atividade foi comparável à do anticorpo EMAB6 (ver Figura 7(B)).

[132] Com os linfócitos de pacientes com B-CLL, os resultados obtidos, mostrados na Fig. 8, demonstram que, independentemente da concentração sendo testada, a citotoxicidade induzida pelo anticorpo EMAB6 é maior do que aquela induzida pelo Rituxan[®]. Como já observado com relação às células Raji, esta diferença é particularmente grande em baixas concentrações de anticorpos. A concentração de 0.5 ng/mL de EMAB6 induz a mesma porcentagem de lise que 500 ng/ml de Rituxan[®], ou seja uma razão de concentração de 1.000. A 5 ng/mL as porcentagens de lise são de 269% e 9% para o EMAB6 e o Rituxan[®] respectivamente. Um resultado interessante corresponde às concentrações que dão margem a 50% de lise. Neste teste, a razão EC50/EMAB6 EC50 do Rituxan[®] foi estimada em 10.000 (estimação gráfica em ng/ml para EC50 assumindo-se que o Rituxan[®] e o EMAB6 alcançam o mesmo E Max).

[133] Nestes testes, as atividades citotóxicas do EMAB e do EMAB603 são portanto muito maiores do que a do Rituxan[®].

[134] **D. Ativação do CD16 (Secreção de IL-2)**

[135] A ativação do CD16 (FcγRIIIA) induzida pelo anticorpo quimérico EMAB6 foi determinada na presença de células Raji ou de linfócitos B de pacientes com CLL. Este teste avaliou a habilidade do anticorpo de se ligar ao

receptor CD16 (FcγRIIIA) expresso nas células Jurkat-CD16 e de induzir a secreção de IL-2. O anticorpo quimérico anti-CD20 do Rituxan[®] é incluído nos testes para comparação.

[136] A medição de ativação do CD16 foi realizada da seguinte maneira na linhagem de células Jurkat-CD16 na presença de células Raji ou linfócitos B de pacientes com B-CLL.

[137] Mistura em prato de poço-96: 50μL de solução de anticorpos (diluuição de 10.000, 1.000, 100 e 10 ng/mL com IMDM+5% FCS para linfócitos B em pacientes com B-CLL e de 10.000, 2.000, 1.000, 200, 100, 50 and 25 ng/mL para células Raji),

[138] Os resultados foram inicialmente expressos em níveis de IL-2 como uma função da concentração de anticorpos (de 0 até a concentração final de 250 ng/ml), e então como porcentagens relativas, onde 100% é o valor obtido com o Rituxan[®] na maior concentração do teste. 50μL de PMA (Phorbol Miristato Acetato, diluído a 40 ng/mL com IMDM+5% FCS), 50 μL de Raji ou PBMCs de pacientes com B-CLL obtidas após tratamento Ficoll (> 95% de células B) diluídos a 6x10⁵/mL com IMDM+5% FCS, e 50μL de células Jurkat-CD16 (20x10⁶/mL em IMDM+5% FCS). Controles sem anticorpos foram incluídos em todos os testes. Após incubação ao longo de uma noite a 37°C, os pratos foram centrifugados e o IL-2 contido nos sobrenadantes estimado utilizando-se um kit comercial (Quantikine de R/D). As leituras de OD foram feitas a 450nm.

[139] Os resultados obtidos com a linhagem de células Raji mostrados na Fig 9(A) demonstram que, na presença do EMAB6 e do Rituxan[®], as células Jurkat CD-16 segregam IL-2, o que indica a ativação de células via ligação da porção Fc dos anticorpos ao CD16. O anticorpo EMAB6, no entanto, possui uma habilidade de indução que é muito maior do que a do anticorpo Rituxan[®]. Assim, a 6,25 ng/mL, as porcentagens de IL-2 foram de 112% e de 21% para o EMAB 6 e o Rituxan[®] respectivamente. A 50 ng/mL, a diferença é ainda grande, com as porcentagens de IL-2 sendo de 112% e de 65% para o EMAB 6 e o Rituxan[®] respectivamente. Esta diferença diminui à medida que a concentração aumenta, com as respectivas porcentagens de IL-2 para o EMAB 6 e o Rituxan[®] sendo de 124% e de 100% a 2.500 ng/mL. Neste teste, a razão EC50/EMAB6 EC50 do

Rituxan[®] é estimada em 15 (estimação gráfica em ng/ml para EC50 assumindo-se que o Rituxan[®] e o EMAB alcançam o mesmo E Max.

[140] Estes resultados confirmam os resultados de ADCC, ambos sendo dependentes de CD16. Eles demonstram que a ligação com o CD16 (FcγRIIIA) pela porção Fc do anticorpo EMAB6 é seguida por uma forte ativação celular que leva à indução das funções efetoras.

[141] A ativação de CD-16 (FcγRIIIA) induzida pelo anticorpo quimérico EMAB603 na presença de células Raji é comparável à induzida pelo anticorpo EMAB6.

[142] Com linfócitos de pacientes com B-CLL, os resultados obtidos mostrados na Fig. 10 demonstram que na presença de anti-CD20 Rituxan[®] e EMAB6, as células Jurkat-CD16 segregam IL-2, o que indica a ativação de células via ligação da porção Fc dos anticorpos ao CD16. O anticorpo EMAB6, no entanto, possui uma habilidade de indução que é muito maior do que a do anticorpo Rituxan[®].

[143] Em conclusão, todos os testes realizados em células Raji demonstram que os anticorpos EMAB6 e EMAB603, diferentemente do Rituxan[®], são altamente citotóxicos e induzem a ativação de células que expressam o CD16 (FcγRIIIA), especialmente em baixas concentrações de anticorpos. Ao contrário, sob as mesmas condições, a atividade citotóxica dependente do complemento do EMAB6 diminui em aproximadamente 50% em comparação com a do Rituxan[®].

[144] Estes resultados foram confirmados pelos estudos feitos com a utilização de células isoladas de pacientes com B-CLL, sugerindo que o anticorpo EMAB6 é muito mais citotóxico do que o Rituxan[®] com relação aos linfócitos B de pacientes com B-CLL. As diferenças entre os dois anticorpos são mais marcantes com linfócitos de pacientes com B-CLL do que com células Raji, o que demonstra a significativa importância terapêutica do EMAB6 em comparação com o Rituxan[®] para esta condição.

[145] O motivo dessa diferença aumentada pode ser, dentre outros, a expressão do antígeno CD20 em linfócitos B de pacientes com B-CLL em comparação com as células Raji.

[146] Por analogia com as células Raji, pode-se sugerir que a atividade citotóxica dependente do complemento do anticorpo EMAB6 com relação a linfócitos de pacientes com B-CLL deve ser menor do que a induzida pelo Rituxan®, assim demonstrando a vantagem de ser menos tóxico *in vivo* em consequência dos efeitos indesejáveis associados a uma forte ativação do caminho de passagem complementar adicional.

Exemplo 4: Análise de Glicanos de EMAB e de EMAB603 por HPCE-LIF

[147] A estrutura de N-glicano das cadeias pesadas dos anticorpos EMAB6 e EMAB603 foi analisada utilizando-se HPCE-LIF. A estrutura de N-glicano da cadeia pesada de Rituxan® foi também analisada para comparação.

[148] Com este propósito, anticorpos monoclonais anti-CD20 foram dessalinizados em uma coluna Sephadex G-25 (*HiTrap Desalting, Amersham Biosciences*), evaporados e re-suspensos no tampão de hidrólise de PNGase F (Glyko) na presença de 50 mM de β -mercaptoetanol. Após 16 horas de incubação a 37°C, a fração de proteína foi precipitada pela adição de etanol absoluto, e o sobrenadante, que continha os N-glicanos, foi evaporado. Os oligossacarídeos resultantes foram sinalizados diretamente utilizando-se um fluorocromo APTS (1-amino-pireno-3,6,8-trissulfonato), ou foram sujeitos a ação de exoglicosidases antes da sinalização com APTS.

[149] A estimativa do nível de fucose foi feita pela adição das formas fucosiladas isoladas ou mais especificamente após a ação simultânea da neuraminidase, β -galactosidase and *N*-acetilhexosaminidase, que resultou em 2 picos correspondentes ao pentasacarídeo fusilado ou não-fusilado [GlcNac2-Man3] que é obtidos no eletroforetograma:

Tabela 1			
Análise de N-glicanos de anti-CD20 EMAB603 e de Rituxan®			
Anti-CD20	% Fucose	% Galactose	Fuc/Gal
EMAB603	15	37	0,4
Rituxan®	93	57	1,63

O nível de fucose, expresso em %, foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Nível fucose} = \frac{[\text{GlcNac2-Man3}] \text{ fucosilado} \times 100}{[\text{GlcNac2-Man3} + \text{GlcNac2-Man3}] \text{ fucosilado}}$$

[150] O nível de galactose, expresso em %, foi calculado pela adição das porcentagens das formas de oligossacarídeo que contêm galactose, obtidas após a ação da neuraminidase e da fucosidase. A fórmula utilizada é a seguinte:

$$\text{Nível de galactose} = (G1 + G1B) + 2 \times (G2 + G2B)$$

[151] A razão fucose/galactose é obtida da divisão do nível de fucose pelo nível de galactose, calculados da forma descrita acima.

[152] A partir desta análise (ver Tabela 1), aparentemente os anticorpos EMAB6 e EMAB603 são pouco fucosilados (% fucose < 25%) em comparação com o Rituxan® (% fucose = 93%). Além disso, a razão Fuc/Gal (razão fucose/galactose) para o EMAB6 e o EMAB603 é baixa (razão Fuc/Gal < 0,6), diferentemente dos anticorpos expressos em células CHO tais como o Rituxan® (razão Fuc/Gal = 1,63).

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20, **caracterizado por** cada uma das cadeias leves do anticorpo ter a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 28 codificada por uma sequência de ácidos nucleicos quiméricos murino-humano SEQ ID No. 27, e em que cada das cadeias pesadas do mesmo tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 20 codificada pela sequência de ácidos nucleicos quiméricos murino-humano SEQ ID No. 19.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser produzido por uma linhagem de células de hibridoma de rato.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** ser produzido pela linhagem de células de hibridoma de rato YB2/0, cuja célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, registrada no *American Type Culture Collection* sob o número ATCC CRL-1662.

4. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado por** ser o anticorpo EMBA603 produzido pelo clone R603, registrado sob o número de registro CNCM I-3529 no *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* (CNCM).

5. Uso de anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para ativação *in vitro* de receptores FcγRIIIA em células efectoras imunológicas.

6. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser utilizado como uma droga.

7. Uso de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para a fabricação de uma droga para o tratamento de leucemia ou de linfoma.

8. Uso de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para a fabricação de uma droga para o tratamento de uma patologia selecionada a partir do grupo consistindo em leucemia linfoblástica aguda B, linfoma de célula B, linfoma de célula B grande, incluindo Leucemia Linfocítica Crônica do tipo B (B-CLL), linfoma de célula B pequena, leucemia prolinfocítica de célula B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de célula manto, linfoma folicular, linfoma do tipo MAIT na zona marginal,

linfoma nodal na zona marginal com ou sem célula B monocitóide, linfoma esplênico da zona marginal (com ou sem linfócitos vilosos), leucemia tricoleucocítica, linfoma difuso de célula B grande, linfoma de Burkitt, juntamente com quaisquer doenças de disfunção imunológica envolvendo células linfóides B, incluindo doenças auto-imunológicas.

9. Uso de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para a fabricação de uma droga para o tratamento de leucemia linfóide.

10. Uso de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para a fabricação de uma droga para o tratamento da Leucemia Linfóide Crônica do tipo B (B-CLL).

11. Uso de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para a fabricação de uma droga para o tratamento da doença do enxerto versus hospedeiro crônica.

12. Uso de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser para a fabricação de uma droga para o tratamento da rejeição ao transplante de órgãos, em particular de rim.

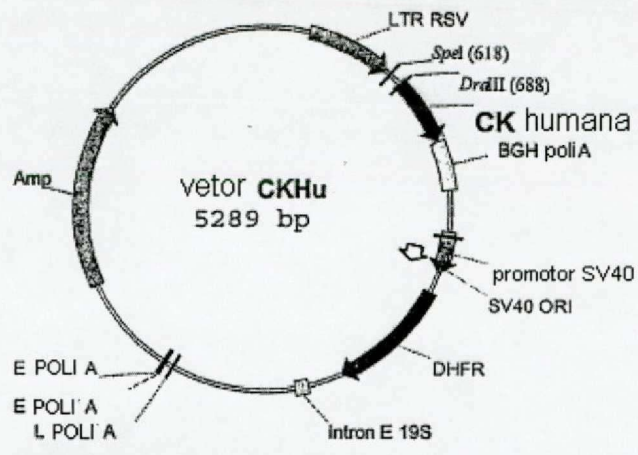


Fig. 1

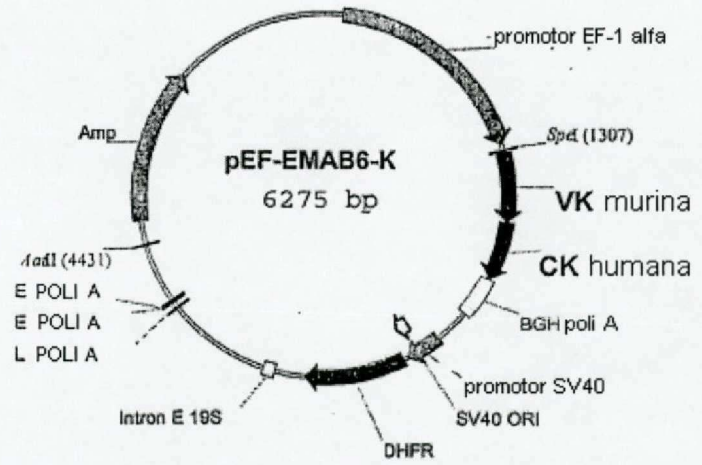


Fig. 2

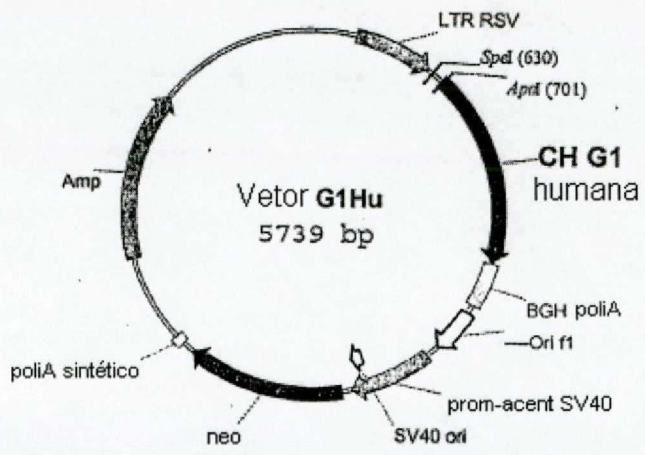


Fig. 3

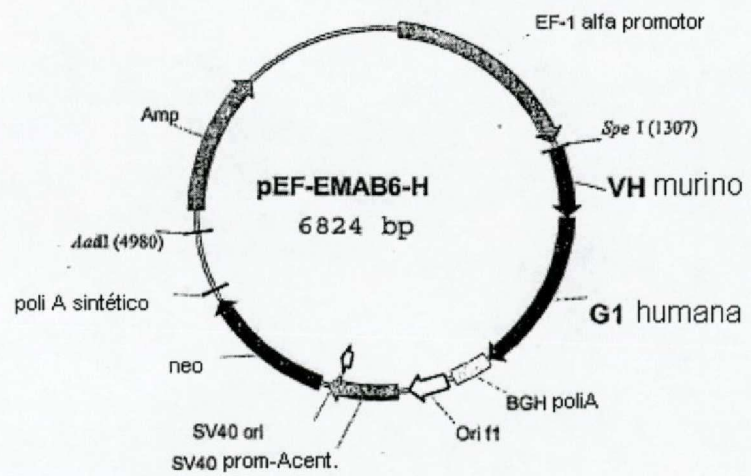


Fig. 4

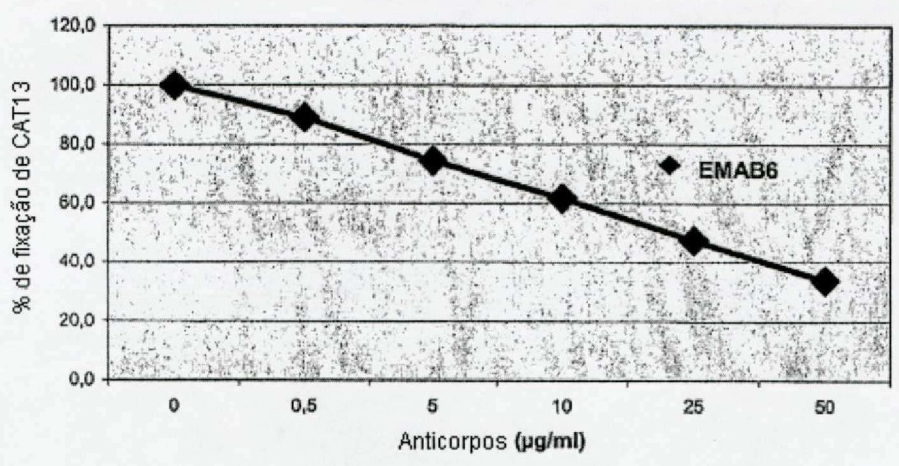


Fig. 5

4/10

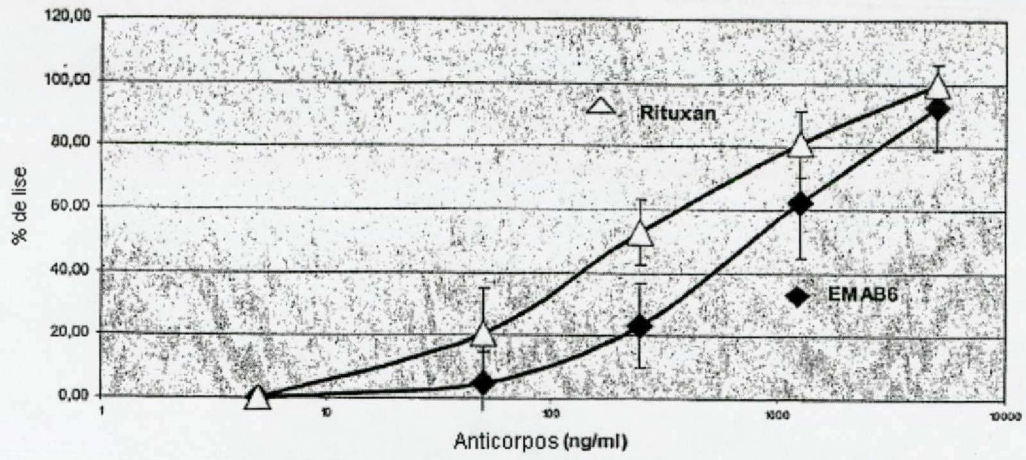


Fig. 6 (A)

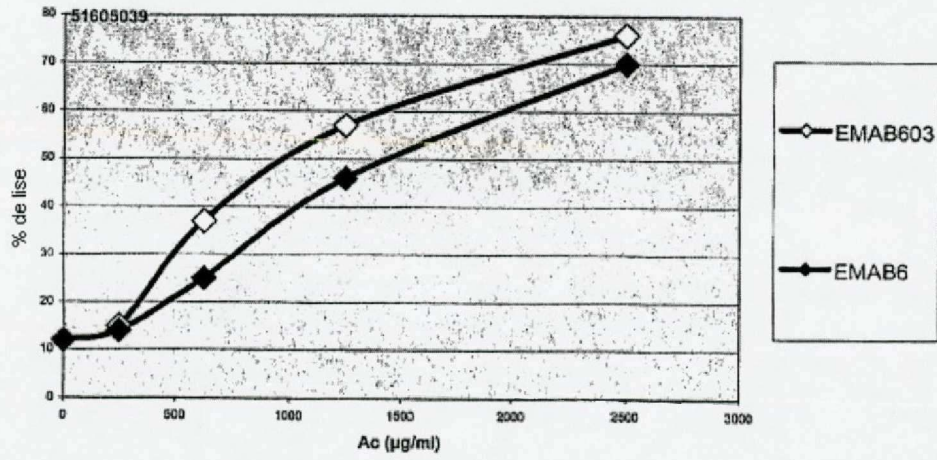


Fig. 6 (B)

5/10

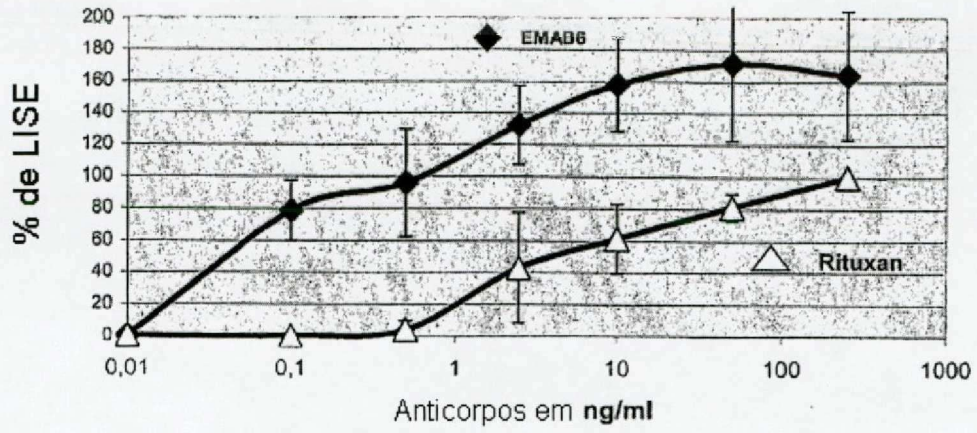


Fig. 7 (A)

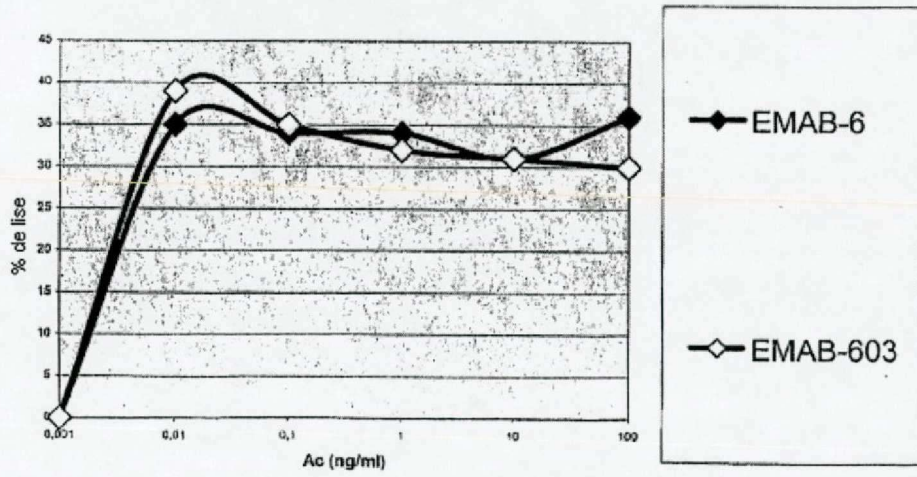


Fig.7 (B)

6/10

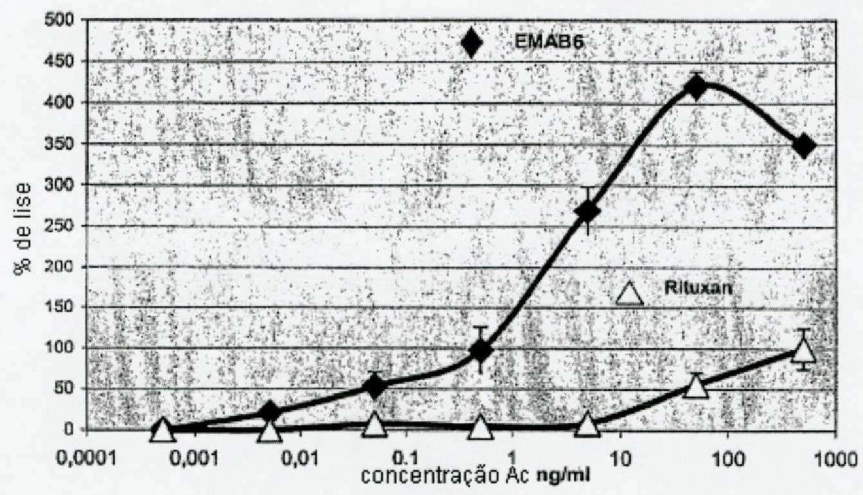


Fig. 8

7/10

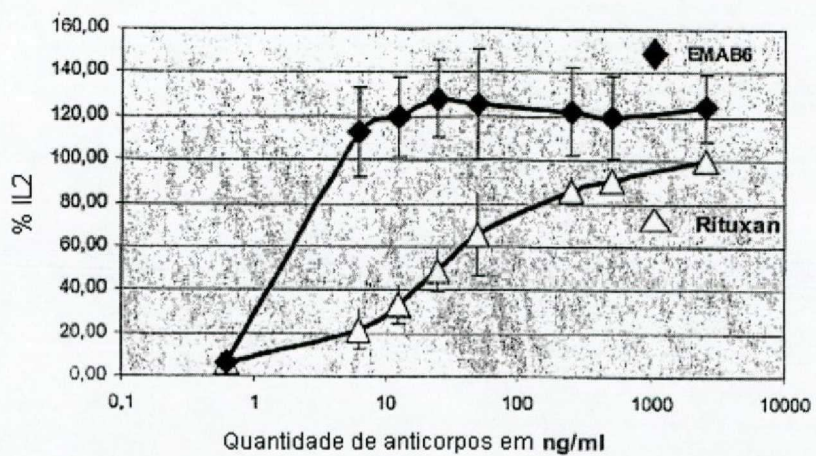


Fig. 9 (A)

8/10

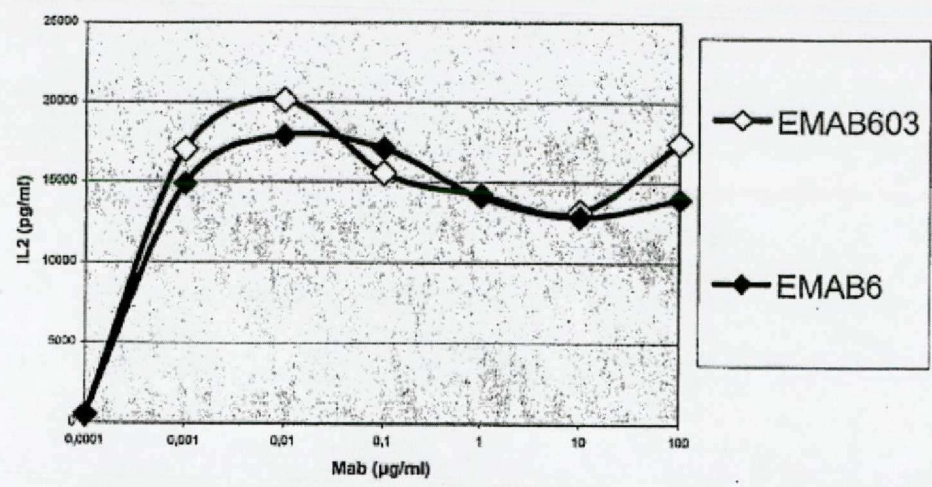


Fig.9 (B)

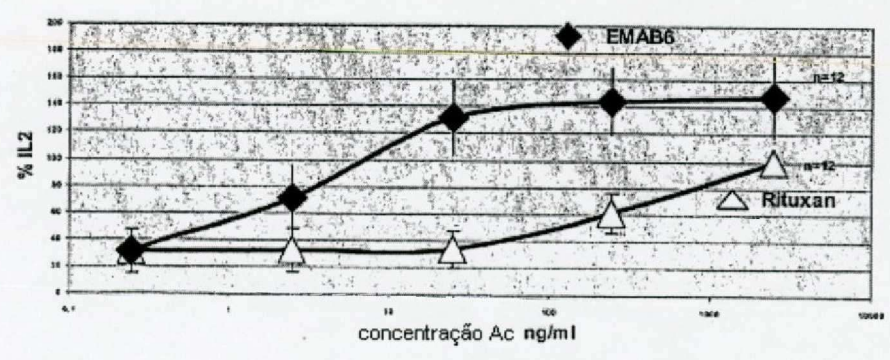


Fig. 10

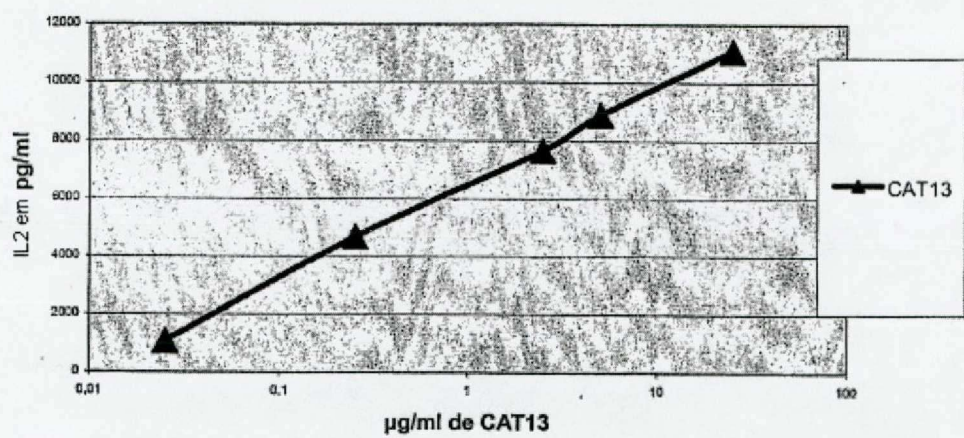


Fig. 11

